



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS**

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE *Bacillus licheniformis* Y *Pseudomonas stutzeri* EN LA DEPURACIÓN DE VINAZA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

MIGUEL ANGEL LÓPEZ HERNÁNDEZ

MÉXICO D. F. MARZO DE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Luna Pabello en el laboratorio de Microbiología Experimental, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello	Facultad de Química, UNAM
Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Dra. Alejandra Bravo de la Parra	Instituto de Biotecnología, UNAM

El Jurado de Examen de Maestría está constituido por:

Presidente	Dr. Rafael Vázquez Duhalt	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Enrique Galindo Fentanes	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Sergio Sánchez Esquivel.	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, a los integrantes de mi comité tutorial, Dra. María del Carmen Wachter Rodarte y Dra. Alejandra Bravo de la Parra, por sus recomendaciones, comentarios y aportes valiosos para el desarrollo de este proyecto de tesis y hacer de éste no solo un trabajo de crecimiento académico e intelectual sino un trabajo de crecimiento personal y humano.

A mis compañeros de laboratorio y al personal que labora en el mismo por su apoyo y colaboración.

A mis padres y mis hermanos por su apoyo, paciencia y comprensión, sin lo cual no habría sido posible la realización de este sueño. TAYTA.

A todos y cada uno de los que, de alguna manera, contribuyeron para que este proyecto se llevara a cabo y permitiera el logro de una mas de mis metas.

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo de tesis.

Se agradece el apoyo económico otorgado por el Proyecto PAPIME, clave EN213104: Desarrollo, montaje y validación de prácticas de laboratorio para la enseñanza de la microbiología ambiental; Proyecto PAPIIT, clave IN215006-3: Determinación de la capacidad desinfectante de aguas residuales domésticas usando agregados minerales naturales y artificiales conteniendo plata y del Proyecto PAIP 6190-14 (VMLP 2006-2007) FQ-UNAM, para la compra de materiales y reactivos empleados para la realización de la presente tesina. Al laboratorio de Microbiología Experimental, de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el uso de las instalaciones que permitieron la realización del trabajo experimental de este trabajo.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Generación de vinaza	5
2.2 Disposición final de la vinaza	9
2.3. Composición de la vinaza	12
2.4. características de las cepas	13
2.4.1. <i>Bacillus licheniformis</i>	13
2.4.2. <i>Pseudomonas stutzeri</i>	14
2.5. Aspectos generales de biodegradación	14
2.5.1. Factores implicados en el proceso de biodegradación	15
3.OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo general	16
3.2. Objetivos particulares	16
3.3. Hipótesis	16
3.4 Estrategia general de trabajo	17
4. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL	18
4.1 Materiales	18
4.2. Equipo	18
4.3. Desarrollo de actividades	18
4.3.1. Análisis de las cepas	18
4.3.2. Manejo de las cepas	22
5. SEGUNDA ETAPA	23
5.1. Materiales	23
5.2 Equipo	23
5.3. Preparación de los inóculos	23
5.4. Evaluación de la actividad biodegradadora	24
5.5. Análisis y discusión de los resultados	25
5.5.1. Pruebas de exploración a diferentes valores de pH	25
5.5.2. Pruebas de biodegradación empleando diferentes concentraciones de vinaza	27

6. TERCERA ETAPA EXPERIMENTAL	32
6.1. Materiales	32
6.2. Equipo	32
6.3. Preparación de los inóculos	32
6.4. Preparación del Biorreactor	33
6.5. Pruebas de biodegradación bajo condiciones controladas de operación	33
6.6. Resultados obtenidos de la prueba en el biorreactor	34
7. PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA	36
7.1. Materiales	36
7.2. Equipo	36
7.3. Realización de la prueba de toxicidad aguda	36
7.4. Pruebas de Toxicidad aguda del agua residual obtenida en la 3a etapa experimental	39
8. CONCLUSIONES	41
9. RECOMENDACIONES	42
10. BIBLIOGRAFÍA	43
11. ANEXOS	53
A-1) Determinación de DQO por el método titrimétrico	58
A-2) Determinación de DBO5	62
A-3) Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga	

INDICE DE FIGURAS

1. Diagrama general del proceso de obtención de alcohol etílico a partir de caña de azúcar	5
2. Mosto en el tanque de fermentación	6
3. Torre de destilación	7
4. Imagen de la vinaza justo después de salir de la torre de destilación	8
5. Estrategia general de trabajo	17
6. Imagen de las colonias que desarrolla <i>P. stutzeri</i>	19
7. Imagen de las colonias que desarrolla <i>B. licheniformis</i>	19
8. Tinción de Gram de la cepa de <i>P. stutzeri</i> vista al microscopio	20
9. Tinción de Gram de la cepa de <i>B. licheniformis</i> vista al microscopio	20
10. Imagen en fresco de la cepa de <i>B. licheniformis</i> vista al microscopio	21
11. Imagen en fresco de la cepa de <i>P. stutzeri</i> vista al microscopio	21
12. Imagen de una muestra de vinaza pura	22
13. Pruebas de exploración de <i>B. licheniformis</i> a diferentes valores de pH y vinaza diluida al 10 %	25
14. Pruebas de exploración de <i>P. stutzeri</i> a diferentes valores de pH y vinaza diluida al 10 %	26
15. Cinéticas de degradación de <i>B. licheniformis</i> y <i>P. stutzeri</i> empleando vinaza diluida al 5 %	27
16. Cinéticas de degradación de <i>B. licheniformis</i> y <i>P. stutzeri</i> empleando vinaza diluida al 10 %	28
17. Cinéticas de degradación de <i>B. licheniformis</i> y <i>P. stutzeri</i> empleando vinaza diluida al 20 %	29
18. Cinéticas de degradación de <i>B. licheniformis</i> y <i>P. stutzeri</i> empleando vinaza diluida al 25 %	30
19. Imágenes del biorreactor empleado en las pruebas de biodegradación en la tercera etapa experimental.	33
20. Resultados obtenidos de la prueba realizada en el biorreactor	34
21. Imágenes de las plántulas de lechuga crecidas en cajas petri después de 120 horas	37
22. Método de medición de las plántulas de <i>L. sativa</i>	37
23. Efecto de la toxicidad de la vinaza sin tratar después de exponer las semillas durante 120 horas	38
24. Efecto de la toxicidad del ZnSO ₄ empleado como tóxico de referencia.	38

INDICE DE TABLAS

1. Composición de la vinaza de diferentes fuentes y orígenes	9
2. Composición general de la vinaza	12
3. Composición de la vinaza proveniente de remolacha azucarera	12
4. Resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos de la vinaza	22
5. Resultados de las pruebas de exploración a diferentes valores de pH para la cepa de <i>B. licheniformis</i>	26
6. Resultados de las pruebas de exploración a diferentes valores de pH para la cepa de <i>P. stutzeri</i>	26
7. Resultados obtenidos a partir de las pruebas de degradación a diferentes concentraciones de vinaza	30

INTRODUCCIÓN

En la actualidad uno de los principales problemas generados por la creciente actividad antropogénica es la contaminación ambiental, la cual se ha generalizado a nivel mundial. El aire, el agua y el suelo presentan un gran deterioro y su recuperación se torna difícil no solo por el tipo de contaminante, sino también por las concentraciones en las que estos se encuentran. Uno de los problemas más grandes es el gran volumen de aguas residuales que se generan debido a las actividades tanto domésticas como industriales. Debido a que no se tienen un control en la eliminación del agua residual, esta es vertida indiscriminadamente en los ríos, mares y lagos.

La actividad de la industria alcoholera-azucarera tiene un gran impacto en la economía de cualquier país en desarrollo. Si bien la producción de alcohol es esencial para la economía, también puede convertirse en uno de los aspectos más problemáticos debido a la generación de desechos con alto impacto ambiental y a la disposición final que se les debe dar.

Los ecosistemas receptores de este tipo de residuos se ven alterados significativamente de forma negativa y el impacto ambiental generado a partir de este tipo de descargas esta directamente relacionado con factores bióticos y abióticos, la toxicidad y biodegradabilidad de los compuestos que integran este tipo de residuos.

El proceso de biodegradación es uno de los factores clave en la reducción, a largo plazo, del impacto ambiental generado por los residuos. En la actualidad, la degradación de muchos compuestos contaminantes presentes en la naturaleza, se ha realizado empleando metodologías de tipo biológico usando una gran variedad de microorganismos para la obtención de agua de buena calidad que pueda ser descargada al medio ambiente (Akarsubasi *et al.*, 2005); estos microorganismos cuentan con enzimas que están codificadas en diferentes genes y/o plásmidos que les permiten degradar una gran variedad de compuestos (Green y Trett, 1989; Top *et al.*, 1998; Masahito *et al.*, 2000; Dinkla *et al.*, 2001; Jae-Chang y Sang-Jung, 2001). Los plásmidos, bajo ciertas circunstancias, confieren la capacidad para degradar moléculas orgánicas recalcitrantes (Summers, 1996)

permitiendo que las poblaciones microbianas logren una adaptación, sobreviviendo bajo presión selectiva (Del Solar *et al.*, 1998).

La biodegradación es el proceso en el cual los microorganismos descomponen la materia orgánica natural o sintética en moléculas más simples. Esto es el resultado de la asimilación y metabolización de los compuestos orgánicos. Desafortunadamente, la persistencia y la acción antimicrobiana de ciertos compuestos dificultan la supervivencia de la mayoría de los microorganismos encontrados originalmente en el ambiente afectado. Debido a esto, solo los microorganismos que cuenten con la capacidad de tolerar la existencia de estas sustancias son capaces de sobrevivir.

Uno de los aspectos más importantes es la microbiología ambiental es el análisis de las comunidades microbianas, así como la identificación de los microorganismos que las componen. En el caso de los procesos de biodegradación, la identificación de las especies microbianas y el estudio de la capacidad de biodegradación de estas especies, permite explorar el potencial de las cepas sobre la degradación de diferentes compuestos, tales como la vinaza.

Debido a que las vinazas no son muy comunes, son escasos los reportes sobre los procesos de degradación que se llevan a cabo, los microorganismos involucrados y las rutas metabólicas implicadas y aunado a la problemática que representa su manejo y la disposición final de las mismas, el presente trabajo tiene como finalidad ampliar y complementar la información referente a la biodegradación de la vinaza, así como la de evaluar la capacidad de biodegradación de *B. licheniformis* y *P. stutzeri*, con el objetivo de determinar su aplicabilidad en sistemas de tratamiento de aguas residuales.

RESUMEN

La vinaza es un producto de desecho generado por la industria alcoholera-azucarera, el cual se obtiene después del proceso de fermentación para la obtención de alcohol etílico. Se sabe que son susceptibles a ser degradadas mediante un proceso aerobio al ser tratadas mediante un sistema de lodos activados. Las cepas de *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas stutzeri* empleadas en este proyecto fueron aisladas y tipificadas en un trabajo previo (Salamanca, 2003) en cual se determinó su capacidad para degradar compuestos residuales provenientes de la industria del petróleo.

El presente trabajo se enfoca en determinar la capacidad de las cepas para degradar compuestos distintos a los provenientes de la industria petrolera, como es la vinaza, que tienen un impacto negativo en los ecosistemas, así como también evaluar la versatilidad de su metabolismo para su aplicación en el tratamiento de aguas residuales.

Para la determinación de la capacidad biodegradadora de las cepas de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* se empleo vinaza diluida a diferentes concentraciones (V/V) y la degradación de las cepas se midió en términos de la disminución de la Demanda Química de Oxígeno (DQO), empleando la cepas puras y una mezcla de ambas.

De las pruebas realizadas se determinó que ambas cepas tienen la capacidad de degradar la vinaza, la dilución a la cual se presenta una mayor disminución de la DQO es 25 % en ambas cepas. Al emplear la cepa de *P. stutzeri* se obtiene una mayor disminución de DQO con un porcentaje de remoción de aproximadamente el 90 % a un pH de 7.

Asimismo, se determinó mediante pruebas de toxicidad aguda, empleando semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L), que la vinaza es toxica cuando son empleadas como agua de riego en este tipo de hortalizas, debido a que inhiben por completo el desarrollo de las semillas y esta característica de las vinazas no se afecto cuando fueron tratadas con las cepas en estudio, es decir, la toxicidad no disminuyó en ninguno de los tratamientos aplicados.

2. ANTECEDENTES

Desde sus inicios en México, la agroindustria azucarera, ha estado ligada al desarrollo del país gracias a su amplia red de relaciones humanas, agrícolas, industriales y a sus innumerables implicaciones internas y externas, participando en los grandes problemas nacionales. Sin embargo, en sus inicios esta industria no previó el aprovechamiento integral de la caña de azúcar, generando subproductos contaminantes para el ambiente al desecharlos sin tratamiento y quedando desaprovechados en su mayoría (Jiménez *et al*, 1995), contribuyendo así a la contaminación de suelo y agua del país.

Actualmente en México existen 58 ingenios azucareros distribuidos principalmente en los estados de Campeche, Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz (Cámara Azucarera, 2007).

Durante su desarrollo esta industria ha enfrentado retos tecnológicos, que la han llevado a diversificar los productos derivados del procesamiento de la caña de azúcar. Uno de estos subproductos son las mieles incristalizables denominadas melaza, que pueden ser utilizadas como fuente energética en la alimentación de animales poligástricos o como sustrato para la producción de alcohol etílico y otros insumos de carácter biotecnológico (Jiménez *et al*, 1995). Esto ha llevado a muchos ingenios azucareros a contar con su propia destilería a la cual es canalizada la melaza para tener una subsecuente producción de alcohol.

Sin embargo, la producción de alcohol etílico representa un problema, esto es, la generación de grandes volúmenes de aguas residuales con características agresivas para el ambiente, las cuales en la mayoría de los casos son vertidas en el suelo como agua de riego sin un tratamiento previo sin considerar las repercusiones sobre los ecosistemas (Vlyssides *et al.*, 1997; Cortez *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 1995).

Asimismo se ha incrementado la atención hacia la mejora de la tecnología tanto por rentabilidad como por cuestiones sociales y ecológicas, de tal manera que los desechos originados puedan convertirse en subproductos con cierto valor económico y a la vez evitar el impacto que ocasionaría su incorrecta disposición. De las alternativas que ha tomado la

industria azucarera para el aprovechamiento de sus subproductos es la producción de etanol.

2.1. Generación de vinaza

En la figura 1, se muestra el diagrama general del proceso de obtención de alcohol etílico a partir de caña de azúcar. Actualmente, del total de los ingenios que se encuentran en el país, el 52 % de ellos cuenta con una destilería, donde dicho producto se genera a partir de la fermentación de la melaza proveniente del proceso de obtención de azúcar. La melaza es un subproducto espeso y oscuro, constituido principalmente de sacarosa, azúcares reductores, monosacáridos, además de impurezas que no se pudieron separar de la cachaza o jugo de caña (García *et al.*, 2001, Sangave y Pandit, 2006).

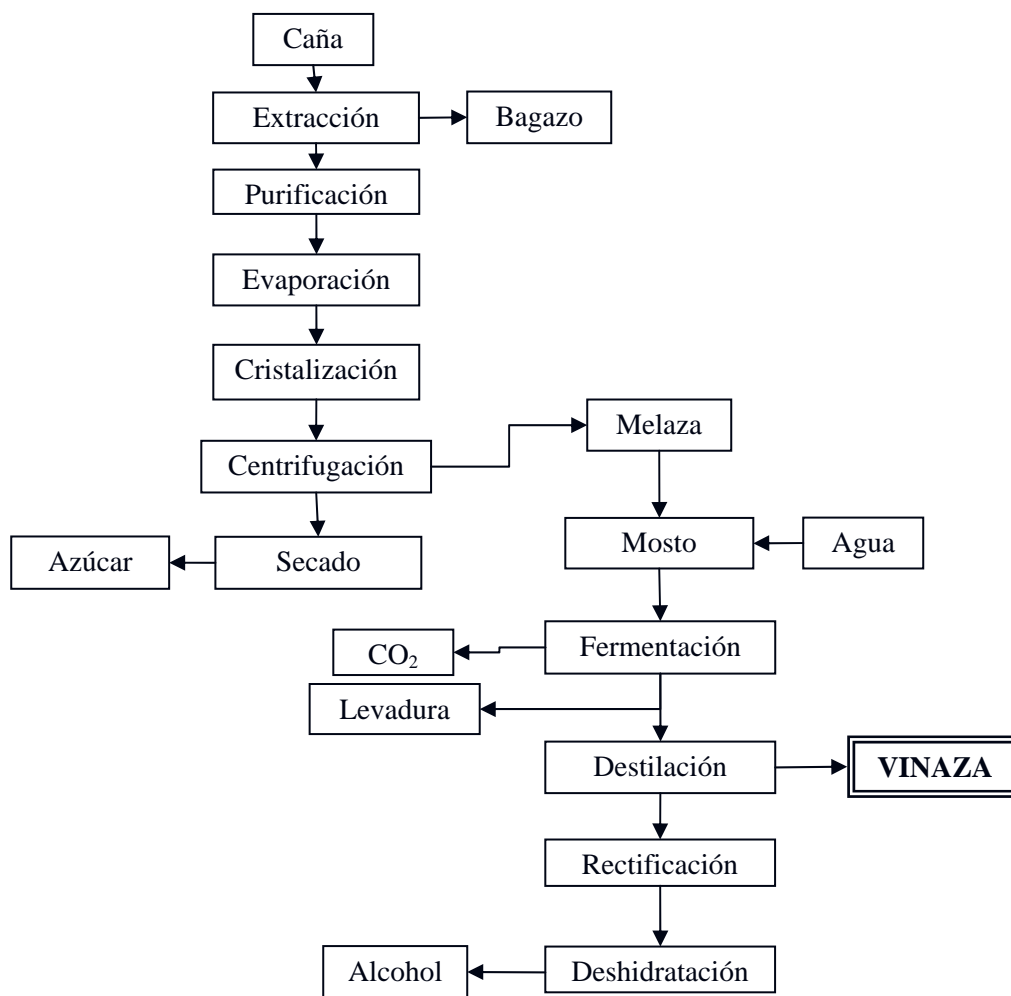


Figura 1. Diagrama general del proceso de obtención de alcohol etílico a partir de caña de azúcar.

