



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

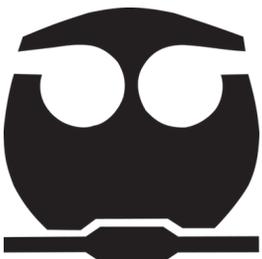
**DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE  
NITRIFICACIÓN Y FORMACIÓN DE QUISTES DE BACTERIAS  
NITRIFICANTES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE  
NITRÓGENO AMONIAICAL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENE EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**ERNESTO DAVID SOLÍS TEJEDA**



**C.D.M.X.**

**2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO.**

**VOCAL: M. EN C. MARTHA GILES GÓMEZ.**

**SECRETARIO: DRA. MARÍA DEL CARMEN URZÚA HERNÁNDEZ.**

**1er. SUPLENTE: QFB ANA MARÍA DEL ROCÍO HERNÁNDEZ DUEÑAS.**

**2º SUPLENTE: DRA. TANYA PLETT TORRES.**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA,  
EDIFICIO A DEPTO. DE BIOLOGÍA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO.**

**SUPERVISOR TECNICO:**

**M. EN C. LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ.**

**SUSTENTANTE (S):**

**ERNESTO DAVID SOLÍS TEJEDA.**

## **Agradecimientos.**

Se hace de manifiesto el apoyo recibido de PAIP Facultad de Química, UNAM, VMLP 5000-9111 (2018-2019) y al Proyecto UNAM DGAPA PAPIIT IT 202818, 2018-2020, para la obtención de materiales y reactivos empleados en el presente trabajo.

A mi H. Jurado.

El más sincero agradecimiento al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, por su confianza, apoyo y asesoría del presente trabajo, además por su tiempo y sabiduría transmitida.

Al M. en C. Luciano Hernández Gómez, por su tiempo, consejos, apoyo técnico y contribución en la realización y revisión del presente trabajo.

A mis profesores de la Facultad de Química, por el aporte de conocimiento que brindaron a mi formación académica.

A la profesora Patricia Bojórquez, por enseñarme el mundo de la Química, por todas sus clases de la secundaria decidí estudiar esta maravillosa carrera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que desde la E.N.P 5 me ha permitido desarrollar mi mente y espíritu a través de las experiencias que he vivido ahí.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<i>Resumen</i> .....	8
<b><i>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</i></b> .....	<b>10</b>
<b><i>CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO</i></b> .....	<b>11</b>
2.1 <i>Ciclo del Nitrógeno</i> .....	11
2.2 <i>Bacterias nitrificantes y su taxonomía</i> .....	15
2.3 <i>Identificación morfológica de las bacterias nitrificantes</i> .....	18
2.4 <i>Aguas residuales</i> .....	20
2.5 <i>Contaminación por compuestos nitrogenados</i> .....	22
2.6 <i>Legislación para los límites permitidos de amonio en aguas</i> .....	23
2.7 <i>Uso de agua residual tratada</i> .....	24
2.8 <i>Muestreo en agua</i> .....	24
2.9 <i>Métodos de cuantificación de amonio</i> .....	26
2.10 <i>Determinación de nitrito (NO<sub>2</sub>)</i> .....	26
2.11 <i>Cinética química</i> .....	27
<b><i>CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO</i></b> .....	<b>30</b>
3.1 <i>Hipótesis</i> .....	30
3.2 <i>Objetivo general</i> .....	30
3.3 <i>Objetivos particulares</i> .....	30
3.4 <i>Estrategia de trabajo</i> .....	31
<b><i>CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS</i></b> .....	<b>32</b>
4.1 <i>Obtención de la muestra de agua residual</i> .....	32
4.2 <i>Preparación del medio de cultivo</i> .....	32
4.3 <i>Obtención de los microorganismos nitrificantes</i> .....	32
4.4 <i>Observación microscópica bacterias nitrificantes</i> .....	33
4.5 <i>Preparación de los matraces de tratamiento</i> .....	33
4.6 <i>Prueba para la determinación de nitritos y nitratos</i> .....	34
4.7 <i>Cuantificación de amonio</i> .....	34
4.8 <i>Observación de formación de quistes nitrificantes</i> .....	34
<b><i>CAPÍTULO 5. DISEÑO EXPERIMENTAL</i></b> .....	<b>35</b>
5.1 <i>Obtención del inóculo y acondicionamiento</i> .....	35
5.2 <i>Mantenimiento de los microorganismos nitrificantes</i> .....	35

5.3 Preparación de los matraces nitrificantes y observación de quistes nitrogenados.	37
5.4 Utilización de nitrógeno amoniacal. ....	37
<b>CAPÍTULO 6. Resultados y discusión.....</b>	<b>38</b>
6.1 Resultados de la obtención del inóculo y acondicionamiento de los microorganismos nitrificantes. ....	38
6.2 Resultados de la formación de quistes bacterianos.....	38
6.3 Resultados de la prueba reducción de nitritos y cinética de reacción. ....	44
<b>Conclusiones y perspectivas. ....</b>	<b>49</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO 7. Anexos. ....</b>	<b>53</b>
7.1 Medio enriquecido.....	53
7.2 Medios líquidos.....	53
7.3 Tinción de Neisser.....	54
7.4 Cuantificación de nitrato. ....	55
7.5 Tabla resultados en la cuantificación de nitrato. ....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1. El ciclo del nitrógeno.</b> .....	<b>12</b>
<b>Figura 2. La nitrogenasa.</b> .....	<b>13</b>
<b>Figura 3. Oxidación del amonio.</b> .....	<b>14</b>
<b>Figura 4. Reacción de desnitrificación.</b> .....	<b>15</b>
<b>Figura 5. Quistes de Nitrobacter sp.</b> .....	<b>17</b>
<b>Figura 6. Quistes de Nitrobacter tinción Sudan IV.</b> .....	<b>18</b>
<b>Figura 7. Tinción de Neisser.</b> .....	<b>19</b>
<b>Figura 8. Aguas residuales.</b> .....	<b>22</b>
<b>Figura 9. Prueba de Griess.</b> .....	<b>27</b>
<b>Figura 10. Reacción de orden cero.</b> .....	<b>28</b>
<b>Figura 11. Reacción de primer orden.</b> .....	<b>29</b>
<b>Figura 12 Diagrama de flujo.</b> .....	<b>31</b>
<b>Figura 13. Medios de cultivo líquidos.</b> .....	<b>36</b>
<b>Figura 14. Tinción de Gram.</b> .....	<b>39</b>
<b>Figura 15. Tinción Azul de metileno.</b> .....	<b>40</b>
<b>Figura 16. Tinción Azul de metileno.</b> .....	<b>41</b>
<b>Figura 17. Tinción de Neisser.</b> .....	<b>42</b>
<b>Figura 18. Tinción de Neisser.</b> .....	<b>42</b>
<b>Figura 19. Tinción de Neisser.</b> .....	<b>43</b>
<b>Figura 20. Prueba de Griess.</b> .....	<b>44</b>
<b>Figura 21. Gráfica formación de nitrato.</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura 22. Gráfica concentración 160mg/L.</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura 23. Gráfica concentración 240mg/L.</b> .....	<b>47</b>
<b>Figura 24. Gráfico curva patrón 10-40 mg/L.</b> .....	<b>57</b>
<b>Figura 25. Gráfico curva patrón 100-450 mg/L.</b> .....	<b>58</b>

## ÍNDICE DE TABLAS.

<i>Tabla 1. Intervalo de concentración permitido en la NOM-001-SEMARNAT-1996 para la descarga de nitrógeno total en cuerpos receptores tipo embalse para riego agrícola, que es de 40 mg/L. ....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 2 Condiciones de operación para los matraces Erlenmeyer.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 3 Concentraciones y formación de quistes.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 4 Parámetros cinéticos del análisis cinético de los resultados experimentales de orden cero. ....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 5. Datos para curva patrón de NaNO<sub>3</sub>.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 6. Datos curva patrón.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 7. Valores promedio de la cuarta etapa experimental para la concentración inicial de 40 mg de amonio.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 8. Valores promedio de la cuarta etapa experimental para la concentración inicial de 167 mg de amonio.....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 9. Valores promedio de la cuarta etapa experimental para la concentración de 275 mg de amonio.....</i>	<i>60</i>

## Resumen

Uno de los problemas de contaminación de los cuerpos de agua que se presentan en México es la descarga de aguas residuales, ya que se estima que más del 60% de ellos presentan algún tipo de contaminante, siendo los compuestos nitrogenados los de mayor presencia en agua residuales, los cuales están asociados a las actividades humanas como agrícolas, desechos domésticos e industriales, lo que limita el uso del abastecimiento de agua, que afecta directamente el consumo humano y recreativo.

La eliminación del nitrógeno se efectúa con ayuda de microorganismos, se requiere de dos procesos: primero, el de nitrificación, donde se lleva a cabo la transformación de amonio a nitrato, segundo, el de desnitrificación, en el cual el nitrato será transformado a nitrógeno molecular, mismo que acaba incorporándose a la atmósfera. En este trabajo, se abordó el primer paso, la nitrificación, proceso que a su vez consiste en dos etapas: la nitrificación (formación de nitritos) y la nitratación (formación de nitratos).

El objetivo de este trabajo consistió en la determinación de la velocidad de transformación de nitrógeno amoniacal a nitratos, empleando medios experimentales (MCE) con las concentraciones de 40, 160, 240 mg de sulfato de amonio por litro.

A partir de la muestra de agua residual, obtenida de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria (PTARCU), se llevó a cabo la preselección de los microorganismos nitrificantes. Para ello, se incrementó el contenido de amonio mediante la adición de una solución de sulfato de amonio a una concentración de 100 mg/L, esto permitió a los microorganismos acondicionarse, para una mejor utilización de amonio. Posteriormente, se inocularon en los medios líquidos *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* B (Ronald, 2010) esto sirvió para el mantenimiento de los microorganismos nitrificantes. Una vez acondicionados y asegurándonos de su mantenimiento en los medios se prosiguió a la preparación de los matraces nitrificantes (MN).

Para la preparación y posterior trabajo de los matraces nitrificantes se mantuvieron condiciones controladas de luz, pH, agitación y aireación permitiéndonos simular las

condiciones del PTARCU. Para corroborar la utilización del amonio, se realizaron tinciones de Gram, Azul de metileno y Neisser con el fin de corroborar la formación de los quistes y se cuantificaron las concentraciones de nitrato formado. También se apoyó de la prueba de Griess para evidenciar cualitativamente el proceso de nitrificación, esto permitió la obtención de los resultados del trabajo.