Durante el proceso de fermentación, las levaduras necesitan una cantidad de sacarosa tal que no exceda la formación de etanol del 10 % en volumen, ya que una cantidad superior a este valor inhibe las funciones de las levaduras, además de que cualquier forma de sacarosa excedente no es metabolizada.

Por lo anterior, la melaza (con un contenido aproximado de 30 – 50 % de azúcares fermentables) debe ser diluida (Jiménez *et al.*, 1995; García *et al.*, 2001; Sangave y Pandit, 2006). Para la dilución se requieren grandes volúmenes de agua potable hasta alcanzar la concentración óptima de sacarosa; el agua se obtiene de pozos y ríos cercanos a los ingenios. Además de la melaza, se agregan factores de crecimiento y a esta mezcla se le denomina “mosto” y es preparada en grandes tanques de fermentación, como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Mosto en el tanque de fermentación.

Una vez que se tienen las condiciones óptimas del medio de cultivo (concentración de sustrato y temperatura), se procede a la inoculación de los tanques de fermentación empleando levaduras previamente propagadas en un tanque de inóculo. Los tanques son inoculados con el 10 % del volumen total de los tanques de fermentación.

Después de la inoculación e iniciada la fermentación, se monitorea el consumo de la sacarosa midiendo la disminución de los grados Brix del mosto, lo cual proporciona una

idea del consumo de los azúcares por parte de las levaduras. Una vez que se ha alcanzado una concentración menor al 10 % de la concentración inicial, la fermentación se detiene y la mezcla es procesada en la torre de destilación (figura 3).



Figura 3. Torre de destilación.

El proceso de destilación consiste en hacer pasar la mezcla proveniente de los tanques de fermentación (agua, levaduras, azúcares no fermentados y alcohol) a través de una torre de destilación. La mezcla se introduce por la parte superior de la torre, baja por gravedad pasando por cada uno de los platos de la torre; simultáneamente se inyecta vapor por la parte inferior de la torre y entra en contacto con la mezcla. La diferencia de los puntos de ebullición del agua y del alcohol hace que el segundo se separe de la mezcla y es recolectado previa condensación en otro tanque para su posterior rectificación y condensación. El residuo que se obtiene después de la destilación se recupera en la parte inferior de la torre de destilación (figura 4). Este residuo es denominado vinaza.



Figura 4. Imagen de la vinaza justo después de salir de la torre de destilación.

La vinaza sale a una temperatura superior a los 100 °C por lo que debe ser enfriada y posteriormente almacenada en tanques para su disposición final.

Las vinazas tienen características muy agresivas, presentan un color pardo oscuro con alto contenido de sólidos, pH con un valor aproximado de 4, altas concentraciones de materia orgánica, presencia de sustancias tóxicas (fenoles, ácido gálico, entre otros) y generalmente son empleadas como agua de riego en los campos de caña sin tratamiento previo y sin considerar el impacto ecológico y las consecuencias en el deterioro de los ecosistemas (Cortez *et al.*, 1997).

La problemática de la industria azucarera y en particular de las destilerías, es la generación de grandes volúmenes de vinaza, las cuales son generadas en una proporción de 15-20 litro de vinaza por cada litro de alcohol destilado. (Jiménez *et al.*, 1995; Cortez *et al.*, 1997; Pandiyan *et al.*, 1999; Decloux *et al.*, 2002; Nuissier *et al.*, 2002).

En la actualidad uno de los principales temas es la generación de biocombustibles. Uno de estos es el etanol, con el cual se busca disminuir el consumo de combustibles fósiles contribuyendo a disminuir el impacto que estos tienen sobre el ambiente. Si este tipo de proyectos es llevado a cabo, la producción de etanol crecerá y aunado a este crecimiento, también crecerá la generación de subproductos contaminantes, como son la vinaza.

La vinaza contiene principalmente agua y en disolución los productos metabólicos de *Saccharomices cerevisiae* y otros microorganismos presentes en los tanques de fermentación después de usar los azúcares remanentes de la melaza. La materia orgánica esta constituida generalmente de levadura muerta, materia soluble no fermentable del jugo de caña con un alto contenido de sólidos totales y un pH que varia entre 3 y 5 (Jiménez *et al.*, 1995; Decloux *et al.*, 2002). Sin embargo, su composición varía de acuerdo a la materia prima empleada y al proceso, entre una destilería y otra, y en menor grado, entre día y día de la zafra y entre zafras (García *et al.*, 1997; Sangave y Pandit, 2006). En la tabla 1, a manera de ejemplo, se muestra la composición de la vinaza proveniente de distintos lugares de origen.

Tabla 1. Composición de vinaza de diferentes fuentes y orígenes (Cortez *et al.*, 1997)

Origen de vinaza	Fuente	Composición en % p/p						% sólidos totales	% sólidos orgánicos	pH
		K	P	N	Ca	Mg	cenizas			
Brasil	Melazas	0.48	0.01	0.04	0.07	0.02	1.95	46.47	4.63	4.8
Brasil	Jugo	0.17	0.01	0.01	0.04	0.01	1.50	6.69	5.14	4.6
Australia	Melazas	0.86	0.00	0.31	0.11	0.15	3.20	n.a.	n.a.	n.a.
Australia	Melazas	1.05	0.01	0.18	0.20	0.13	n.a.	9.00	n.a.	n.a.
India	Melazas	1.2	1.50	0.12	n.a.	n.a.	n.a.	8.00	n.a.	5.3
Louisiana	Melazas	0.89	0.00	0.02	0.01	0.01	5.00	n.a.	n.a.	4.5

2.2 Disposición final de la vinaza

La vinaza, al ser un producto de desecho, puede tener distintos destinos para su disposición final.

Debido a su contenido proteico y mineral se emplea como alimento animal, empleándose en forma granular y en polvo para facilitar la mezcla con otros alimentos (Bermudez, 1994; Chará y Suárez, 1993; Sheehan *et al.*, 1980).

También se emplean en la producción de levaduras y proteínas, ya que después de ser clarificadas se convierten en un sustrato para las levaduras y mediante fermentación aerobia se logra la producción de proteínas unicelulares (Sarria y Preston, 1992).

Debido a la industrialización del etanol carburante, se esta generando un aumento de la generación de residuos, en algunos países, las fabricas de alcohol han reactivado sus

operaciones después de muchos años de estar inactivas. Debido a esto es que se deben buscar nuevas alternativas para el tratamiento de la vinaza generada, además de los tratamientos existentes como son, su empleo en como enriquecedores del suelo (De Heredia *et al.*, 2005).

Su empleo como agua de riego es uno de los más generalizado, esto debido a su alta concentración de sales, con un predominio de potasio (Alfaro *et al.*, 1996), sodio y nitrógeno (Gómez, 1996). Su aplicación sobre los suelos, empleados para la plantación de caña de azúcar, generalmente es de manera directa y en ocasiones de manera diluida. Esta práctica puede ocasionar cambios desfavorables en las propiedades físicas y químicas de los cultivos y el mismo suelo, esto debido a las características agresivas que presenta la vinaza (Bautista, 2000). Sin embargo, la dosificación de la vinaza y la dilución adecuada para obtener concentraciones óptimas de las sales podría contribuir a disminuir el impacto sobre el suelo (Dunne *et al.*, 2005; Filho *et al.*, 1995; Rodella *et al.*, 1977).

Se sabe, gracias a estudios realizados, que el poder contaminante de la vinaza disminuye debido al poder buffer del suelo. La aplicación de vinaza al suelo, puede aumentar el almacenamiento de agua y la cantidad de agua disponible, también afirma que en suelos tratados con vinaza, el potencial de oxido – reducción y el pH varían, el pH aumenta y el potencial REDOX disminuye, esto debido a que en anaerobiosis, los compuestos orgánicos liberan electrones (Korndörfer *et al.*, 2004).

Se ha observado que la aplicación de vinaza genera cambios temporales en la población de microorganismos con alteraciones en los procesos biológicos y químicos, tales como, disposición de la materia orgánica, nitrificación, desnitrificación, fijación de N₂ atmosférico y aumento de pH. En estudios de laboratorio se observó que el contenido de micronutrientes en el suelo aumenta, es relación a los controles manejados (Camargo *et al.* 1983).

Se han analizado los efectos acumulados de vinaza aplicada consecutivamente durante 20 años en algunas propiedades químicas de suelos y los resultados indican que los mayores cambios se detectaron en los primeros 20 cm de profundidad. La aplicación de vinaza aumenta ligeramente los valores del pH y los contenidos de materia orgánica,

magnesio y sodio; aumentaron los niveles de potasio intercambiable y estos incrementos mejoraron el balance de cationes intercambiables facilitando la absorción de potasio por parte del cultivo. También se ha estudiado el efecto del uso de la vinaza en el contenido de metales pesados como Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn en diferentes tipos de suelo al emplear vinaza como fertilizante natural. Los resultados muestran que el uso de vinaza durante más de 15 años consecutivos en un volumen de 300 m³ por hectárea, no aumentó la concentración de metales pesados en el suelo (Monteiro *et al.*, 1981., Esperonello *et al.*, 1981., Marinho *et al.*, 1982., Amaral *et al.*, 1999; Robaina *et al.*, 1984).

Otra manera de tratar la vinaza es mediante el empleo de reactores de digestión anaerobia para la producción de metano, buscando así disminuir la concentración de materia orgánica presente (Bermudez, 2000; Bramucci *et al.*, 2003; Gloria *et al.*, 1974; Gupta *et al.*, 2007). Además del empleo de reactores anaerobios, se acoplan reactores de digestión aerobia para mejorar la eficiencia de remoción de materia orgánica hasta en un 80 % medida en términos de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO).

Para llevar a cabo la depuración total o parcial de este tipo de aguas residuales empleando microorganismos se utilizan lagunas de oxidación, biodiscos y sistemas de lodos activados; también se han propuesto sistemas que combinan reactores biológicos rotatorios acoplados a humedales artificiales con lo que se trata de obtener una mejora sustancial en la calidad del agua tratada (Caballero *et al.*, 2006; Malandra *et al.*, 2003; Pérez-García *et al.*, 2005).

La idea principal es encontrar alternativas que permitan depurar este tipo de aguas residuales a un bajo costo en cuanto a su construcción, operación y mantenimiento y que no sean susceptibles a variaciones de flujo y calidad de agua.

El común denominador de los sistemas de tratamiento biológico es precisamente el uso de los microorganismos, debido a que son los principales responsables de la disminución de la materia orgánica presente (Bouwer, 1992, Rivera *et al.*, 2002).

En este sentido, el empleo de cepas que han sido probadas exitosamente en la degradación de compuestos de uso industrial, así como de materia prima y residuos industriales, representa una alternativa para el tratamiento del agua residual originada por la

industria alcoholera-azucarera conocida como vinaza. Además de la exploración de la versatilidad de estas cepas al ser empleadas en distintos sistemas de tratamiento.

2.3 Composición de la vinaza

Se han realizado estudios para determinar la composición general de la vinaza de ciertas regiones geográficas ya que puede variar dependiendo de cada región. A continuación, en la tabla 2 y tabla 3 se muestran algunos resultados de la composición de la vinaza.

Tabla 2. Composición general de la vinaza (Cortez *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 2003).

<i>Parámetros</i>	<i>Concentración</i>	<i>Parámetros</i>	<i>Concentración</i>
DQO (g/L)	60 -120	Potasio (g/L)	9 - 17
DBO (g/L)	50 -110	Calcio (g/L)	2 - 7
Sólidos totales (g/L)	80 - 110	Magnesio (g/L)	1 - 2
Sólidos volátiles totales (g/L)	60 - 80	Sodio (g/L)	0.5 - 1.0
Sólidos suspendidos (mg/L)	4 - 6	Cloruros (g/L)	3.0 - 3.5
Carbohidratos (g/L)	5 - 10	Zinc (mg/L)	3 - 10
Lípidos (g/L)	4 - 8	Cobre (mg/L)	0.5 - 2.0
Proteínas (g/L)	30 - 40	Manganeso (mg/L)	4.5 - 5
Fosfatos totales (mg/L)	90 - 120	Conductividad (mS/cm)	40 - 60
Nitrógeno total (g/L)	2 - 8	pH	3 - 5
Sulfatos totales (mg/L)	4 - 5		

Tabla 3. Composición general de vinaza proveniente de remolacha azucarera (Vlyssides *et al.*, 1997)

<i>Parámetros</i>	<i>Total</i>	<i>Fase líquida</i>	<i>Fase sólida</i>
Sólidos totales (mg/L)	81 200	–	–
Sólidos volátiles totales (mg/L)	60 226	–	–
Sólidos suspendidos (mg/L)	3 837	–	–
DQO (mg/L)	72 000	–	–
Carbohidratos (mg/L)	5 526.1	5 265	261
Lípidos (mg/L)	3 813.6	3 633	180
Proteínas (mg/L)	27 656.7	36 50	1 307
Substancias desconocidas (mg/L)	23 226.6	22 132	1 098
Substancias inorgánicas (mg/L)	20 973.9	19 983	991

<i>Parámetros</i>	<i>Total</i>	<i>Fase líquida</i>	<i>Fase sólida</i>
Fosfatos totales (mg/L)	91	–	–
Nitrógeno inorgánico total (mg/L)	840	–	–
Sulfatos totales (mg/L)	4 520	–	–
Nitrógeno total (mg/L)	7 340	–	–

La vinaza se caracteriza por presentar un color marrón muy oscuro, esto se debe a la presencia de melanoidinas y caramelos, así como también de compuestos fenólicos como ácido gálico y ácido vainillínico, que generalmente suelen afectar de manera negativa a los microorganismos que se emplean en el tratamiento biológico (Bolsanello *et al.*, 1980; Sobral *et al.* 1988)

2.4 Características de las cepas

Las cepas de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* fueron aisladas, caracterizadas y tipificadas en un trabajo previo y fueron empleadas para tratar compuestos provenientes de la industria petrolera; de este trabajo se obtuvo que las cepas son capaces de degradar éste tipo de desechos, por lo que pueden considerarse como una alternativa para el tratamiento de la vinaza.

2.4.1 *Bacillus licheniformis*

Son bacterias Gram positivas, aerobias y anaerobias facultativas, tienen forma redondeada y su movilidad es por medio de flagelos, crece a pH cercano a 7. Se pueden encontrar en una gran variedad de hábitats. Existen cepas de *B. licheniformis* no patógenas para el hombre, las cuales se encuentran distribuidas ampliamente en el ambiente.

B. licheniformis ha sido reportado como un microorganismo involucrado en la reducción del nitrógeno amoniacal generando poli-aminoácidos, así como en la degradación de compuestos nitro-aromáticos, en la producción de biosurfactantes y en general en la producción de enzimas, debido a que este tipo de bacterias tienen la capacidad

de crecer a temperaturas de aproximadamente de 45 °C (De Boer *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 2005; Vieille y Zeikus, 2001). Se han aislado cepas que son capaces de degradar nitrógeno amoniacal, lo que representa una alternativa para la eliminación de este contaminante. Este tipo de bacterias, también son empleadas en mezclas de microorganismos para la biorremediación de la contaminación por petróleo.

2.4.2 *Pseudomonas stutzeri*

Es un microorganismo distribuido ampliamente como una especie no fluorescente de *Pseudomonas*, es una bacteria Gram negativa con un metabolismo estrictamente respiratorio, es móvil con un metabolismo estrictamente respiratorio, es móvil por flagelos polares, es desnitrificante, libera nitrógeno gaseoso a partir de nitrato. Es capaz de crecer en maltosa y almidón, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y principalmente en suelo y agua. Tiene una gran versatilidad metabólica, que incluye la degradación de contaminantes ambientales como moléculas de alto peso molecular. En general, el género *Pseudomonas* ha sido estudiado por la habilidad de sus especies para metabolizar una gran diversidad de compuestos (Altenschmidt *et al.*, 1990; Barbieri *et al.*, 2000; Bennasar *et al.*, 1998; Sikorsky *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 2002).