Los matraces nitrificantes se trabajaron por duplicado, a tres concentraciones diferentes de sulfato de amonio. Los valores empleados se determinaron a partir de considerar la concentración máxima permisible establecida en la NOM-001-SEMARNAT-1996 para la descarga de nitrógeno total en cuerpos receptores tipo embalse para riego agrícola, que es de 40 mg/L, la concentración sugerida en el trabajo de Tesis de Benjamín Segura de 160 mg/L y la concentración propuesta de trabajo que fue seis veces mayor a lo establecido en la NOM-001-SEMARNAT-1996 de 240 mg/L.

El monitoreo del experimento se realizó en un lapso de 20 días, con lecturas diarias. De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo apreciar el aumento de nitratos que fue cercano a la concentración inicial de amonio, es decir, prácticamente su transformación total, los resultados ayudaron para obtener la velocidad de reacción, la formación de quistes.

Con las observaciones obtenidas del microscopio se percató que la mejor concentración de sulfato de amonio para la formación de quistes bacterianos nitrificantes fue de 160 mg/L permitiendo seleccionar esta concentración para la utilización de los resultados. Las velocidades específicas de formación de nitrato que se determinaron, a las tres concentraciones experimentales, fueron; 1.42 mg/Ld; 13.9 mg/Ld; 19.8 mg/Ld, respectivamente. Los resultados permitieron concluir que el acondicionamiento de los microorganismos empleando sulfato de amonio mejoró la remoción de sustrato y se confirmó que la concentración inicial de nitrógeno amoniacal influye en la velocidad específica de nitrificación y consecuentemente en la formación de quistes nitrificantes.

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el estudio de la calidad del agua es prioritario, pues la solución de la contaminación acuática propicia al desarrollo de tecnologías encaminadas a la remoción de contaminantes en el agua. Entre ellas, las tecnologías de tipo biológico, las cuales generan pocos subproductos no deseados, constatando hacia la reutilización de recursos.

El uso de los procesos biológicos para el control de contaminantes nitrogenados presentes en cuerpos de agua es una alternativa que se debe desarrollar y por ello, es de suma importancia contar con datos cinéticos de la reacción de nitrificación.

El nitrógeno existe en varios estados de oxidación (3- a 5+), siendo los compuestos más representativos el amoníaco ( $\text{NH}_3^+$ ) y el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), la presencia de estas variantes en altas concentraciones en aguas residuales genera contaminación y representa una alta cantidad de contaminantes tóxicos para la vida acuática ya sea de manera natural o artificial.

Para la oxidación del amonio se requiere del consumo del oxígeno disuelto en el agua, que al no ser tratada y retirar el amonio oportunamente se corre el riesgo de acelerar el proceso de eutroficación en lagos, lagunas y ríos, conllevando al deterioro fisicoquímico y biológico de los mismos (Chang, 2018).

De ahí que, el propósito de este trabajo es abordar los datos cinéticos de la velocidad de la nitrificación y constatar la presencia o ausencia de quistes nitrificantes, bajo condiciones controladas en el laboratorio.

A continuación, se abordarán los aspectos teóricos importantes del ciclo del nitrógeno, las bacterias nitrificantes, agua residual y su contaminación, proceso biológico de transformación del amonio, las condiciones fisicoquímicas que conlleva la reacción.

## **CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.**

### ***2.1 Ciclo del Nitrógeno.***

El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) representa el 78% en el Planeta Tierra. Sin embargo, sólo un pequeño número de bacterias son capaces de utilizarlo como fuente de energía. El nitrógeno que se recicla en el planeta en su mayor parte se encuentra en forma de amoníaco ( $NH_4^+$ ), y nitrato ( $NO_3^-$ ) (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2017).

La presencia de las diferentes formas de nitrógeno en el planeta las podemos encontrar en el aire, suelo y cuerpos de agua, éste último tienden acumularse con mayor cantidad de productos nitrogenados especialmente el amonio ( $NH_3$ ), debido a las actividades humanas que conlleva a una contaminación por este compuesto. De ahí, que la función vital de las bacterias nitrificantes es la de convertir el  $NH_3$  a  $NO_3^-$  (forma que no es considerada tóxica) compuesto que se almacena generalmente en el suelo (Biohinski, 2000).

El ciclo del nitrógeno tiene una trayectoria definida, es llevado a cabo por medio de una serie de procesos físicos, químicos y biológicos, en la Figura 1 se muestra un esquema del ciclo del nitrógeno. El proceso biológico de algunas bacterias y cianobacterias, el nitrógeno que se encuentra en el planeta puede asimilarse y producir compuestos nitrogenados, que son aprovechados por otros seres vivos. El nitrógeno fijado se transforma en aminoácidos y proteínas, sin embargo, otras bacterias lo liberan a la atmosfera. De esta forma se logra equilibrar el ciclo del nitrógeno (Arana, 2018). Las etapas del ciclo del nitrógeno relevantes para este trabajo se mencionan a continuación.

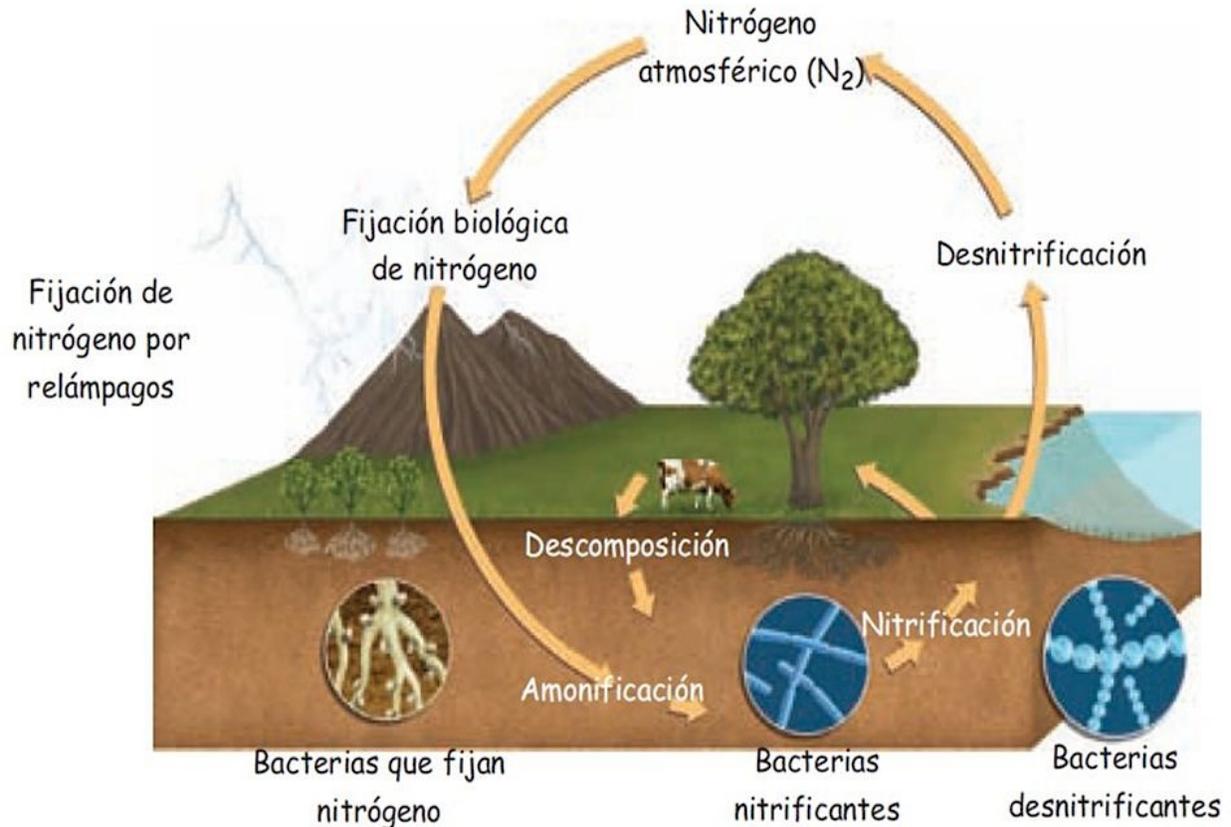


Figura 1. El ciclo del nitrógeno.

Considerado uno de los más complicados, ya que el nitrógeno se encuentra en varias formas y se llevan una serie de procesos en los que el  $N_2$  es tomado del aire, es modificado para ser devuelto a la atmósfera (Arana, 2018).

## 1. Fijación de nitrógeno.

Se denomina fijación de nitrógeno a la utilización del  $N_2$  como fuente del nitrógeno celular, la capacidad de fijar el nitrógeno libera al organismo de la dependencia de otras moléculas nitrogenadas. La fijación del nitrógeno es la reducción del nitrógeno molecular a amoníaco, la reducción es catalizada por un complejo enzimático llamado nitrogenasa, que consta de dos proteínas diferentes: la dinitrogenasa y la dinitrogenasa-reductasa. Debido al triple enlace del nitrógeno, la reducción requiere mucha energía, por tanto, se utilizan seis electrones para reducir el  $N_2$  a  $NH_3$ . Algunos de los organismos fijadores de nitrógeno son: *Azotobacter*, *Azomonas*, *Klebsiella*, *Mycobacterium flavum*, *Clostridium*, *Methanobacter* (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2017).

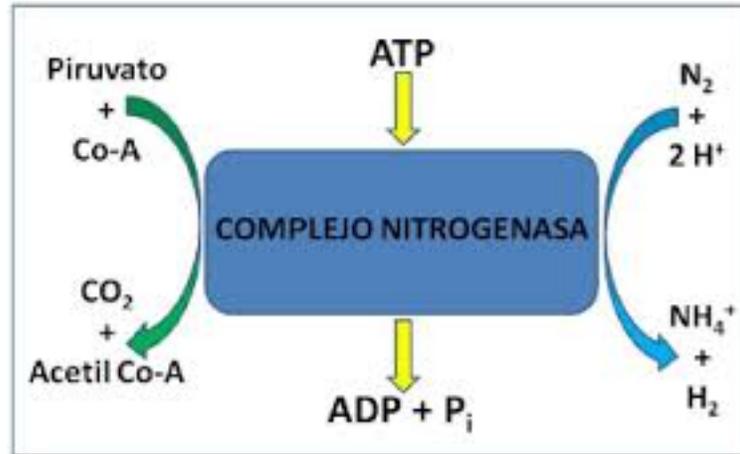


Figura 2. Complejo nitrogenasa.

Tiene como comienzo el uso del piruvato, donde se transfieren electrones, cada uno es asociado a la hidrólisis de ATP, para la posterior liberación de H<sub>2</sub>.

## 2. Nitrificación.

En la nitrificación los compuestos nitrogenados inorgánicos, amonio (NH<sub>3</sub>) y nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) se oxidan de forma aerobia mediante las bacterias nitrificantes (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrosococcus*, *Nitrospina*). Estas bacterias se encuentran distribuidas en suelos y agua. El grupo nitrosificante (*Nitrosomonas*) oxida el amonio a nitrito y el grupo nitrospira (*Nitrobacter*) oxida el nitrito a nitrato. Por lo tanto, la oxidación completa del amoniaco a nitrato (Figura 3), involucra una transferencia de ocho electrones, llevada a cabo por dos grupos de organismos que actúan secuencialmente.