Ha sido reportado como un microorganismo con un metabolismo versátil, con la capacidad de llevar a cabo procesos de nitrificación y desnitrificación y la degradación de diversos contaminantes ambientales (Salamanca, 2003; Lee *et al.*, 1999).

También se han reportado cepas de *P. stutzeri* capaces de degradar hidrocarburos aromáticos, los cuales, debido a su baja solubilidad en agua deben ser tratados con surfactantes para mejorar su disponibilidad y aprovechamiento por parte de las cepas (Grimberg *et al.*, 1996).

2.5 Aspectos generales de biodegradación

El proceso de biodegradación o descomposición de la materia orgánica natural o sintética causada por la acción de los microorganismos con el fin de obtener moléculas más simples, es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de los compuestos orgánicos (Murgel, 1984).

La utilización de los compuestos es dependiente de la naturaleza química de los compuestos, así como de factores bióticos y abióticos presentes en el ambiente (Atlas *et al.*, 1981; Van Der Meer *et al.*, 1992; Wiggins *et al.*, 1998). La interacción entre el microorganismo y el sustrato incluyen la intervención de enzimas intracelulares y extracelulares que permiten, en algunos casos, que el sustrato sea utilizado como fuente de carbono, nitrógeno y otros nutrimentos, o bien, como aceptor final de electrones. En otros casos, el sustrato no proporciona ningún beneficio y las reacciones no enzimáticas derivadas de los subproductos microbianos, causan cambios químicos como consumo de oxígeno, generación de subproductos de fermentación o alteración del pH.

Los procesos de biodegradación pueden agruparse en biodegradación primaria, la cual implica pequeñas alteraciones en la estructura química del compuesto originando la pérdida de las propiedades específicas de la sustancia; y biodegradación última, término que se aplica cuando el compuesto orgánico es totalmente utilizado por los microorganismos y da como resultado la producción de dióxido de carbono, agua, sales minerales y biomasa.

2.5.1 Factores implicados en el proceso de biodegradación

En el proceso de biodegradación, los factores químicos, físicos y biológicos determinan la tasa de degradación, la eficiencia en la transformación parcial o total de los compuestos y por ende, la persistencia de estos en el ambiente.

Los factores químicos implicados en el proceso de biodegradación incluyen la composición y tipo de sustancia o compuesto, la longitud de las cadenas y/o la cantidad de compuestos aromáticos, el número y los sustituyentes en la o las moléculas (Amador-Rosas *et al.* 2005).

Los factores físicos involucrados incluyen la solubilidad, sorción, esparcimiento, dispersión, emulsificación, sedimentación, evaporación, estado físico y concentración del compuesto o mezcla, temperatura, disponibilidad de oxígeno, presencia de nutrientes, actividad de agua, salinidad, presión, entre otros (Salamanca, 2003).

En cuanto a los factores de tipo biológico se refiere se encuentran, el origen del cultivo microbiano, la tolerancia a la toxicidad del compuesto, el tiempo y la forma de adaptación puede influir de manera determinante sobre la tasa de degradación. De igual manera, la versatilidad genética y la capacidad enzimática de los microorganismos, repercuten sobre la capacidad de supervivencia y la velocidad de degradación de los diferentes compuestos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la capacidad de *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas stutzeri* para degradar vinaza bajo condiciones controladas de temperatura, pH, concentración de oxígeno y concentración de sustrato bajo condiciones estériles.

3.2 Objetivos particulares

1. Establecer la capacidad de *B. licheniformis* y *Pseudomonas stutzeri* para degradar vinaza.
2. Establecer las mejores condiciones en las cuales las cepas de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* presentan una mayor degradación.
3. Determinar la velocidad de degradación de la vinaza empleando como inóculo las cepas puras y mixtas de *B. licheniformis* y *Pseudomonas stutzeri*.
4. Evaluar la toxicidad aguda, empleando *Lactuca sativa*, de la vinaza y del agua resultante del proceso de biodegradación en el biorreactor alimentado con vinaza e inoculado con el cultivo que presenta la mayor degradación.

3.3 Hipótesis

- La velocidad y el porcentaje de degradación de la vinaza dependerán del tipo de cepa bacteriana y de la concentración de vinaza empleada.
- El porcentaje de remoción de materia orgánica aumentará cuando los experimentos sean realizados empleando el biorreactor.
- La toxicidad disminuirá considerablemente después de someter la vinaza a las pruebas de biodegradación.

3.4 Estrategia general de trabajo

Para la realización de las pruebas de degradación de la vinaza, se establecieron los protocolos y la estrategia general de trabajo, la cual se divide en tres etapas y se presentan en la figura 5.

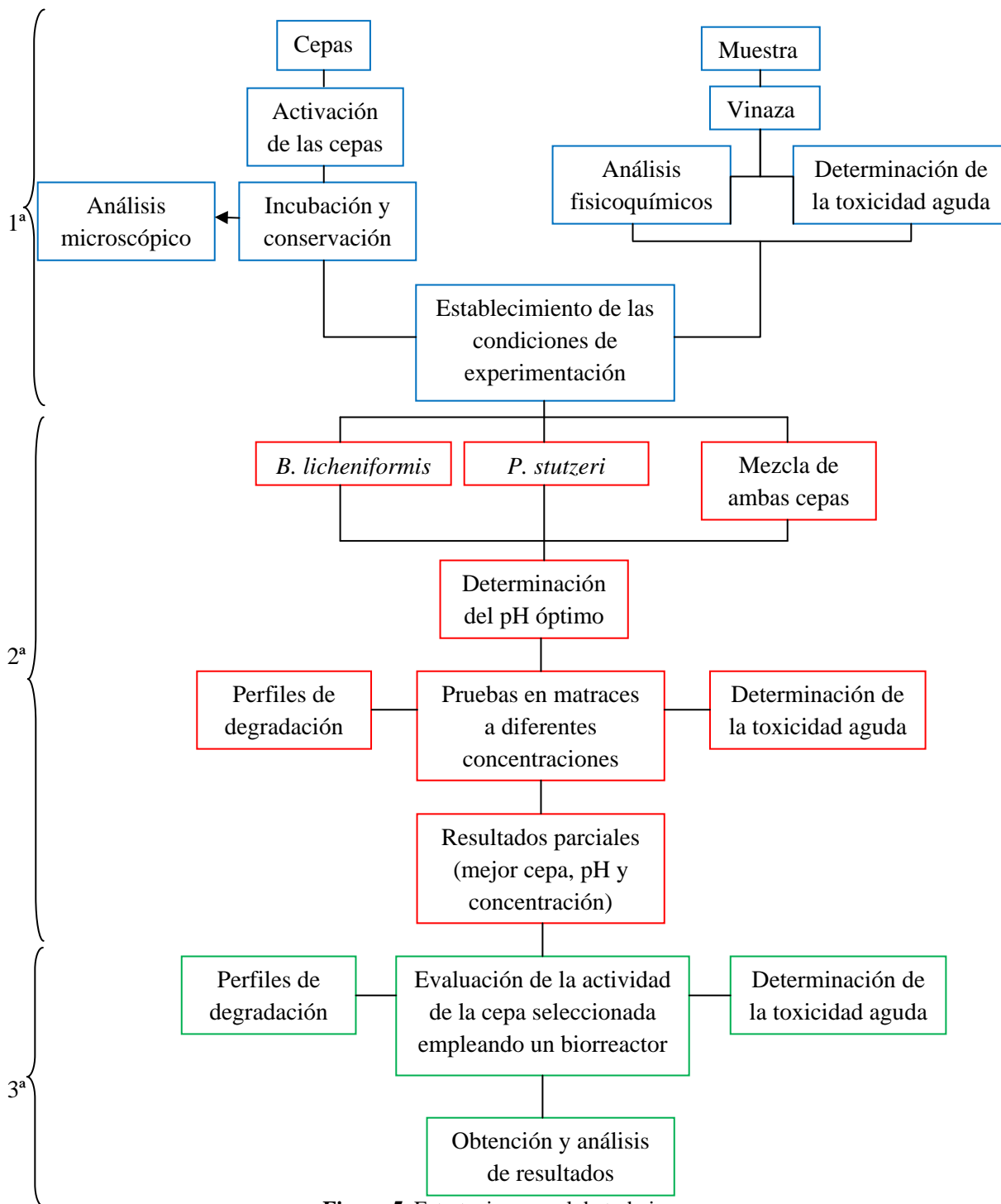


Figura 5. Estrategia general de trabajo

4. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL

4.1 Materiales

- ✚ Cepas: *B. licheniformis* y *P. stutzeri*.
- ✚ Medio de cultivo Luria – Bertani (LB).
- ✚ Vinaza proveniente del Ingenio Azucarero Independencia, ubicado en Martínez de la Torre, Veracruz.
- ✚ Material de vidrio de laboratorio.

4.2 Equipo

- ✚ Incubadora con control de temperatura. G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Co., Inc. (0-100°C).
- ✚ Microscopio electrónico.
- ✚ Balanza analítica digital. Sartorico BL150 (0.01-150 g).
- ✚ Autoclave.
- ✚ Campana de flujo laminar.

4.3 Desarrollo de actividades

Durante el desarrollo de ésta etapa se realizaron pruebas, tanto a las cepas de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* como a la vinaza.

4.3.1 Análisis de las cepas

El primer paso para el desarrollo del proyecto fue la activación de las cepas, las cuales se encontraban almacenadas a una temperatura de -80 °C. La activación consistió en verificar que las cepas aún fueran viables, para esto fueron cultivadas en medio de cultivo LB, tanto en estado líquido como sólido y se incubaron a una temperatura de 37 °C, que es la temperatura óptima que se determinó en un trabajo previo con estas cepas (Salamanca, 2003). El tiempo de incubación fue de 24 horas.

Durante este tiempo se desarrollaron las colonias en medio sólido y se observó la morfología y la uniformidad de las colonias presentes y en base a la bibliografía se determinó que las colonias correspondían a las cepas antes mencionadas.

En las figuras 6 y 7 se muestran las colonias desarrolladas por las cepas de *P. stutzeri* y *B. licheniformis* respectivamente.

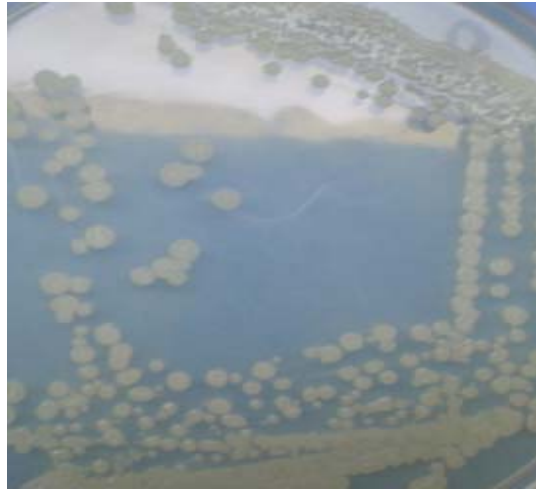


Figura 6. Imagen de las colonias que desarrolla *P. stutzeri*.



Figura 7. Imagen de las colonias que desarrolla *B. licheniformis*.

Una vez que se realizó la observación de las colonias, se procedió a realizar observaciones al microscopio electrónico y para determinar que las cepas estuvieran puras se realizó la tinción de Gram. En la figura 8 y 9 se muestra la morfología que presentan ambas cepas así como las características que presentan al realizar la tinción.

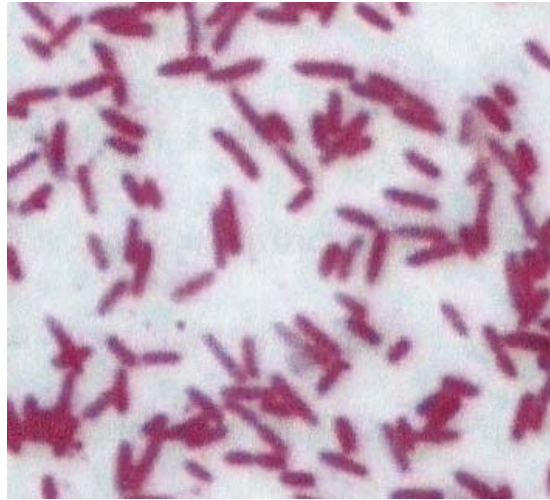


Figura 8. Tinción de Gram de la cepa de *P. stutzeri* vista al microscopio.

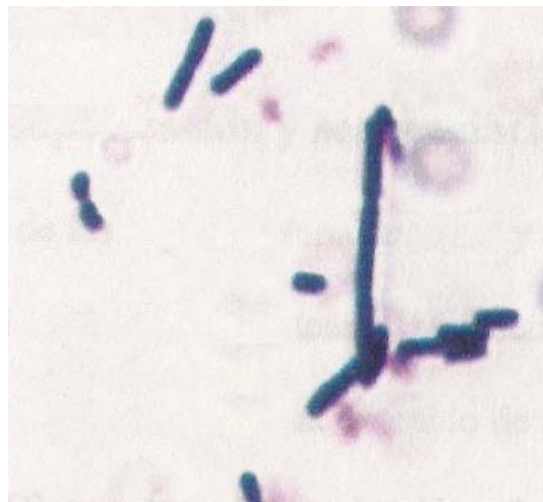


Figura 9. Tinción de gran de la cepa de *B. licheniformis* vista al microscopio.



Figura 10. Imagen en fresco de la cepa de *B. licheniformis* vista al microscopio



Figura 11. Imagen en fresco de la cepa de *P. stutzeri* vista al microscopio

Al realizar las tinciones y las observaciones en el microscopio se concluyó que las cepas eran viables y se encontraban puras, por lo cual pudieron ser empleadas para la realización del proyecto.

Las cepas que crecieron en medio líquido también fueron analizadas al microscopio y se les realizó la tinción de Gram correspondiente. Los microorganismos crecidos en este medio fueron empleados para la preparación de los inóculos.

4.3.2 Manejo de la vinaza

La vinaza se encontraba almacenada a una temperatura de 4 °C para su conservación. En la figura 12 se muestra la apariencia de la vinaza pura.



Figura 12. Imágenes de una muestra de vinaza pura.

Antes de la realización de los experimentos fue necesario realizar una caracterización fisicoquímica de la vinaza con el objetivo de saber bajo qué condiciones se iban a realizar las pruebas de degradación y determinar si los microorganismos serían capaces de soportar esas condiciones. Esta caracterización incluye la medición de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5) por el método respirométrico, Demanda Química de Oxígeno (DQO) por el método titulométrico, pH por el método electroquímico y sólidos presentes en la muestra; los resultados se ilustran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos de la vinaza.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
DBO (g O ₂ /L)	160 ± 7.0
DQO (g O ₂ /L)	120 ± 5.0
pH	4.0 ± 0.5
SST (g/L)	122.0 ± 2.0
SV (g/L)	33.0 ± 1.0
SDT (g/L)	89.0 ± 1.0

Una vez realizadas las determinaciones, se procedió a realizar la 2^a etapa experimental.

5. SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL

5.1 Materiales

- ✚ Cepas: *B. licheniformis* y *P. stutzeri*.
- ✚ Vinaza proveniente del Ingenio Azucarero Independencia, ubicado en Martínez de la Torre, Veracruz.
- ✚ Material de vidrio de laboratorio.

5.2 Equipo

- ✚ Espectrofotómetro con capacidad de medir longitudes de onda de 420-600 nm.
- ✚ Nefelómetro. Klett-Summerson. Photoelectric Colorimeter.
- ✚ Horno con control de temperatura (0-250 °C).
- ✚ Incubadora con control de temperatura. G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Co., Inc. (0-100°C).
- ✚ Balanza analítica digital. Sartorico BL150 (0.01-150 g).
- ✚ Potenciómetro.
- ✚ Autoclave.
- ✚ Campana de flujo laminar.

5.3 Preparación de los inóculos

Después de la activación de las cepas y de la determinación de su pureza, se realizó la preparación de los inóculos. Las cepas fueron incubadas en matraces nefelométricos que contenían una dilución de vinaza al 10 % (v/v) previamente filtrada. Después de la inoculación los matraces fueron incubados a una temperatura de 37 °C con una agitación de 250 r.p.m. para mantener condiciones aerobias durante un tiempo de incubación de 24 horas. Una vez cumplido este tiempo, el cultivo fue empleado para realizar la inoculación de los matraces donde se realizaron las pruebas de biodegradación para cada una de las cepas.

5.4 Evaluación de la actividad biodegradadora

Se realizaron pruebas de biodegradación con la finalidad de determinar si las cepas en estudio tenían la capacidad de degradar la vinaza y establecer las condiciones en las cuales se realizarían los experimentos. La evaluación de la actividad de las cepas se hizo en base a la disminución de la demanda química de oxígeno (DQO).

Se realizaron pruebas de exploración para determinar cual era el pH donde se presentara una mayor disminución de la concentración de la DQO. Se manejaron 3 distintos valores de pH 4, 7 y 10. La concentración de vinaza se fijo en 10 % en base a un trabajo previo con vinaza (Reyes, 2006).