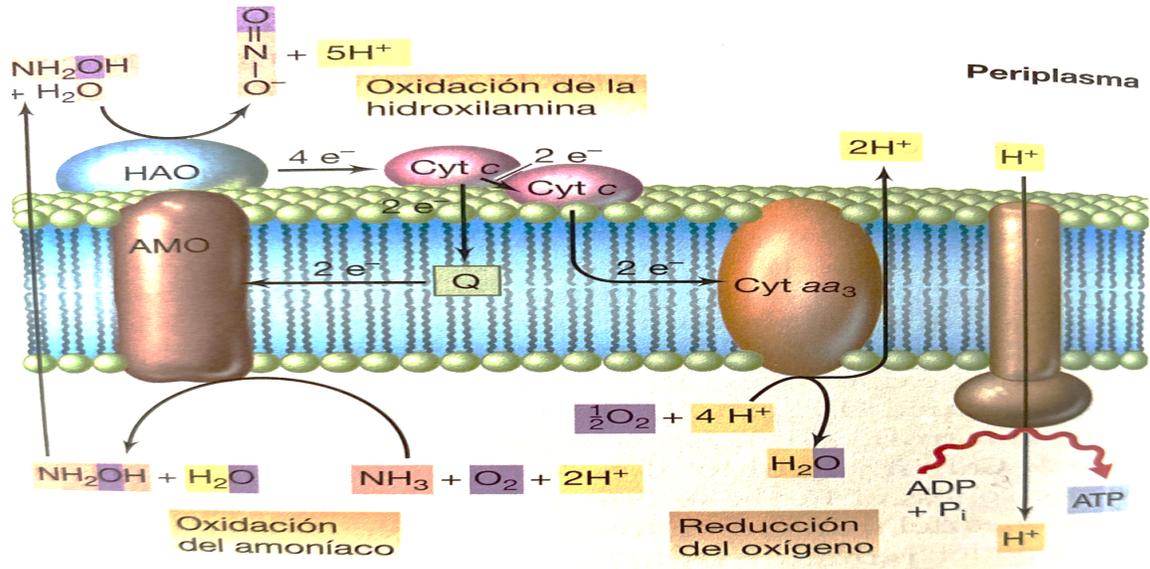


Figura 3. Oxidación del amoníaco y flujo de electrones en bacterias. Se destacan los reactantes y los productos de esta serie de reacciones. El citocromo c en el periplasma es una forma diferente del Cyt que en la membrana.

### 3. Desnitrificación.

La desnitrificación es un proceso de reducción del nitrato a compuestos gaseosos como el nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ), con productos intermedios como monóxido de nitrógeno ( $\text{NO}$ ) y Óxido de nitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}$ ). La desnitrificación ayuda al tratamiento de las aguas residuales, pues, al retirar el nitrato se minimiza el crecimiento de las algas y no genera condiciones anóxicas a los cuerpos acuáticos.

La enzima que inicia el proceso de desnitrificación es la nitrato-reductasa, una enzima situada en la membrana. El primer producto de la reducción es el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) que con ayuda de la nitrito-reductasa reduce el  $\text{NO}_2^-$  a óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) para posteriormente ser reducida por la óxido-nítrico-reductasa a óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) para finalmente ser transformada a nitrógeno molecular por la óxido-nitroso-reductasa. En la figura 4, se puede observar la desnitrificación, llevada a cabo la membrana.

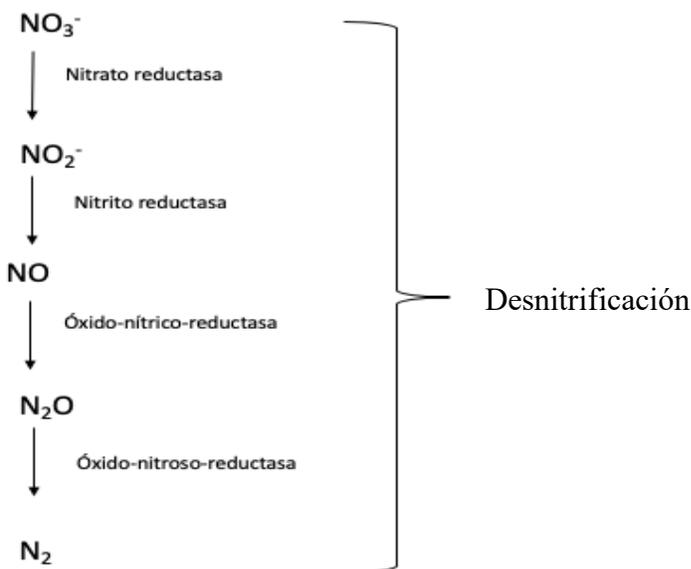


Figura 4. Reacción de desnitrificación. Algunos organismos realizan sólo la primera etapa. Todas las enzimas son reprimidas en condiciones anóxicas.

## 2.2 Bacterias nitrificantes y su taxonomía.

La diversidad morfológica de las bacterias nitrificantes es una de las características de estos microorganismos, ya que pueden ser observados en forma bacilar, vibrios, cocos, espirilos con apariencia de pera alargada, no esporulados. Forman agregados de membrana gelatinosa, pueden ser inmóviles o móviles con flagelos polares, y periféricos. Además, utilizan el amonio y nitrito como fuente de energía, son capaces de crecer sin compuestos orgánicos, en zonas aerobias, se pueden encontrar en suelos, agua dulce o salada (Holt, 1999).

Las bacterias nitrificantes son consideradas de acuerdo con su afinidad tintorial como Gram negativas. Pertenecientes a la Familia Nitrobacteraceae y a su vez se dividen en dos subgrupos; amino-oxidante y Nitro-oxidante. De acuerdo con estudios morfológicos se puede reconocer al género *Nitrobacter* (Holt, 1999), las bacterias aisladas del suelo son principalmente *Nitrosospira* sp. y *Nitrosomonas* sp. (Poth & Focht, 1985).

Las bacterias nitrificantes se colocan en dos subclases de grupo Protobacterias, siendo *Nitrosomonas* europea asignada al grupo beta ( $\beta$ ) y *Nitrobacter* winogradsky al grupo alfa ( $\alpha$ ) (Holt, 1999).

Familia: *Nitrobaetereaceae*

Grupo: Bacterias amino-oxidantes.

Género: *Nitrosomona*.

Grupo: Bacterias amino-oxidantes.

Género: *Nitrobacter*.

*Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp., presentan una morfología generalmente en bacilos, aunque se les puede encontrar en forma de espirilos y cocos, las *Nitrosomonas* miden de 1 a 1.5  $\mu\text{M}$  de largo y 1  $\mu\text{M}$  de ancho, *Nitrobacter* mide de 0.5 a 1  $\mu\text{M}$  de largo y ancho es muy variable que va de 0.5 a 0.7  $\mu\text{M}$  (Huang, Jiang, & Song, 2018).

*Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp. tienden a formar agrupaciones bacterianas que están constituidas por un gran número de células baciliares, características de esta Familia, donde se agregan en microcolonias denominadas quistes. Las células en estos quistes producen sustancias exopoliméricas que protegen a los organismos contra sustancias tóxicas y condiciones cambiantes. Esta propiedad facilita los procesos de decantación y filtración en el tratamiento de aguas de origen superficial (Castellanos, 2016). Éste es un estado de reposo y supervivencia, que producto de las condiciones ambientales desfavorables, que se caracterizan por presentar procesos metabólicos ralentizados, así mismo, el quiste bacteriano ayuda a la dispersión hacia ambientes más favorables, que al estar ahí tienden a romperse para que se puedan desarrollar. Una de las aplicaciones que tienen los quistes bacterianos es en el tratamiento del agua residuales ya que se caracterizan por su capacidad de limpiar aceites (Sekine, Akizuki, Kishi, Korusawa, & Toda, 2019).

En la figura 5 y figura 6, se observa una preparación de una tinción con Sudan IV de una muestra de *Nitrobacter*, donde se aprecian los quistes bacterianos representados por unos grumos de color negro indicados por la flecha amarilla (figura 5) y círculo amarillo (Figura 6), lo que indica la formación de estas estructuras debido a las condiciones desfavorables del medio.

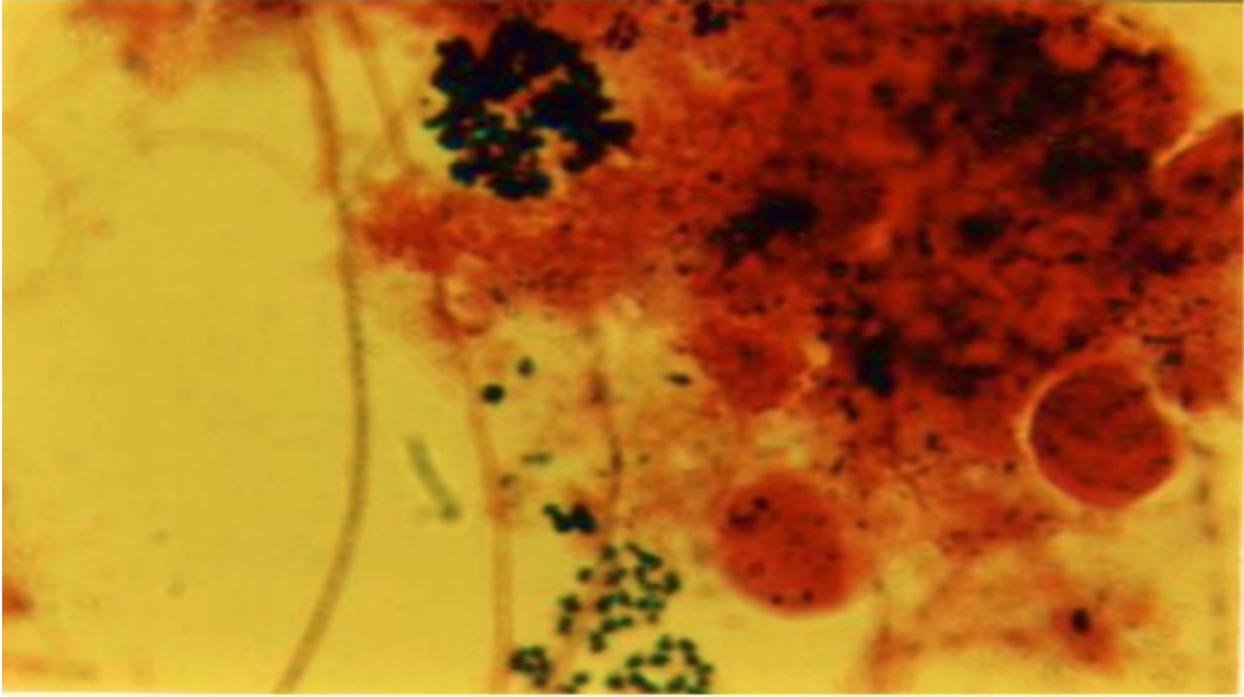


Figura 5. Quistes de *Nitrobacter* sp. Se empleando la tinción con Sudan IV (40x) señalados por flecha (Rodríguez , 2004).