Las pruebas de degradación se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer que contenían únicamente vinaza como fuente de carbono y no fueron adicionados con algún factor que favoreciera en crecimiento de los microorganismos. Los matraces y la vinaza fueron esterilizados previamente a su inoculación. Debido a que no se tenían antecedentes acerca de una concentración adecuada de vinaza para los microorganismos bajo estudio, se manejaron distintas concentraciones en base a un trabajo previo (Reyes, 2006); las concentraciones que se manejaron fueron de 5, 10, 20 %.

Los inóculos se estandarizaron a una concentración de 10^6 UFC/ml, concentración de microorganismos que generalmente se encuentra en un sistema de lodos activados. Se empleó la técnica de cuantificación de microorganismos por turbidimetría (Manual de prácticas de Microbiología General) y se asumió que todas las células eran viables debido a que el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial.

Después de la inoculación los matraces fueron incubados a una temperatura de 37°C y 250 r.p.m. para asegurar una adecuada aireación y condiciones aerobias.

Los matraces se manejaron por duplicado, en condiciones asépticas. El tiempo de la prueba fue de 15 días durante los cuales se tomaron muestras periódicas para la realización de las determinaciones de DQO.

5.5 Análisis y discusión de resultados

5.5.1 Pruebas de exploración a diferentes valores de pH

En las siguientes gráficas se muestran los resultados obtenidos de los experimentos realizados con las cepas de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* a una concentración de vinaza de 10 % (v/v) y valores de pH de 4, 7 y 10.

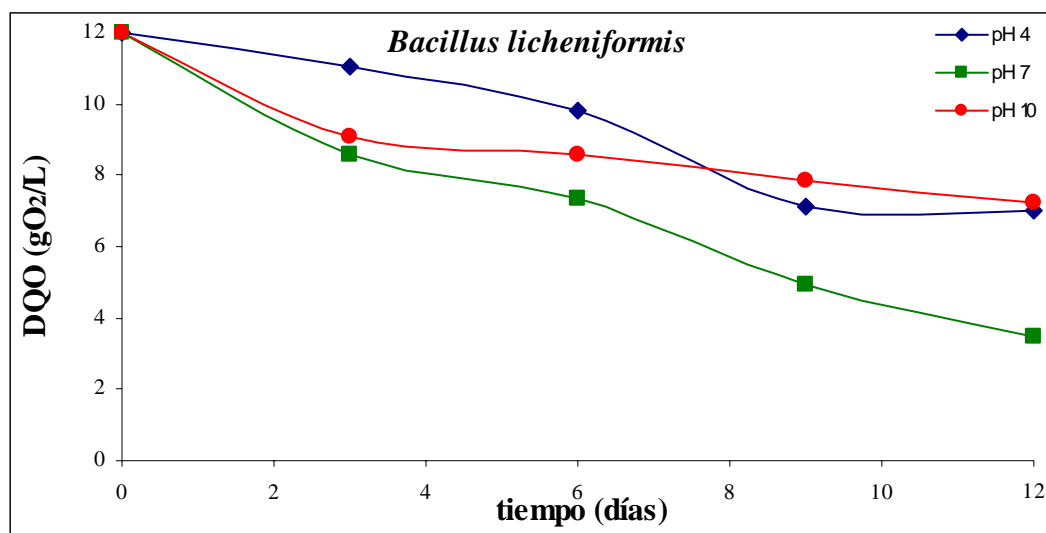


Figura 13. Pruebas de exploración de *B. licheniformis* a diferentes valores de pH y vinaza al 10 %.

Para la cepa de *B. licheniformis* en la figura 13 se observa que hay una disminución en la concentración de DQO en los tres valores de pH que se probaron, sin embargo, hubo una mayor degradación a pH 7, donde la cepa fue capaz de disminuir la concentración inicial de DQO de 12 gO₂/L hasta una concentración final de 3.5 gO₂/L equivalente a un porcentaje de remoción de 71 %. Para el caso donde se trabajó a pH de 4 y 10 se obtuvo un porcentaje de remoción del 42 y 37.5 % respectivamente después de 12 días de prueba.

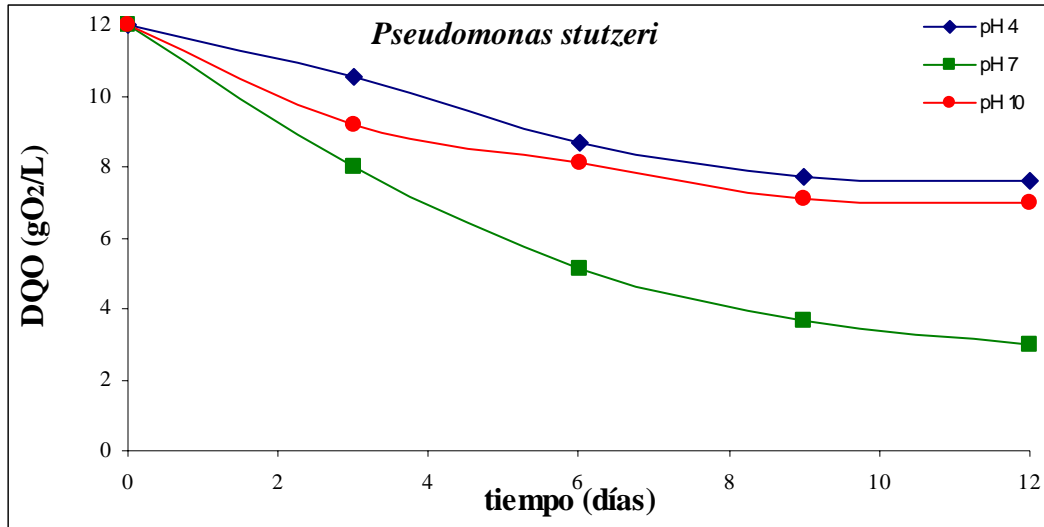


Figura 14. Pruebas de exploración de *B. licheniformis* a diferentes valores de pH.

La cepa de *P. stutzeri* presenta un comportamiento similar a la cepa de *B. licheniformis*. En la figura 14 se observa que hay una disminución en la concentración de DQO en los tres valores de pH, pero hay una mayor disminución a pH7, disminuyendo la concentración inicial de DQO de 12 gO₂/L a una concentración final de 3 gO₂/L, lo que representa el 75 % de remoción de DQO. En las tablas 5 y 6 se presenta un resumen de los resultados obtenidos en los experimentos.

Tabla 5. Resultados de las pruebas a diferentes valores de pH para la cepa de *B. licheniformis*.

<i>Bacillus licheniformis</i>				
pH	DQOi(gO ₂ /L)	DQOf(gO ₂ /L)	Tasa de consumo	% de remoción
4	12	7	5.0	42
7	12	3.5	8.5	71
10	12	7.2	4.8	38

Tabla 6. Resultados de las pruebas a diferentes valores de pH para la cepa de *P. stutzeri*.

<i>Pseudomonas stutzeri</i>				
pH	DQOi(gO ₂ /L)	DQOf(gO ₂ /L)	Tasa de consumo	% de remoción
4	12	7	4.4	37
7	12	3.5	9.0	75
10	12	7.2	5.0	42

El comportamiento de las cepas observado en los resultados es consistente con lo reportado en la bibliografía acerca del pH donde se ve favorecido el desarrollo de estos microorganismos (Crews *et al.*, 1993; Salamanca, 2003).

De acuerdo con los resultados mostrados en las tablas 4 y 5 podemos decir que ambas cepas son capaces de disminuir la concentración de DQO presente en los tres valores de pH, pero cuando se trabaja a un pH de 7 es mayor la disminución de la concentración. En base a estos resultados, el resto de las pruebas se realizó a pH7.

5.5.2 Pruebas de biodegradación empleando diferentes concentraciones de vinaza

En las siguientes gráficas se muestran las cinéticas de degradación de cada una de las cepas a diferentes concentraciones de vinaza para determinar cual es la concentración en la cual se presenta una mayor degradación.

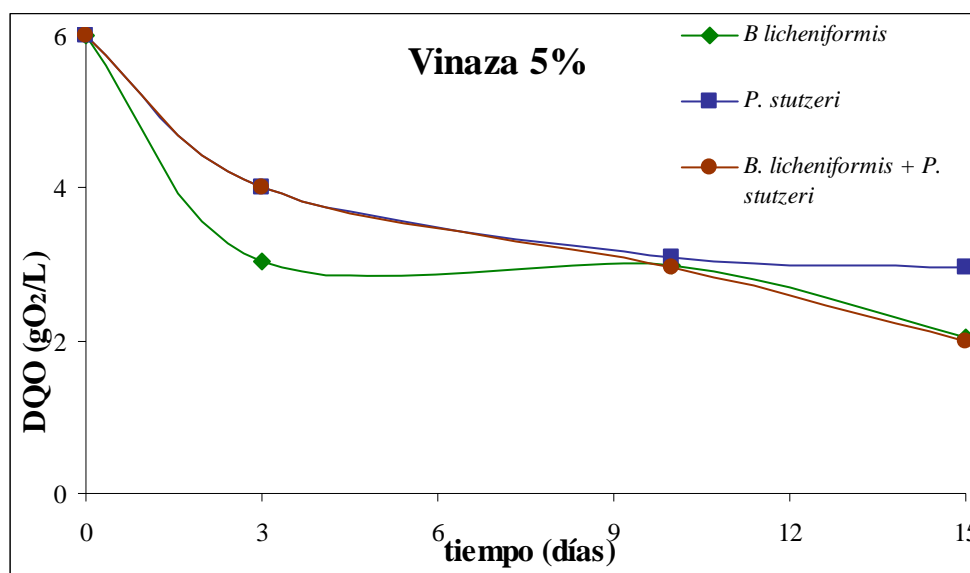


Figura 15. Cinética de degradación de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* empleando vinaza diluida al 5 %.

En la figura 15 se presentan los resultados obtenidos de la degradación de vinaza empleando las cepas de *B. licheniformis*, *P. stutzeri* y de la combinación de ambas cepas empleadas de manera conjunta.

Se observa que durante los primeros 3 días de prueba *B. licheniformis* presenta una mayor degradación, disminuyendo la concentración inicial de DQO de 6 gO₂/L a 3 gO₂/L,

lo que representa el 50 % de la concentración total presente. Al término de la prueba la concentración final alcanzada fue de 2 gO₂/L, esto indica que la mayor degradación se obtuvo durante los primeros tres días de la prueba, ya que después de este tiempo la concentración de DQO solo disminuyó 1 gO₂/L.

P. stutzeri también presenta una mayor degradación en los primeros tres días de la prueba donde disminuyó la concentración de DQO de 6 gO₂/L a 4 gO₂/L, después de este tiempo la concentración de DQO se mantuvo casi constante hasta llegar a una concentración de 3 gO₂/L al final de los 15 días de prueba.

En el cultivo mixto, la actividad que se presenta es muy similar a la de *P. stutzeri* hasta llegar a los 10 días de prueba, después de este punto, la degradación continúa hasta llegar a una concentración final aproximada de 2 gO₂/L, muy semejante a la obtenida por la cepa de *B. licheniformis*.

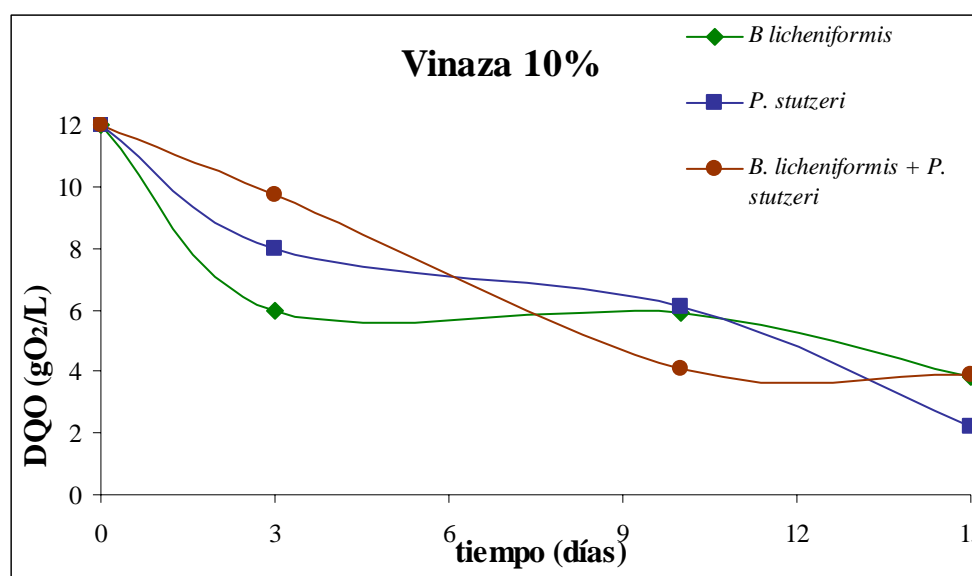


Figura 16. Cinética de degradación de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* empleando vinaza diluida al 10 %.

Los resultados de la degradación de la vinaza diluida al 10 % se muestran en la figura 16, se observa que en el tercer día de prueba, la cepa que presenta una mayor degradación es *B. licheniformis* disminuyendo la concentración de DQO de 12 gO₂/L a 6gO₂/L.

Al llegar al décimo día de prueba, la mezcla de ambas cepas es la que presenta una mayor disminución de la concentración de DQO ($4 \text{ gO}_2/\text{L}$) y con las cepas puras se presenta una degradación similar.

Después del décimo día de prueba, la concentración de DQO tiende a volverse constante y al final de la prueba, la cepa que presenta la mayor disminución de la concentración es *P. stutzeri*.

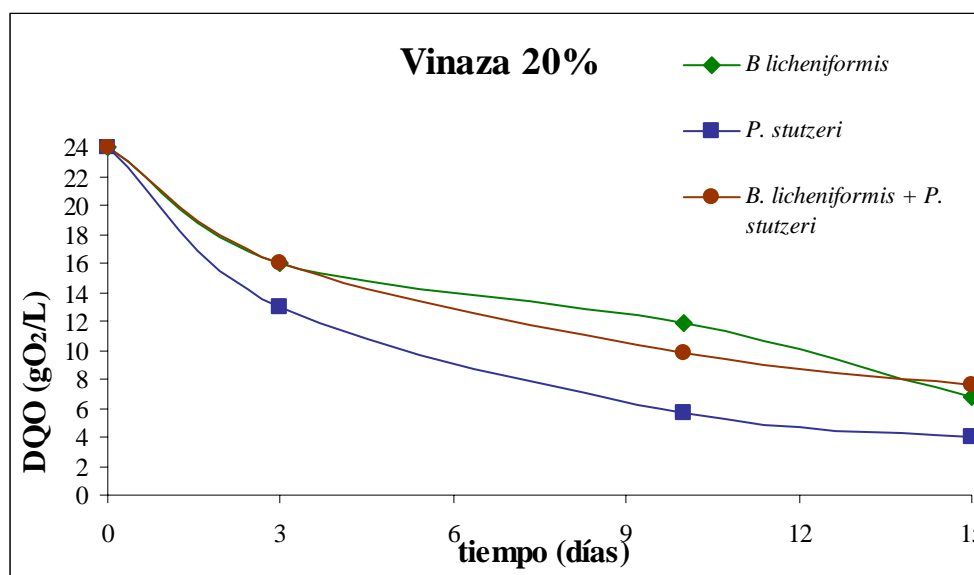


Figura 17. Cinética de degradación de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* empleando vinaza diluida al 20 %.

Cuando se emplea vinaza diluida al 20 %, se observa que la cepa de *P. stutzeri* es la que presenta una mayor degradación y esta tendencia se mantiene durante toda la prueba.

Como se muestra en la figura 17, al llegar al tercer día de prueba, *P. stutzeri* alcanzó una concentración de DQO de $13 \text{ gO}_2/\text{L}$ a partir de una concentración inicial de DQO de $24 \text{ gO}_2/\text{L}$. La cepa de *B. licheniformis* y la mezcla de ambas cepas en este punto presentan la misma concentración de DQO. También se observa que la tendencia de las curvas es muy similar en los tres casos.

En el décimo día de prueba, *P. stutzeri* es la que degradó una mayor cantidad de materia orgánica, seguida de la mezcla de ambas cepas y la que tuvo una menor actividad fue la cepa de *B. licheniformis*.

Al final de la prueba la cepa que tuvo una mayor degradación fue *P. stutzeri* alcanzando una concentración de 4 gO₂/L, la cepa de *B. licheniformis* y la mezcla de ambas cepas tuvieron una concentración final de 6.8 gO₂/L y 7.6 gO₂/L respectivamente. En la tabla 7 se muestra un comparativo de los resultados obtenidos a partir de las pruebas de degradación.

Tabla 7. Resultados obtenidos a partir de las pruebas de degradación a diferentes concentraciones de vinaza.

Tiempo \ [Vinaza]	<i>Bacillus licheniformis</i>			<i>Pseudomonas stutzeri</i>			Mezcla de ambas cepas		
	5%	10%	20%	5%	10%	20%	5%	10%	20%
0	6	12	24	6	12	24	6	12	24
3	3.05	6	16	4	8	13	4	9.7	16
10	3	5.9	11.8	3.1	6.1	5.6	2.95	4.1	9.8
15	2.05	3.8	6.8	2.95	2.2	4	2	3.9	7.6
% de remoción	66	51	67	68	82	68	83	87	84

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 7, se observa que la degradación tiende a aumentar a medida que se aumenta la concentración de vinaza, debido a esto se realizó una prueba empleando una concentración mayor de vinaza (25 %) con el objetivo de determinar si efectivamente el porcentaje de degradación estaba en función de la concentración y establecer cual es la concentración donde se presenta la mayor degradación. Los resultados de la prueba se muestran en la figura 18.

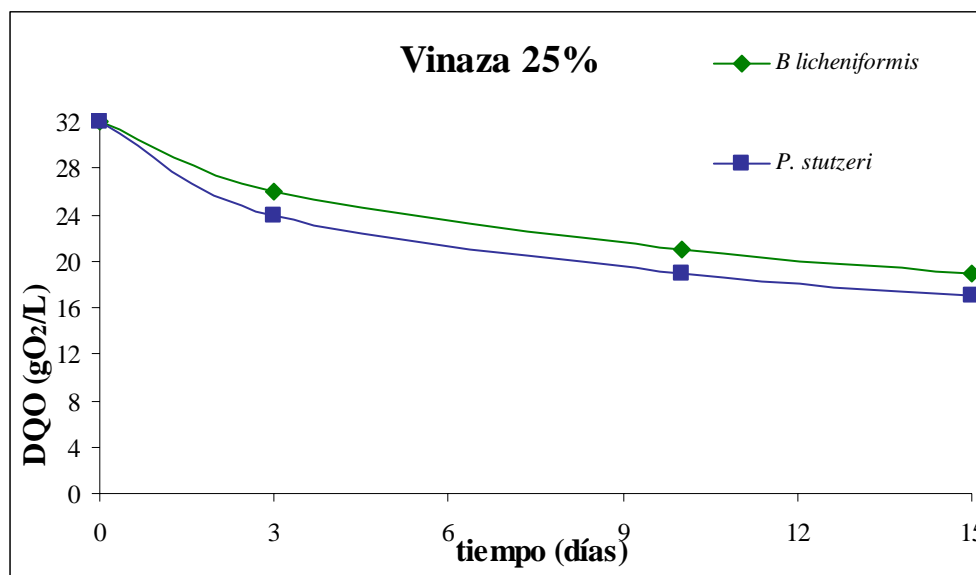


Figura 18. Cinética de degradación de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* empleando vinaza diluida al 25 %.

En la gráfica de la figura 18 se observa que ambas cepas son capaces de degradar la vinaza a esta concentración, sin embargo, ésta es menor comparada con los resultados obtenidos cuando se utilizó la dilución al 20 %. Se observa también que la concentración se mantiene casi constante después del tercer día prueba. En este experimento, únicamente se manejaron las cepas puras.

De los resultados obtenidos en los experimentos, se determinó que hubo una mayor degradación cuando se manejó una concentración de vinaza del 20 %.

Durante las pruebas de degradación a las diferentes concentraciones, el pH del medio tuvo una tendencia a volverse alcalino, esto es, de un valor inicial de 7 llegó a valores de 9 y 10. Esta variación es debida al metabolismo de los microorganismos y este comportamiento es muy similar al que presentan los lodos activados cuando se emplean al tratar vinazas en reactores en lote (Reyes, 2006; García, 2007). En esta etapa experimental, el valor del pH no se controló mediante la adición de ácido para mantenerlo constante, con la finalidad de evitar la contaminación de los matraces.

En base a los resultados obtenidos, se establecieron para iniciar con la tercera etapa experimental, que de acuerdo con la estrategia general de trabajo, se emplearía la cepa que presentara la mayor degradación de materia orgánica, el pH y la concentración de vinaza en la cual las cepas tuvieran una mayor degradación.

6. TERCERA ETAPA EXPERIMENTAL

6.1 Materiales

- ✚ Cepas: *B. licheniformis* y *P. stutzeri*.
- ✚ Vinaza proveniente del Ingenio Azucarero Independencia, ubicado en Martínez de la Torre, Veracruz.
- ✚ Material de vidrio de laboratorio.

6.2 Equipo

- ✚ Biorreactor con capacidad de ser esterilizado en autoclave acoplado a un controlador ADI 1010, unidad de poder ADI 1010 y actuadores.
- ✚ Computadora.
- ✚ Software BioXpert data acquisition & control program.
- ✚ Espectrofotómetro con capacidad de medir longitudes de onda de 420-600 nm.
- ✚ Nefelómetro. Klett-Summerson. Photoelectric Colorimeter.
- ✚ Horno con control de temperatura (0-250 °C).
- ✚ Incubadora con control de temperatura. G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Co., Inc. (0-100°C).
- ✚ Balanza analítica digital. Sartorico BL150 (0.01-150 g).
- ✚ Potenciómetro.
- ✚ Autoclave.
- ✚ Campana de flujo laminar.

6.3 Preparación de los inóculos

Los inóculos se estandarizaron a una concentración de 10^6 UFC/ml, concentración de microorganismos que generalmente se encuentra en un sistema de lodos activados. Se empleó la técnica de cuantificación de microorganismos por turbidimetría (Manual de prácticas de Microbiología General) y se asumió que todas las células eran viables debido a que el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial. Las cepas fueron incubadas en matraces nefelométricos que contenían una dilución de vinaza al 10 % (v/v)

previamente filtrada. Después de la inoculación los matraces fueron incubados a una temperatura de 37 °C con una agitación de 250 r.p.m. para mantener condiciones aerobias durante un tiempo de incubación de 24 horas. Una vez cumplido este tiempo, el cultivo fue empleado para realizar la inoculación del biorreactor donde se realizaron las pruebas de biodegradación.

6.4 Preparación del biorreactor.

En base a los resultados obtenidos en la segunda etapa experimental, se realizó la dilución de la vinaza a una concentración de 20 % (v/v); que fue la concentración a la cual las cepas mostraron una mayor actividad. La dilución fue ajustada a un pH de 7. Éste medio de cultivo fue colocado en el biorreactor para ser esterilizado junto con los accesorios (figura 19) y así evitar una contaminación del mismo.

Una vez esterilizado, el biorreactor se inoculó en condiciones asépticas con la cepa que presento una mayor biodegradación de vinaza (*P. stutzeri*).



Figura 19. Imágenes del biorreactor empleado en las pruebas de biodegradación en la tercera etapa experimental.

6.5 Evaluación de la actividad degradadora bajo condiciones controladas de operación

El biorreactor fue operado de acuerdo a las especificaciones del manual de operación. Mediante el uso del controlador y de los electrodos internos con los que cuenta

se monitoreó el pH, oxígeno disuelto. El valor de pH se mantuvo constante en un valor de 7 mediante la adición de una solución estéril de ácido o base según se requirió. También fue posible controlar la aireación del medio asegurando que tuviera condiciones aerobias todo el tiempo que duró la prueba con un valor de oxígeno disuelto entre 4.35 – 5.24 mgO₂/L y debido a que el biorreactor cuenta con un sistema interno de agitación el medio se mantuvo homogéneo, tanto en concentración de sustrato como en oxigenación; la agitación se mantuvo en 250 r.p.m.; de esta manera se logró tener un control más fino de las condiciones de operación, ya que en los matraces no fue posible controlar el pH debido a que se corría el riesgo de contaminar las muestras; en cuanto al oxígeno disuelto, la adición de oxígeno estaba limitada a la agitación proporcionada por la incubadora.

El biorreactor fue operado durante 15 días, tiempo que fue establecido en base a los resultados obtenidos en la segunda etapa experimental. Durante el tiempo que duró la prueba se tomaron muestras periódicas y se determinó la variación de la concentración de la materia orgánica mediante la medición de la DQO; se realizaron varias pruebas para poner a punto esta prueba y hacer que el experimento fuera reproducible.

6.6 Resultados obtenidos de la prueba en el biorreactor.

Del experimento desarrollado en el biorreactor se obtuvieron los siguientes resultados, los cuales son mostrados en la gráfica de la figura 20.

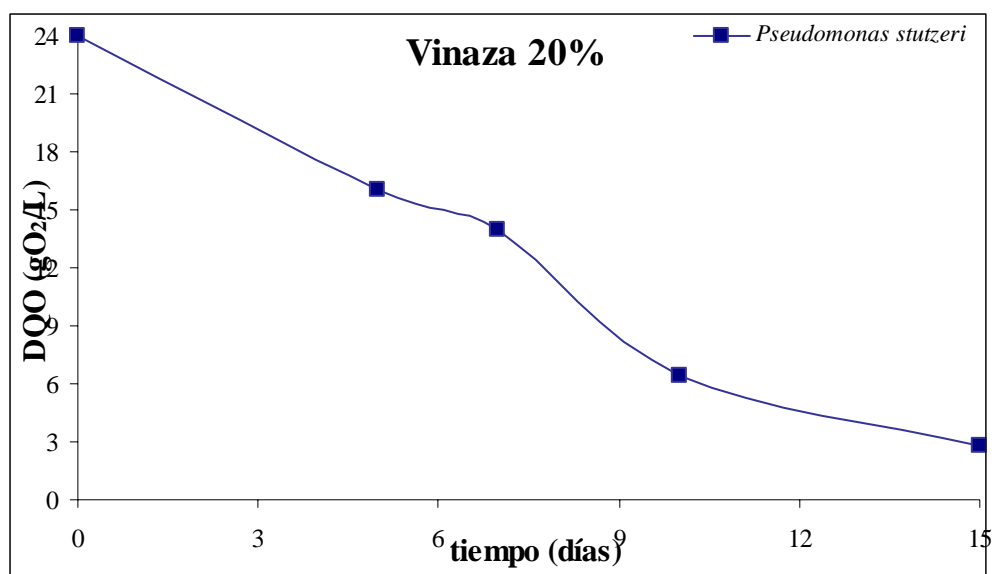


Figura 20. Resultados obtenidos de la prueba realizada en el biorreactor.

De acuerdo con la gráfica, la cepa de *P. stutzeri* fue capaz de disminuir la DQO presente en la vinaza, la cual era inicialmente de 24 gO₂/L hasta alcanzar una concentración final de 2.8 gO₂/L que representa un porcentaje de remoción de aproximadamente el 90%.

Con estos resultados se observa que *P. stutzeri* mejoró su capacidad para degradar la vinaza cuando los experimentos fueron realizados en el reactor, ya que cuando las pruebas fueron realizadas en los matraces se alcanzó un porcentaje de remoción del 80 % y cuando se realizaron en el reactor se alcanzó una remoción del 90 %.

La mejora de la capacidad de las cepas mediante el empleo del biorreactor implica mayores costos para la depuración de la vinaza, lo cual puede limitar el empleo de este microorganismo para el tratamiento de este tipo de aguas residuales y en general, en un sistema de tratamiento aerobio.

Una vez concluida la prueba en el reactor, el agua residual obtenida fue nuevamente esterilizada para realizar las pruebas de toxicidad aguda correspondientes.

7. PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA

7.1 Materiales

- ✚ Semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).
- ✚ Vinaza proveniente del Ingenio Azucarero Independencia, ubicado en el Martínez de la Torre, Veracruz.
- ✚ Agua residual obtenida del proceso de biodegradación en el reactor.
- ✚ Cajas petri.
- ✚ Pipetas de varios volúmenes.
- ✚ Matraces aforados de diferentes volúmenes.

7.2 Equipo

- ✚ Incubadora con control de temperatura. G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Co., Inc. (0-100°C).

7.3 Realización de las pruebas de toxicidad aguda.

En ésta parte del proyecto se evaluó la toxicidad aguda de la vinaza sin tratar y de la vinaza tratada en la tercera parte experimental con el objetivo de determinar el impacto que tienen en el ambiente. Las pruebas se desarrollaron mediante un ensayo de toxicidad aguda empleando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). Este ensayo es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo.

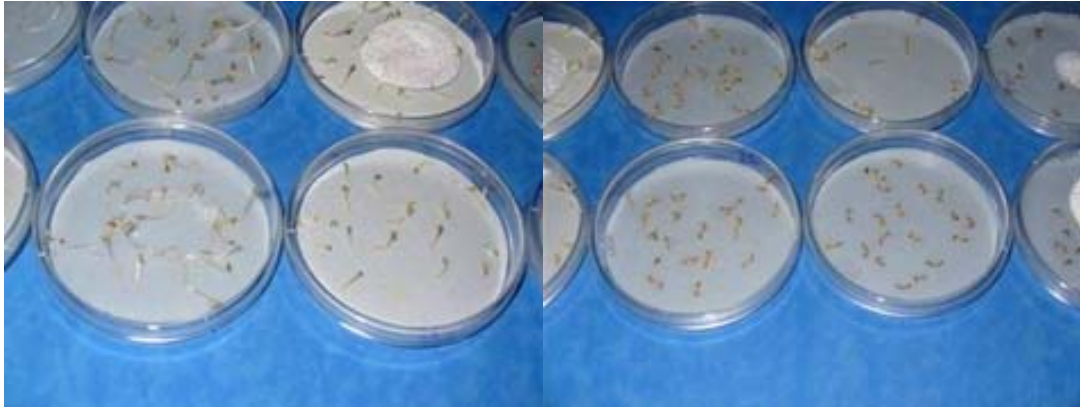


Figura 21. Imagen de las plántulas de lechuga crecidas en cajas petri después de 120 horas.

Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. En la figura 21 se muestra una imagen de las semillas germinadas y en la figura 22 se muestra como debe ser la medición de las plántulas.

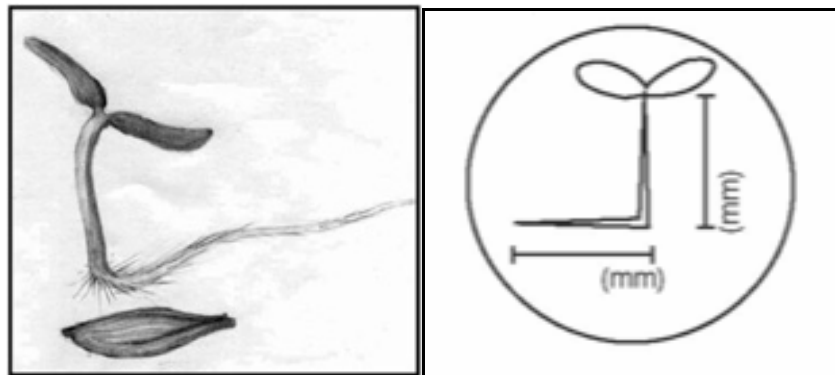


Figura 22. Método de medición de las plántulas de *L. sativa*.

La evaluación del desarrollo de la raíz y del hipocotilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta. En base a la anterior se realizaron las pruebas correspondientes y se obtuvieron los siguientes resultados

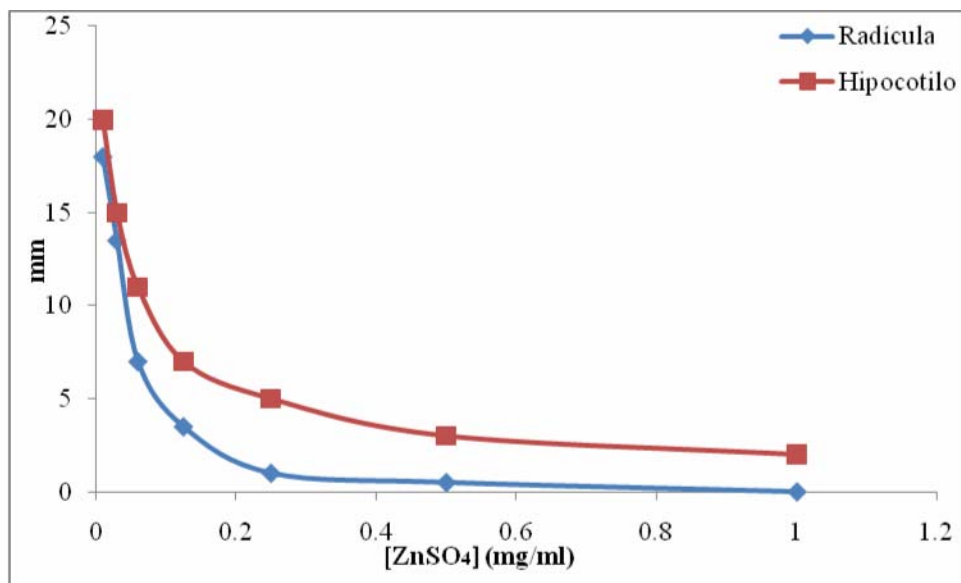


Figura 24. Efecto de la toxicidad del ZnSO₄ empleado como tóxico de referencia.