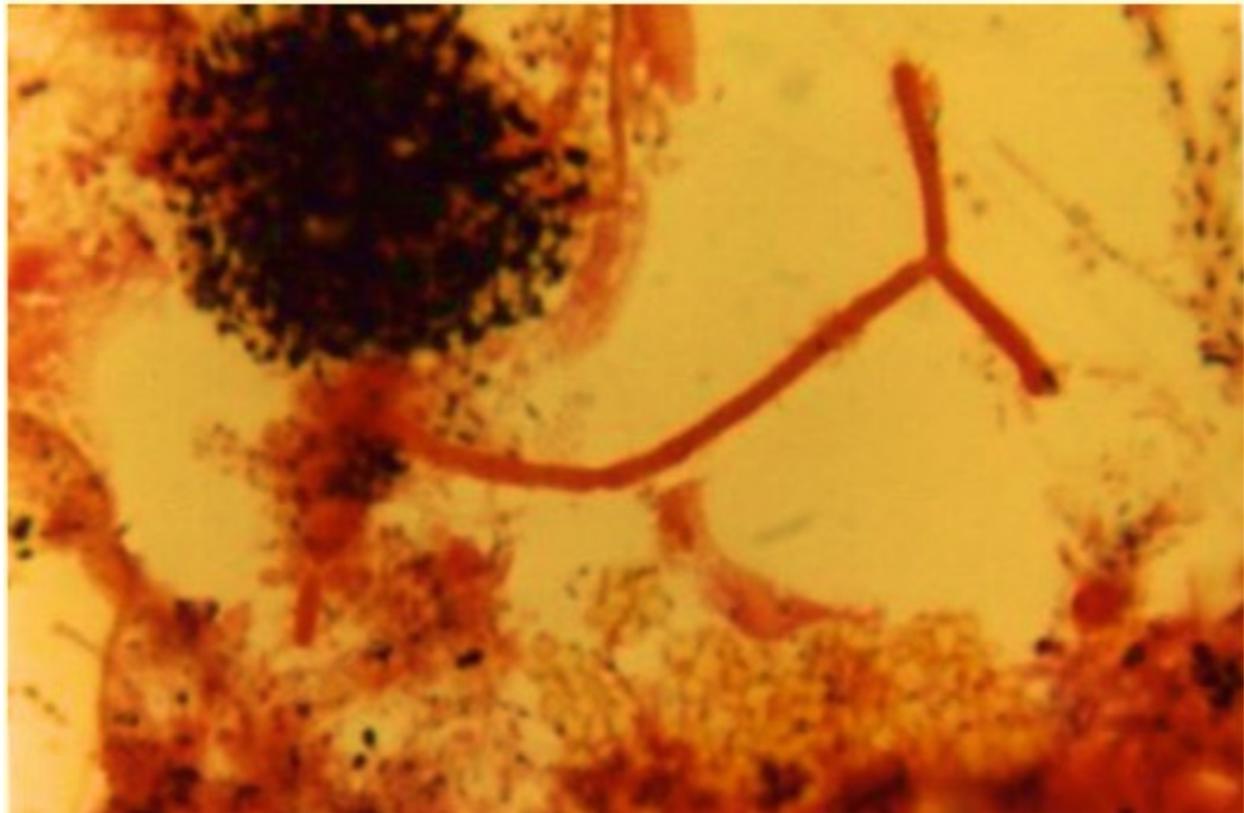


Figura 6. Quistes de Nitrobacter tinción Sudan IV.  
Señaladas por círculo amarillo (Rodríguez, 2004).