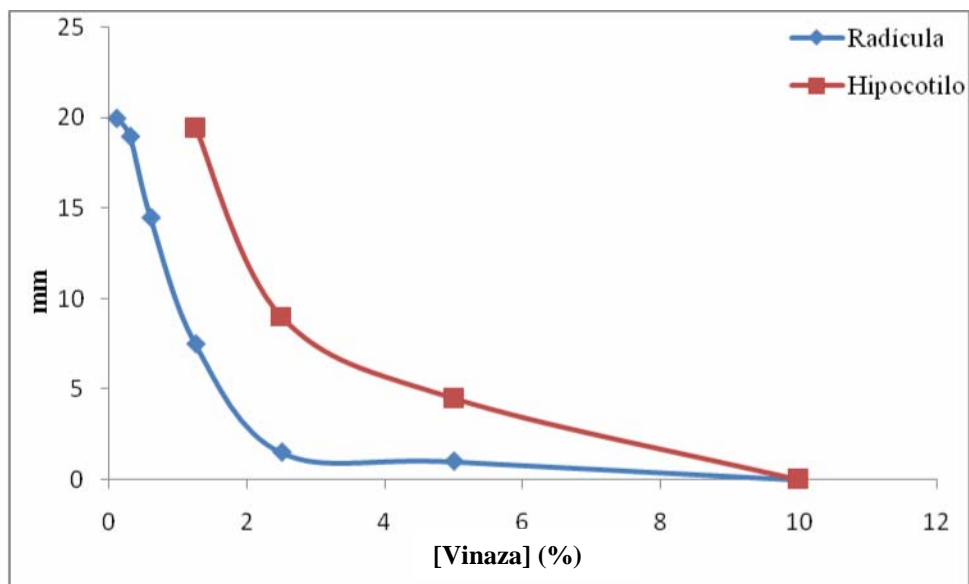


Figura 23. Efecto de la toxicidad de la vinaza sin tratar después de exponer las semillas durante 120 h.

Como se observa en las gráficas de las figuras 22 y 23, el comportamiento de la vinaza y del sulfato de zinc, es muy similar, ya que cuando se emplean concentraciones mayores la inhibición de la germinación de las semillas de lechuga se ve afectada de manera considerable. Además se debe considerar que la vinaza empleada en los ensayos de toxicidad aguda estaba diluida a una concentración del 10 % (v/v), por lo que de haber empleado vinaza pura el efecto pudo haber sido mayor. Este ensayo nos da una idea del impacto que tiene la vinaza cuando se emplea como agua de riego en este tipo de cultivos.

Si bien es cierto que la vinaza se emplea para el riego de campos de caña de azúcar debido a su alta concentración de sales de potasio (Alfaro *et al.*, 1996), sodio y nitrógeno, y que estos cultivos responden de manera positiva a este riego (Gómez *et al.*, 2000), cabe la posibilidad de que la vinaza llegue a los mantos freáticos, como son los ríos cercanos a las plantaciones y contaminarlos, de tal manera que el agua del río empleada para el riego de otros cultivos puede afectarlos de manera negativa; además de que la creciente demanda de alcohol carburante implica una mayor generación de vinaza, es posible que este residuo exceda la demanda como agua de riego en las plantaciones de caña de azúcar.

7.4 Pruebas de toxicidad aguda del agua residual obtenida en la 3ª etapa experimental

Se realizaron pruebas de toxicidad para evaluar la calidad del agua residual obtenida después de las pruebas de degradación en el biorreactor. Estas pruebas se realizaron de la misma manera que para las vinazas sin tratamiento. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo una reducción en la toxicidad presente, es decir, las semillas de lechuga no germinaron después de las 120 horas de exposición. Cabe mencionar que el agua residual obtenida no fue diluida, esto es, se empleo de manera directa.

Como se sabe, los procesos de biodegradación, son el resultado de procesos de digestión, asimilación y metabolización de compuestos orgánicos (Murgel, 1984); pero la utilización de estos compuestos depende de los factores bióticos y abióticos presentes en el ambiente (Atlas *et al.*, 1981), por lo que los resultados obtenidos en esta prueba pueden deberse a que en el medio de cultivo se encontraban fuentes de carbono de fácil asimilación y por esto la cepa de *P. stutzeri* no degradó los compuestos tóxicos presentes y como sabe, este microorganismo tiene una gran versatilidad metabólica y puede adaptarse a diferentes

ambientes (Bennasar *et al.*, 1998; Sikorsky *et al.*, 1999), por lo que la presencia de compuestos fenólicos no afectó su crecimiento y actividad para degradar la materia orgánica presente.

El uso de microorganismos en la depuración de residuos industriales ofrece ventajas sobre técnicas convencionales, ya que éstos son capaces de metabolizar compuestos orgánicos hasta su completa mineralización (Chudoba *et al.*, 1992; Murakami *et al.*, 1989). A pesar de esto, es posible encontrar algunos compuestos químicos que no son fácilmente metabolizados por los microorganismos como fuente de carbono (metales pesados, algunos compuestos clorinados y compuestos tóxicos y en otros casos puede existir la producción de metabolitos tóxicos (Alexander, 1981; García *et al.*, 2001). Por lo anterior y sabiendo que las vinazas contienen metales como zinc, cobre, manganeso y compuestos fenólicos como ácido gálico y vainillinico cabe la posibilidad de que la toxicidad de la vinaza se halla incrementado y por eso no se presento el proceso de germinación en las semillas de lechuga.

Sin embargo, se ha observado que es posible disminuir la toxicidad de las vinazas empleando lodos activados, esto mediante el empleo de columnas empacadas (Peixoto *et al.* 1986). Esto puede deberse a que en los lodos activados existe una gran variedad de microorganismos que favorece la degradación de compuestos, ya que los productos generados por un tipo de microorganismos es el sustrato de otro. En el caso de cepas puras esto no ocurre y es posible que por este motivo la toxicidad de la vinaza no haya disminuido como se esperaría.

CONCLUSIONES

Las cepas de *B. licheniformis* y *P. stutzeri* son capaces de degradar la vinaza. La velocidad y el porcentaje de remoción dependen tanto de la concentración de vinaza como de la cepa empleada.

Se estableció que la cepa que presenta una mayor degradación es el *P. stutzeri* con un porcentaje de remoción de aproximadamente el 90%.

En cuanto a la concentración de vinaza a la cual se presenta una mayor degradación, se estableció que ambas cepas actúan mejor cuando la vinaza tiene una concentración del 20 % (v/v). El pH al cual se obtuvo una mayor degradación fue de 7

Se determinó que la vinaza es tóxica cuando se emplea como agua de riego en hortalizas como la lechuga, ya que al realizar las pruebas de toxicidad aguda con semillas de lechuga, la germinación se vio afectada de manera negativa.

No hubo una disminución de la toxicidad de la vinaza después de ser tratadas con la cepa de *P. stutzeri* ya que al ser empleadas como agua de riego en semillas de lechuga y sin ninguna dilución, no se presentó la germinación de las semillas.

RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos y a las experiencias aprendidas durante el desarrollo del proyecto se hacen las siguientes recomendaciones:

- ✚ Realizar pruebas de adaptación y competencia de las cepas puras mediante el empleo de un sistema de lodos activados con la finalidad de determinar si las cepas son capaces de crecer de manera adecuada en un sistema que presenta una mayor competencia por los sustratos y determinar si la capacidad de degradar la vinaza se mantiene, disminuye o aumenta.
- ✚ Realizar una adaptación previa de los microorganismos con la vinaza con el objetivo de mejorar su tolerancia al pH ácido y de mejorar la velocidad de degradación.
- ✚ Aumentar el tiempo de las pruebas con el objetivo de establecer si las cepas son capaces de disminuir la toxicidad de la vinaza. La base de este punto es que al disminuir los nutrientes, los microorganismos buscar fuentes alternativas de energía.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander M., 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, 211: 132-138.
- Alfaro R. y Alfaro J. 1996. Evaluación de la vinaza como fertilizante potásico en la caña de azúcar y su efecto sobre las propiedades químicas de un suelo de Atenas, Alajuela. Resumen 265. X Congreso Nacional Agronómico / II Congreso de Suelos.
- Altenschmidt U., Eckerskorn C. y Fuchs G. 1990. Evidence that enzymes of a novel aerobic 2-aminobenzoate metabolism in denitrifying *Pseudomonas* are coded on a small plasmid. *Eur. J. Biochem.* 194: 647-653.
- Amador-Rosas M. J., Hernández G. H. y Jacinto M. R. 2005. Efecto de vinazas en agave tequilero en la nutrición y su relación con problemas fitosanitarios. Informe. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 1-5.
- Amaral S., Velloso A. y Costa L. 1999. Lixiviação de Pb, Zn, Cd, e Ni em solo Podzólico Vermelho Amarelo Tratado com Resíduos Siderúrgicos. *Floresta e Ambiente, Seropédica*, v.3, n.1, p.65-75.
- American Public Health (APHA) (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Water Pollution Control Federation (WPCF), American Water Works Association (AWWA).
- Akarsubasi A., Ince O., Kirdar B., Oz N., Orhon D, Curtis T., Head I., Ince B. 2005. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. *Water Res.* 39: 1576 – 1584.
- Atlas R. y Bartha R. 1996. *Microbial Ecology*. Editorial Addison – Wesley Publishing Company. New York, USA.
- Bautista F. 2000. Cambios químicos en el suelo por aplicación de materia orgánica soluble tipo vinaza. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 16(3): 89-101.
- Barbieri P., Arengi F. L. G. Bertoni G., Bolognese F. y Galli E. 2000. Evolution of catabolic pathways and metabolic versatility in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Anton. Van Leeuw Int J G*, 79:135-140.

- Bennasar A., Guasp C., Tesar M., Lalucat j. 1998. Genetic relationship among *Pseudomonas stutzeri* strains based on molecular typing methods. *J. Appl Microbiol Biot.* 85: 643-656.
- Bermúdez R. 1994. Una variante alternativa para la alimentación animal: vinaza de destilería. *Revista Cubana de Veterinaria* 4.
- Bermúdez R. 2000. Evaluación de la disminución de la carga contaminante de la vinaza de destilería por tratamiento anaerobio. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 16(3): 103-107.
- Bolsanello J. y Vieira J. 1980. Caracterização da composição química dos diferentes tipos de vinhaça da região de Campos-RJ. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, v.96, p.45-59.
- Bouwer J. 1992. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. En: *Environmental Microbiology*. Mitchell R. Willey-Liss, Inc. Nueva York E. U. A. pp 287-289
- Bramucci G. y Nagarajan V. 2003. Industrial wastewater bioreactors: sources of novel microorganisms for biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 594-600.
- Cámara Nacional de las Industrias Alcoholera y Azucarera, CNIAA. 2007.
<http://www.camaraazucarera.org.mx>
- Caballero E. y González A. 2006. Aprovechamiento de la vinaza para la producción de biogas y productos de valor agregado. *Jornadas Iberoamericanas sobre Problemas Tecnológicos, Energéticos y Ambientales en las Tecnologías para Biocombustibles a Partir de Caña de Azúcar y otras Fuetes Integradas de Biomasa*. Antigua, Guatemala.
- Camargo O. A., Valadares J. M. y Geraldi R. N. 1983. Características químicas e físicas de solos que receberam vinhaça por longo tempo. *Campinas, Instituto Agrônômico,.. (Boletim Técnico, 76), 30 p.*
- Chará J. y Suárez J. 1993. Utilización de vinaza y jugo de caña como fuente energética en patos pekín alimentados con grano de soya y azolla como fuente proteica. *Livestock Research for Rural Development.* 5: 1 – 6.
- Chudoba P., Capdeville B. y Chuduba J. 1992. Explanation of Biological Meaning of the S_0/X_0 Ratio in Batch Cultivation. *Water Sci Technol.* 26(3/4), 743-751.
- Comisión Nacional del Agua (CNA). 2005. Estadísticas del Agua.
<http://www.cna.gob.mx>

- Cortez L. y Pérez L. 1997. Experiences on vinasse disposal. *Braz. J Chem Eng.* 14: 23-45.
- Crews B., Malachosky E. y Hinman L. D. 1993. The effect of pH on microbial biodegradation of oil-based drilling mud in a slurry-phase bioreactor. *SPE.* 25992: 540-555.
- De Boer A. S. Priest F. y Diderichsen B. 1994. Review: On the industrial use of *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbi Biot.* 40: 595 – 598.
- De Heredia B., Dominguez R. y Partido E. 2005. Physico-chemical treatment for the depuration of wine distillery wastewaters (vinasses). *Water Sci. Technol.* 51: 159-166.
- Decloux M., Bories A., Lewandowski R., Fargues C., Mersad A., Lameloise M. L., Bonnet F., Dherbecourt B. y Osuna L. N. 2002. Interest of electro dialysis to reduce potassium level in vinasses. Preliminary experiments. *Desalination.* 146: 393 – 398.
- Del solar G., Giraldo R., Ruiz-Echeverria M. J., Espinoza M. y Díaz-Orejás R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmid. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(2): 434- 464.
- Dinkla I., Gabor E. y Janssen 2001. Effects on iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3406 – 3412.
- Dunne E., Culleton N., O'Donovan G., Harrington R., Olsen A. 2005. An integrated constructed wetland to treat contaminants and nutrients from dairy farmyard dirty water. *Ecol Eng.* 24: 221-234.
- Esperonello A., Camargo A. P. y Nagal V. 1981. Efeitos do nitrogênio e fósforo como complementação da aplicação de vinhaça em soca de cana de açúcar. En: II Congresso Nacional da STAB. Rio de Janeiro (Brasil) p. 128-139.
- Filho O. J., Bittencourt V. C. y Alves M. C. 1995. Aplicação de vinhaça em solo arenoso do Brasil e poluição do lençol freático com Nitrogênio. *STAB*, v.13, n.6, p.14-16.
- García P. R. J. F. y Moura N. 2001. Metais pesados em solos cultivados com cana de açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. *Floresta e Ambiente* V. 8, n.1, p.120 – 129.
- Ghosh M., Ganguli A. y Tripathi A. K. 2002. Treatment of Anaerobically Digested Distillery Spentwash in a Two-Stage Bioreactor Using *Pseudomonas putida* and *Aeromonas* sp. *Process Biochem.* 37, 857-862.

- Gloria N. A., Jacintho A. D., Gross J. M. M. y Santos R. F. 1974. Composição mineral das tortas de filtro rotativo. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, v.84, n.3, p.37-44.
- Gómez J., 1996. Efecto de la aplicación de vinaza en la producción y calidad de la caña de azúcar. *Caña de Azúcar*. 14: 15 – 34.
- Gómez J. y Rodríguez O. 2000. Efecto de la vinasa en la productividad de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 17: 318-326.
- Green J. y Trett M. W. 1989. The fate and effects of oil in freshwater. Center for Research in Aquatic Biology University of London. Published in Association with The British Petroleum Company P. I. C. Londres y Nueva York, Elsevier Applied Science.
- Grimberg S., Stringfellow W. y Aitken M. 1996. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Appl Environ Microbiol*. 62: 2387 – 2392.
- Gupta S. K. y Singh G. 2007. Biodegradation of distillery spent wash in anaerobic hybrid reactor. *Water Res*. 41: 721-730.
- Jae-Chang C. y Sang-Jung K. 2001. Detection of mega plasmid for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* sp. Strain KS14. *J. Microbiol. Biotechnol*. 3 (4): 503-506.
- Jiménez A. y Martínez G. 1995. Instalación y arranque de un reactor anaerobio en un tren anaerobio – aerobio de una planta piloto de tratamiento de vinazas. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Facultad de Química. UNAM. México, D. F.
- Korndörfer G., Nolla A., Lara W. y Waldo A. R. 2004. Impacto ambiental del uso de la vinaza en la agricultura y su influencia en las características químicas y físicas del suelo Memorias seminario “vinazas, potasio y elementos menores para una agricultura sostenible” Sociedad Colombiana de la Ciencia del suelo, Palmira. Sp.
- Lee C. H., Lewis A., Paszczynski A. y Crawford R. L. 1999. Identification of an extracellular agent (correction of catalyst) of carbon tetrachloride dehalogenation from *Pseudomonas stutzeri* strain KC as pyridine 2,6- bis (thiocarboxylate). *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 261: 562-566.
- Malandra L., Wolfaardt G., Zietsman A. y Viljoen- Bloom M. 2003. Microbiology of a biological contactor for winery wastewater treatment. *Water Res*. 37: 4125 – 4134.

- Marinho M. L., Albuquerque G.A.C. y Araújo Filho J. T. 1982. Efeitos de doses de vinhaça e adubação mineral sobre a cana-soca em dois solos de Alagoas. Brasil Açucareiro, n.2, p.39-50.
- Masahito H., Hirano M. y Tokuda S. 2000. Involvement of two plasmids in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. strain NF100. Appli. Environ. Microbiol. 66: 1737-1740.
- Monteiro H., Peixe C. A. y Stupiello J. P. 1981. Emprego da vinhaca complementada com nitrogênio e fósforo en soqueira de cana de açúcar. Brasil Acucareiro. 97(4) : 7-22.
- Murakami Y. y Alexander M. 1989. Destruction of formation of toxins by one bacterial species affects biodegradation by a second species. Biotechnol. Bioeng. 33: 832-838.
- Murgel S. 1984. Limnología sanitaria. Estudio de la Polución de las Aguas Continentales. SGOEA. Programa regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D. C.
- Nuissier, G., Bourgeois, P. Debois, M. G., Pardon, P. y Lescure, M. H. 2002. Composition of sugarcane waxes in rum factory wastes. Phytochemistry. 61: 721 – 726.
- OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Volume 2. Test 301.
- Pandiyar T., Durán de Bazúa C., Ilangovan K. and Noyola A. 1999. ¹³C NMR Studies on Vinasses Effluent Treated with Iron. Water Res., 33(1), 189-195.
- Peixoto A. A., Berto P. N. A., Thurler A. M., Rocha J. P. S. M. y Delgado F. R. 1986. Efeitos de tratos culturais em cana-soca, em solo argiloso com vinhaça aplicada por caminhão. STAB, v.4, n.6, p.45-50.
- Perez-Garcia M., Romero-Garcia LI., Rodriguez-Cano R. y Sales-Marquez D. 2005. High rate anaerobic thermophilic technologies for distillery wastewater treatment. Water Sci Technol. 51: 191-198.
- Perez-Garcia M., Romero-Garcia LI., Rodriguez-Cano R. y Sales-Marquez D. 2005. Effect of the pH influent conditions in fixed-film reactor for anaerobic thermophilic treatment of wine-distillery wastewater. 51: 183-189.
- Reis A. Lopes Da Silva T. Kent C. Kosseva M. Roseiro J. Hewitt C. 2005. Monitoring populations dynamics of the thermophilic *Bacillus licheniformis* CCMI 1034 in batch and continuous culture using multi – parameter flow cytometry. J Biotech. 115: 199 – 210.

- Reyes E. 2006. Estudio de la actividad enzimática del proceso de biodegradación aerobia de vinazas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química. UNAM, México D. F., México.
- Rivera A., González J., Castro R., Guerrero B. y Nieves G. 2002. Tratamiento de efluentes de destilería en un filtro anaerobio de flujo ascendente. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, La Habana, Cuba.
- Robaina A. A., Vieira J. R., Azeredo D.F., Bolsanello J. y Manhaes M. S. 1984. Doses e complementação mineral da vinhaça em socas de cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, v.102, n.1, p.26-33.
- Rodella A. A y Ferrari S. E. 1977. A composição da vinhaça e efeitos de sua aplicação como fertilizante na cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, v.90, n.1, p.380-389.
- Salamanca S. 2003. Selección de cepas bacterianas y evaluación de su capacidad para biodegradar un inhibidor de hidratación de arcillas empleado en la perforación de pozos de petróleo. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. México, D. F. México.
- Sangave P. y Pandit A. 2006. Ultrasound and enzyme assisted biodegradation of distillery wastewater. J. Environ. Manage. 80: 36-46.
- Sarria P y Preston T. 1992. Reemplazo parcial del jugo de caña con vinaza y uso del grano de soya a cambio de torta en dietas de cerdos de engorde. Research for Rural Development. 4: 30 – 39.
- Sheehan G. y Greenfield P. 1980. Utilization, treatment and disposal of distillery wastewater. J Water Res. 14: 257-277.
- Sikorsky J., R. Roselló-Mora, and M. G. Lorenz. 1999. Analysis of genotypic diversity and relationship among *Pseudomonas stutzeri* strains by PCR-based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis. Syst. Appl. Microbiol. 22: 393-402.
- Summers D. 1996. The biology of plasmid. Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, Blackwell Science Ltd.
- Sobral A. F., Lira L. J. y Guimares V. 1988. Efeito da suplementação mineral da vinhaça na fertilização da cana soca. Brasil Açucareiro 106 (4) : 11- 15.

- Top E. M., Daele P. V., Saeyer N. y Forney L. 1998. Enhancement of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid(2,4 D) degradation in soil by dissemination of catabolic plasmid. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 87-94.
- Van der Meer J. R., De Vos W. M. Harayama S. y Zehnder A. J. B. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotics compounds. *Microbiol Rev.* 56: 677-694.
- Vieille, C., Zeikus, G.C., 2001. Hyperthermophilic enzymes : sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 65, 1-43.
- Vlyssides A. G., Israilides C. J., Loizidou M., Karvouni G. y Mourafeti V. 1997 Electrochemical Treatment of Vinasse from Beet Molasses. *Water Sci. Technol.* 36, 271-278
- Wiggins B. A. y Alexander M. 1998. Role of chemical concentration and second sources in acclimation of microbial communities for degradation. *Appli. Environ. Microbiol.* 54: 2803-2807.

ANEXOS

A-1) DETERMINACIÓN DE DQO POR EL MÉTODO TITRIMÉTRICO

La demanda química de oxígeno (DQO) es ampliamente utilizada como una forma de medir la carga contaminante de desechos domésticos e industriales. El análisis de la DQO se basa en el hecho de que todos los compuestos orgánicos, con algunas excepciones pueden ser oxidados por la acción de un oxidante fuerte bajo condiciones ácidas a dióxido de carbono y agua, sin considerar la biodisponibilidad de las sustancias. Una de sus ventajas es la rapidez con que se obtienen la información (3 hrs.) sin embargo no evalúa si la materia orgánica es biodisponible.

Principio: La muestra es digerida con dicromato de potasio en un medio fuertemente ácido, en presencia de un catalizador a alta temperatura. Después de la digestión, el dicromato remanente es titulado con sulfato ferroso amoniacal. De esta forma se puede conocer la cantidad de dicromato de potasio consumido y por lo tanto la cantidad de materia orgánica oxidada en términos de equivalentes de oxígeno.

Interferencias: Ciertos iones inorgánicos como los cloruros, se oxidan bajo las condiciones de oxidación de la DQO, incrementando el resultado del análisis. Esta interferencia se puede eliminar con la adición de sulfato mercúrico a la muestra antes de la adición de los otros reactivos.

Preservación de muestras: Las muestras se almacenan preferentemente en botellas de vidrio. Cuando no puede llevarse a cabo la determinación, de manera inmediata, acidificándolas a un pH menor o igual a 2 con H_2SO_4 concentrado.

La ventaja de este método, son su economía en el empleo de reactivos, pero si la muestra contiene sólidos, debe homogenizarse para obtener resultados reproducibles.

1. Materiales

Tubos de borosilicato de 20 x 150 mm con cuello roscado y tapa recubierta de teflón.

Equipo de filtración Millipore

Filtros Whatman GF/A de 5 cm de diámetro

Estufa a 150°C

Pipetas volumétricas

Matraces Erlenmeyer de 50 ml

Gradillas

Matraz Kitasato

Guantes de asbesto

2. Soluciones

- **Reactivo de ácido sulfúrico:** Añadir 10.12 g de AgSO_4 , ya sea en cristales o en polvo (grado analítico) por cada litro de H_2SO_4 concentrado, esto da una proporción de 5.5 g $\text{AgSO}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$. Para un garrafón de 3.5 L de H_2SO_4 concentrado se requieren 35.42 g de AgSO_4 . Permitir su disolución de 1 a 2 días a temperatura ambiente.

- **Solución estándar de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0.25 N:** Disolver 12.25 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, previamente secado a 103°C por 2 horas en 1000 mL de agua destilada.

- **Solución indicadora de ferroína:** Disolver 1.485 g de 1, 10 fenantrolina monohidratada y 695 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 80 mL de agua destilada. Aforar a 100 mL. También puede utilizarse el reactivo disponible comercialmente.

- **Solución de FAS** (sulfato ferroso amoniacal) Disolver 39.2 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 600 mL de agua destilada y agregar cuidadosamente 20 mL de H_2SO_4 concentrado enfriar y aforar a 1000 mL con agua destilada. Esta solución tienen una concentración aproximada de 0.1N, su concentración exacta se conoce cuando se titula el blanco frío el cual se corre junto con las muestras.

Procedimiento

Como medida de precaución se recomienda utilizar guantes y lentes de protección cuando se adicionen los reactivos que contienen H_2SO_4 .

1.- Lavar previamente los tubos y tapones a utilizar con H_2SO_4 al 20% para evitar contaminación de las muestras. Para análisis subsecuentes lavar los tubos con agua de la llave y posteriormente con agua destilada, secar perfectamente antes de adicionar los reactivos.

2.- En un tubo de 16 X 150 mm, colocar 5 mL de muestra o de su dilución, adicionar 3 mL de solución de dicromato y con la punta de una espátula una pequeñísima porción de sulfato mercuríco (catalizador).

En los blanco se adiciona agua destilada en lugar de la muestra. Si se desconoce totalmente la DQO de la muestra se prueban diferentes diluciones de 1:100 y 5:100, la dilución más recomendable será aquella que no cambie la coloración del dictromato.

3.- Adicionar cuidadosamente 7 mL del reactivo de ácido sulfúrico, permitiendo que resbale por las paredes internas del tubo. Si es necesario, colocar el tubo en un baño de agua fría para disipar el calor de la reacción.

4.- Cerrar herméticamente los tubos, invertir cada tubo varias veces para mezclar completamente y verificar que no hay fuga. En caso de presentarse fuga preparar otro tubo con la muestra correspondiente.

5.- Colocar los tubos en la estufa precalentada a $150 \pm 2^\circ \text{C}$, para permitir la digestión durante 2 horas.

6.- Preparar tubos adicionales que servirán como blanco frío para conocer la concentración exacta de la solución FAS. Este tubo se prepara simultáneamente a las muestras, pero se mantiene bien tapado a temperatura ambiente.

7.- Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente retirar las tapas y verter su contenido en matraces.

8.- Enjuagar el matraz con un volumen de agua destilada a la muestra y adicionar al matraz.

9.- Agregar dos gotas del indicador de ferroína y titular con la solución FAS agitando constantemente, hasta el vire del indicador de azul – verdoso a café rojizo.

3. Cálculos

Para conocer el valor de DQO total y soluble de una muestra, siga el siguiente ejemplo del cálculo.

FAS (mL) gastados en la titulación:

Blanco caliente: 3mL

Blanco frío: 3 mL

FAS de la muestra: 2.3 mL

Volumen de la muestra: 5 mL

1.- La normalidad de la solución FAS se calcula una vez titulado el blanco frío de la siguiente manera:

$$N_{\text{FAS}} = \frac{\text{mL solución K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \text{ (N K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)}{\text{mL de FAS gastados para titular}}$$

Substituyendo:

$$N_{\text{FAS}} = 3 \text{ mL}(0.25) / 3 = 0.25 \text{ N}$$

2.- La DQO expresada en mg O₂/L se calcula a partir de la siguiente formula:

$$\text{DQO} = \frac{(\text{mL de FAS}_{\text{BC}} - \text{mL FAS}_{\text{muestra}}) (\text{N FAS}) (8) (1000)}{\text{mL de muestra}} \times \text{dilución}$$

Substituyendo:

$$[(3 - 2.3) (0.1) (8) (1000) / 5] \times 10 = 4320 \text{ mg O}_2/\text{L}$$

Donde:

mL de FAS_{muestra} = Volumen de la solución FAS empleando para titular la muestra

mL de FAS_{BC} = Volumen de la solución FAS empleado para titular el blanco caliente

N_{FAS} = Normalidad de la solución FAS obtenida al titular el blanco frío

8 = Equivalentes de oxígeno

1000 = Factor para convertir de mL a litros.

4. Recomendaciones

- Homogenizar la muestra antes de tomar cada alícuota
- Procurar que al adicionar el H₂SO₄ la pérdida de material volátil sea mínima, esto se logra agregando muy despacio el ácido.
- Si al agregar la muestra, el dicromato toma un color verde, descartar este tubo y disminuir el tamaño de la muestra diluyéndola.
- El punto de equivalencia en la titulación será el primer vire de azul – verdoso a café – rojizo, aún cuando el primer color vuelva a aparecer.

A-2) DETERMINACIÓN DE DBO5

Introducción

Este método mide el oxígeno molecular utilizado durante un periodo de incubación especificado, para la degradación bioquímica de material orgánico y el oxígeno usado para oxidar material inorgánico. Esta prueba mide el oxígeno consumido durante el periodo de incubación de 5 días.

Aparatos

a) Envases de incubación: usar envases de vidrio con 300 mL de capacidad con tapón esmerilado y una boca acampanada. Lavar los envases con un detergente, enjuagar lo suficiente con agua destilada y secar antes de usarse. Como precaución para evitar la entrada de aire dentro de la solución dentro del envase durante la incubación use un sello de agua. Se obtiene un sello conveniente si los envases son invertidos en un baño de agua o añadiendo agua a la boca acampanada de los envases especiales para DBO, colocar un papel o un sello plástico en la boca del envase para reducir la evaporación del sello de agua durante la incubación.

b) Incubadora de aire o baño maría, controlado por un termostato a $20 \pm 1^\circ\text{C}$, evite la entrada de luz para prevenir la producción de O_2 por fotosíntesis.

Reactivos

c) Solución buffer de fosfatos: disolver 8.5 g de KH_2PO_4 , 21.75 g K_2HPO_4 , 33.4 g de Na_2HPO_4 y 1.7g de NH_4Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada y posteriormente diluir a 1L. El pH deberá estar en 7.2 sin ajustes. Por otro lado, disuelva 42.5 g de KH_2PO_4 o 54.3g de K_2HPO_4 en aproximadamente 700 mL de agua destilada, ajuste el pH a 7.2 con NaOH al 30 % y aforar a 1L.

d) Solución de sulfato de manganeso, disolver 27.5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y diluya a 1L.

e) Solución de cloruro de calcio, disolver 27.5g de CaCl_2 en agua destilada y aforar a 1L.

- f) Solución de cloruro férrico, disolver 0.25g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y aforar a 1L.
- g) Soluciones ácidas y alcalinas. 1) ácida, lentamente y con agitación agregue 28 mL de ácido sulfúrico concentrado a un contenedor con agua destilada, posteriormente afore a 1L; 2) alcalina, disuelva 40g de hidróxido de sodio en agua destilada y afore a 1L.
- h) Solución de sulfito de sodio, disolver 1.575g de Na_2SO_3 en 1000 mL de agua destilada. Esta es una solución no estable por lo que se debe preparar diariamente.
- i) Inhibidor de nitrificación: 2-cloro-6-(triclorometil) piridina.
- j) Solución de glucosa – ácido glutámico, seque la glucosa grado reactivo y el ácido glutámico grado reactivo a 103°C por 1h, disuelva 150 mg de glucosa y 150 mg de ácido glutámico en agua destilada y afore a 1L, ésta solución debe prepararse en fresco antes de usarse.
- k) Solución de cloruro de amonio, disuelva 1.15g de NH_4Cl en aproximadamente 500 mL de agua destilada, ajuste el pH a 7.2 con la solución de sosa y afore a 1L, ésta solución tiene un contenido de 0.3mg de N por mL.

Procedimiento

- a) *Preparación del agua de dilución.* Coloque el volumen de agua deseado en un vaso de precipitados y añada 1 mL de cada una de las siguientes soluciones: amortiguador de fosfatos, MgSO_4 , CaCl_2 y FeCl_3 , aforar a 1L. Antes de usar el agua de dilución se debe atemperar a $20 \pm 3^\circ\text{C}$, llevara a saturación de oxígeno disuelto por agitación o por aireación con un filtro de aire libre de materia orgánica. De manera alterna, los envases se deben almacenar con un tapón de algodón para asegurar que se mantenga la saturación de O_2 , además todo el material que se use debe estar limpio.
- b) *Verificación de la solución ácido glutámico-glucosa.* Debido a que la prueba de DBO es un bioensayo sus resultados pueden ser influenciados por la presencia de agentes tóxicos o por el uso de una fuente pobre de inóculo, por lo que se debe verificar periódicamente la calidad del agua de dilución, la fuente de inóculo y las técnicas analíticas, realizando medidas de DBO con la solución de ácido glutámico-glucosa.

c) *Inoculación.* 1) Fuente de inóculo. Es necesario tener una población de microorganismos capaz de oxidar la materia orgánica biodegradable en la muestra. Una fuente preferida de inóculo es un efluente de un sistema de tratamiento biológico de aguas residuales, también se puede desarrollar un inóculo adaptado en el laboratorio aireando una muestra de aguas residuales a la que se le va añadiendo diariamente una muestra del agua residual a analizar. 2) Control del inóculo. Determine el valor de DBO del material de inóculo, así como de cualquier otra muestra, este es el valor del control de inóculo. Del valor de control del inóculo y del valor conocido del material de dilución del inóculo, determine la toma de OD del inóculo.

d) *Determinación del OD inicial.* Si la muestra contiene material que reacciona rápidamente con el OD, determinar el OD inmediatamente después de llenar los frascos. Si la toma de OD inicial es insignificante, el periodo de tiempo para la medición del OD, a partir de la preparación de la muestra, no debe exceder de 30 minutos.

e) *Blanco del agua de dilución.* Usar un blanco del agua de dilución para verificar su calidad sin la adición de inóculo, así como para verificar la limpieza de los frascos. Determinar el OD inicial y final, la diferencia no debe exceder de 0.2mgL^{-1} .

f) *Incubación.* Incubar los frascos a 20°C , en oscuridad.

g) *Determinación del OD final.* Después de 5 días de incubación determinar el OD en todas las muestras.

Cálculos

Para cada frasco de prueba es preferible medir una disminución de 2.0mgL^{-1} de OD y una cantidad residual de 1.0mgL^{-1} de OD. La cantidad de DBO_5 se calcula de la siguiente manera.

$$\text{DBO}_5 (\text{mg/L}) = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2)}{P}$$

Donde D_1 = OD de la muestra diluida inmediatamente después de la preparación; D_2 = OD de la muestra después de los 5 días de incubación; P = fracción decimal del volumen de la muestra usado; B_1 = OD del control de inóculo antes de la incubación; B_2 = OD del control del inóculo después del periodo de incubación.

Con el uso de los biofiltros se pretende que los microorganismos se encuentren mejor adaptados al estar adheridos a una biopelícula y con velocidades de biodegradación mayores a las encontradas en los reactores por lote.

A-3) ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE LECHUGA

Principio

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición) en la que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (figura 1). Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es relevante para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocotilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.

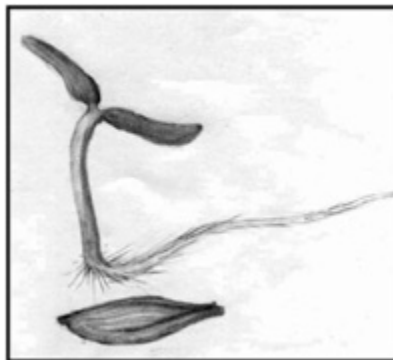


Figura 1. Morfología de la semilla y la plántula de lechuga.

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, pero que sin embargo pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocotilo constituyen indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación. Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas (Bowers *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 1989; Dutka, 1989). A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pretratamiento, además de simplificar el procedimiento de prueba.

Si bien *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación, por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días.

Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de pesticidas sobre especies no blanco necesarios para el registro de pesticidas (OECD, 1984; Wang, W. 1987; US EPA, 1989; Boutin *et al.*, 1993).

En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, en particular en la aplicación a muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reúso de biosólidos.

Reactivos y materiales

- Material biológico: semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L var. mantecosa).
- Agua dura reconstituida (APHA, 1992). Para su preparación se recomienda utilizar reactivos Grado ACS y agua destilada en vidrio o *Millipore Supera Q*.

- Cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro.
- Papel de filtro Whatman núm. 3 (o equivalente), 90 mm de diámetro. El papel de filtro que se seleccione como sustrato de germinación debe tener las siguientes características:
 - Trama amplia y porosa que asegure una buena capacidad de retención de líquido.
 - Resistencia de la fibra del papel para que las radículas crezcan por su superficie sin atravesarlo, situación que dificultaría la remoción de las plántulas sin dañarlas.
 - Ausencia de residuos tóxicos (ej. blanqueadores).
 - Que no promueva el desarrollo de hongos (no asociados a las semillas).
- Matraces aforados de 50 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- Regla u otro elemento de medición.
- Pinzas.
- Toallas de papel.
- Bolsas plásticas.
- Cámara oscura termostatzada (22 ± 2 °C).

Obtención, control y conservación de las semillas

La obtención de semillas de lechuga (*L. sativa* L var. mantecosa) se realiza en semilleras locales, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocotilo. Los criterios de control del material biológico y del desarrollo de la prueba se describen en el capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos".

Las semillas seleccionadas se almacenan fraccionadas a 4 °C, en oscuridad y en ambiente seco. Conservadas en estas condiciones mantienen su vigor al menos durante dos años. Un indicador de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas es la reducción en el poder germinativo y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocotilo en el control negativo (ver también capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos"). En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas.

Procedimiento para el desarrollo de la prueba

Preparación de las diluciones

Para realizar una curva dosis-respuesta se recomienda preparar un mínimo de cinco o seis diluciones de la muestra o compuesto a estudiar, de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para las muestras ambientales se recomienda el uso de un factor de dilución de 0,3 o 0,5 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones. El uso de un factor de 0,3 permite evaluar la toxicidad considerando el intervalo entre el 100 y 1% de la muestra realizando cinco diluciones (100, 30, 10, 3 y 1%). Al aplicar un factor de dilución de 0,5, es necesario utilizar mayor número de diluciones para abarcar el mismo intervalo de concentraciones (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1,5%), pero se obtiene mayor precisión en los resultados. Para la preparación de cada dilución se utiliza agua dura reconstituida (es posible el uso de agua mineral dura para consumo humano), realizando el control negativo con el agua de dilución empleada.

Para el caso de las muestras cuya toxicidad es desconocida, previo a la realización de la prueba definitiva, se sugiere hacer una prueba presuntiva (ensayo preliminar) utilizando diluciones logarítmicas (100; 10; 1; 0,1; 0,01) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0% necesarios para calcular la CI50.

Con el fin de controlar la sensibilidad de las semillas, simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de una muestra debe realizarse un control positivo, utilizando, por ejemplo, una sal de Zn (II) como tóxico de referencia. La concentración de prueba de este control es la correspondiente a la CI50 para el lote de semillas en uso (ver capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos").

Protocolo de ensayo

En la figura 4.4.2 y tabla 4.4.1 se resume el procedimiento del ensayo de toxicidad aguda con semillas:

- Colocar en cada cápsula de Petri un disco de papel de filtro.
- Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.

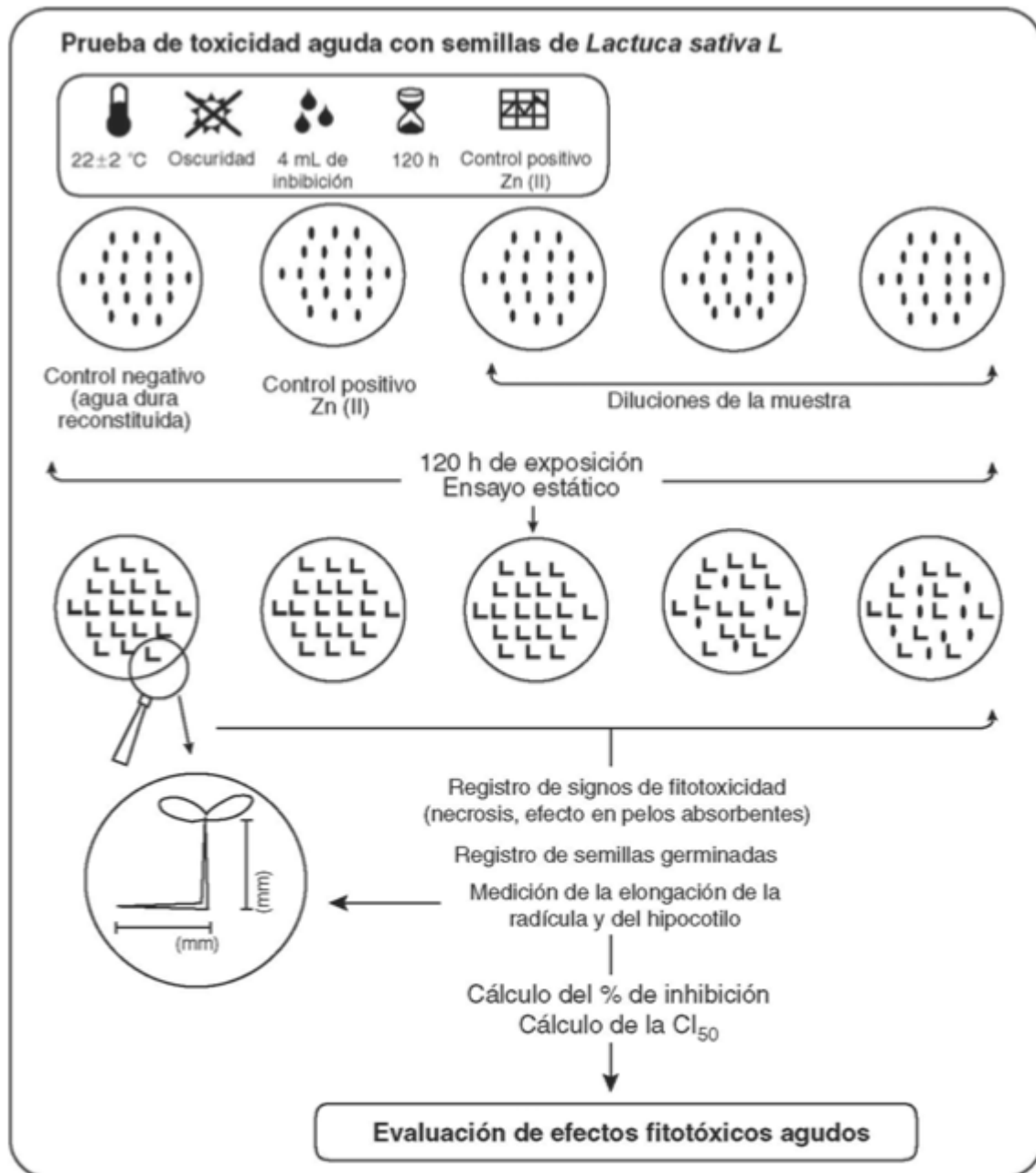


Figura 2. Esquema general del procedimiento de prueba de toxicidad con semillas.

Resumen de las condiciones recomendadas para las pruebas de toxicidad con *Lactuca sativa* L.

- | | |
|----------------------------------|-------------------------|
| 1 Tipo de ensayo | Eslático |
| 2 Temperatura | 22± 2 °C |
| 3 Calidad de luz | Oscuridad |
| 4 Volumen de solución de prueba | 4 mL |
| 5 Agua de dilución | Agua dura reconstituida |
| 6 Número de semillas por réplica | Veinte |

7	Número de rélicas	Tres
8	Duración de la prueba	120 h
9	Efecto medido	Inhibición en elongación de la radícula e hipocotilo. Inhibición en la germinación
10	Resultado final	CE50 o CI50 0% inhibición
11	Aceptabilidad de los resultados	Germinación > 90% Control positivo y negativo de acuerdo con los valores admitidos en las cartas control
12	Control positivo	Zn (II)

- Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.

- Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri deben cubrirse de la luz inmediatamente después de colocarlas en las cápsulas y durante el periodo de ensayo. Incubar durante 120 h (cinco días) a una temperatura de 22 ± 2 °C. Realizar repeticiones para cada dilución ensayada.

Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad

Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra.

Terminado el periodo de exposición (120 h), se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocotilo.

Efecto en la germinación

Registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

Efecto en la elongación de la radícula e hipocotilo

Utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocotilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración de tóxico o dilución de muestra y a los controles. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocotilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocotilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones (figura 3). La figura 4 muestra los distintos estadios de la semilla durante la prueba de germinación y elongación.

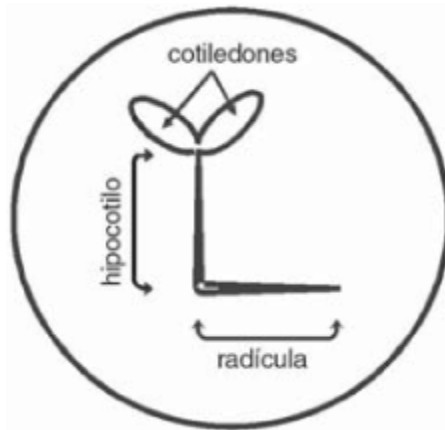


Figura 3. Esquema de plántula de *L. sativa* al finalizar el periodo de exposición.

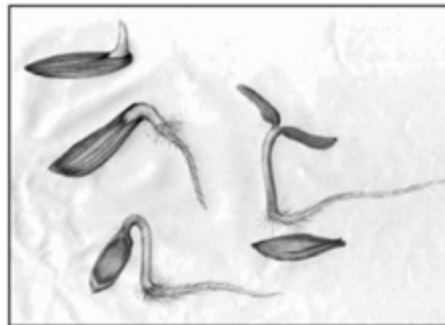


Figura 4. Estadios por los que atraviesa la semilla durante el ensayo de germinación y elongación.

Antes de retirar las plántulas de las cápsulas de Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etcétera). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación, consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocotilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.

Un procedimiento factible de realizar para facilitar la medición de la radícula e hipocotilo, es proceder a congelar las cápsulas de Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar el material luego de ser descongelado). De esta manera, las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición. Si se procede a evaluar el efecto sobre las plantas descongeladas es importante proceder de igual manera con todas las réplicas de la prueba. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo. Por otro lado, antes de congelar

el material se debe realizar previamente la observación general de efectos fitotóxicos en las plantas vivas al finalizar el periodo de exposición.

Control de calidad de la prueba

El ensayo deberá repetirse en caso de que los controles presenten:

En el control negativo:

- Porcentaje de germinación inferior al 90%.
- Alta variabilidad en la elongación de la radícula ($CV > 30\%$).

En el control positivo:

- Porcentaje de germinación inferior al 90%.
- Variación de la sensibilidad de las semillas fuera de lo permitido por las cartas control (ver capítulo 6 "Aseguramiento y control de calidad de bioensayos").

Posibles interferencias en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas en los controles

- Toxicidad del sustrato: cuando se reemplaza el papel utilizado por otras marcas más económicas o se utiliza papel de filtro cualitativo en planchas, hay que tener en cuenta los posibles efectos tóxicos del papel. Si se han tenido buenos resultados con una marca o calidad determinada de papel, es conveniente no variar el sustrato de ensayo.
- Suciedad de las cápsulas: si no es posible utilizar material descartable, es importante asegurar un enjuague minucioso del material para evitar la presencia de residuos de detergente u otra solución de limpieza.
- Exceso de agua o de muestra utilizada para embeber el papel; esto determina una baja disponibilidad de oxígeno necesario para el normal desarrollo del proceso de germinación. El papel de filtro utilizado como sustrato de germinación de las semillas debe estar bien mojado, con sobrante de líquido para evitar la desecación, pero en ningún caso las semillas deben quedar sumergidas.
- Déficit hídrico durante el periodo de exposición: se recomienda envolver las cápsulas con una bolsa plástica para evitar que el papel de filtro de las mismas pierda agua durante el ensayo. Si se está experimentando con compuestos volátiles, no deben colocarse en una misma bolsa cápsulas que correspondan a diferentes concentraciones de ensayo. También se puede colocar dentro de la cámara de cultivo un recipiente con agua para generar un ambiente húmedo, reduciendo así la evaporación. Hay que tener en cuenta que la pérdida de humedad de las cápsulas genera una concentración del tóxico cuya toxicidad estamos evaluando y, por lo tanto, las conclusiones a las que arribaremos serán erróneas.

- Exposición a la luz durante el proceso de imbibición: inmediatamente después de colocar las semillas sobre el papel de filtro, se recomienda tapar y envolver las cápsulas de Petri cubriéndolas de la luz (para el caso de semillas fotoblásticas negativas).
- Temperatura de ensayo: las semillas de *L. sativa* expuestas a una temperatura superior (apenas unos grados) a la óptima para la germinación, no germinarán aunque se les coloque posteriormente a temperaturas inferiores (termodormancia o dormancia inducida por la temperatura).

Expresión de los resultados

Se realizan los siguientes cálculos:

- Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas de cada repetición.
- Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocotilo, con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo.
- Porcentaje de inhibición en la germinación.

Elaborar la gráfica dosis-respuesta colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa, la concentración. Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, calcular la concentración que produce el 50% de inhibición (CI50/CE50) para cada punto final evaluado. Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (t *Student*, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto (ver capítulo 5 "Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad").

Interpretación de los resultados

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocotilo son efectos subletales. La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal, siempre y cuando podamos corroborar que finalizada la exposición a una muestra las semillas no germinaron por muerte del embrión, y que no existe simplemente un retraso en el proceso de germinación, manteniéndose la viabilidad de la semilla. Al evaluar la fitotoxicidad de muestras ambientales complejas o con compuestos volátiles, en algunos casos se ha observado que al finalizar el periodo de exposición, la inhibición en la germinación es elevada, pero si se extiende el periodo de ensayo, sin renovar la exposición a la muestra, las semillas comienzan a germinar. La vitalidad de las semillas que no han germinado es posible verificarla mediante la prueba de tetrazolium para viabilidad (Ellis *et al.*, 1985), pudiendo de esta manera asignarle con certeza a la inhibición de la germinación, el valor e importancia de un efecto letal. No obstante esto, la inhibición en la germinación registrada al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad, aunque el efecto en la germinación sea reversible.

Otro aspecto a considerar es el mayor desarrollo en la elongación de la radícula o el hipocotilo en algunas muestras con respecto al control. La exaltación en un punto final u hormesis no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos (ej.: Cu, Zn) a bajas concentraciones produzcan exaltación por ser micronutrientes vegetales, esta respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas. En la aplicación de la prueba con semillas a muestras ambientales, conjuntamente con otros organismos como parte de una batería, se ha detectado en diferentes ocasiones que la exaltación en la respuesta en el hipocotilo y/o radícula se corresponde con toxicidad frente a otros ensayos de la batería.