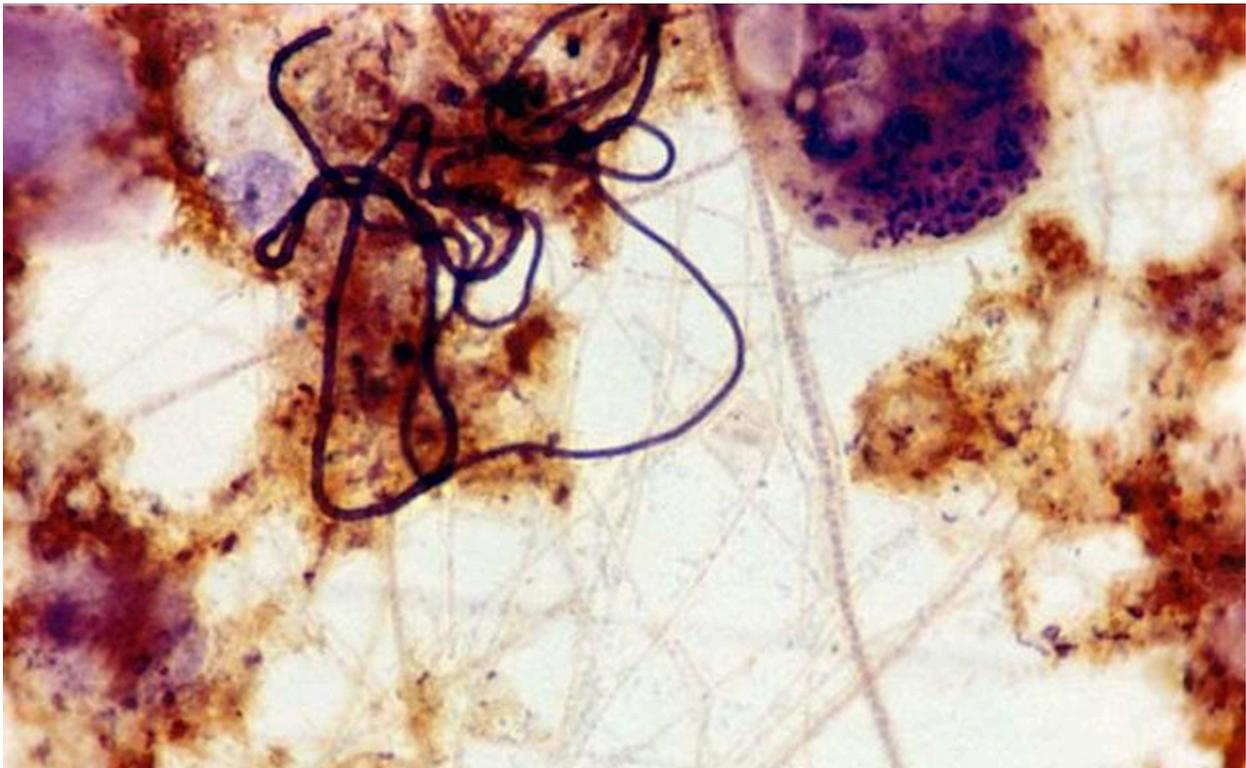
### **2.3 Identificación morfológica de las bacterias nitrificantes.**

Desde el punto de vista morfológico y estructural la identificación de las bacterias es importante, porque permite corroborar el aislamiento de dichos microorganismos de manera visual (Junium, Dickson, & Uveges, 2018) para ello se requiere de las siguientes tinciones:

-Tinción simple: Es aquella en donde se agrega un sólo colorante a una suspensión de microorganismos previamente secada sobre un portaobjetos y fijada a la flama, para lo cual se vierte una solución diluida de un colorante y se mantiene durante un minuto;

posteriormente se lava varias veces con agua corriente y se deja secar. (Prescott, Harley, & Klein, 2015).

-Tinción diferencial: Las tinciones diferenciales o complejas que son aquellas donde se usan una serie de colorantes y decolorantes, de esta forma los microorganismos que retienen el colorante primario después de una decoloración se clasifican como positivas, por el contrario, al decolorarse y adquirir el colorante secundario se clasifican como negativas. Los ejemplos más comunes son las tinciones de Gram (considerando la formación de color rosa como Gram negativa y violeta como Gram positiva), Ziehl-Neelsen (siendo las teñidas en rojas y las que se tiñen del color secundario azules) y Neisser (Poniendo en manifiesto la presencia de gránulos de polifosfato de color azul negro). En la figura 7, se da un ejemplo de una observación de tinción diferencial de Neisser con presencia de gránulos de polifosfato. (Kraiem, 2019).



*Figura 7. Tinción de Neisser. (observación a 100X).*

## 2.4 Aguas residuales.

El agua residual es el agua proveniente de las actividades diarias humanas, se caracteriza por tener una calidad que ha sido afectada como resultado del uso doméstico, comercial e industrial.

El agua residual se puede clasificar de acuerdo con su procedencia en:

- Municipales: son aguas residuales provenientes del hogar transportado por los ductos de alcantarillado de una ciudad o poblado.
- Industriales: son las aguas residuales provenientes de las descargas del agua utilizada en las actividades industriales.

El agua residual también puede ser clasificada de acuerdo con los contaminantes que porta como:

- Aguas grises: es el agua proveniente de la actividad de limpieza del ser humano como duchas, lavamanos y lavado de utensilios y ropa.
- Aguas negras: es el agua proveniente del hogar que transportan residuos humanos (heces fecales) combinadas con el agua gris.
- Aguas negras industriales: es la mezcla de agua proveniente de la industria con agua residual doméstica<sup>1</sup>.

En México la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) establece estadísticas sobre las descargas de aguas residuales, el objeto del mejoramiento de la calidad del agua ha llevado a la construcción de plantas de tratamiento de aguas residuales para tener una mejor descarga a ríos y cuerpos acuáticos. Al ser un tema central para las políticas ambientales y económicas, se reporta en cifras oficiales, que se le da tratamiento al 52.7% de aguas municipales que se generan (CONAGUA, 2018), para la reducción de la contaminación del agua se requiere una fuerte inversión en infraestructura para el

---

<sup>1</sup> [http://www.cuidoelagua.org/empapate/empapate\\_aguas.html](http://www.cuidoelagua.org/empapate/empapate_aguas.html) revisado el 25-jun-2019 a las 11:50

tratamiento de aguas residuales en figura 8 se muestra la infografía proporcionada por la CONAGUA donde se aprecia la estadística del tratamiento de aguas y su valor en inversión, donde claramente se aprecia que el tratamiento de aguas residuales es bajo, pues el 52% total es tratado, a pesar de que el 88% del total puede ser reutilizado vemos que hace falta inversiones más grandes para lograr dar mantenimiento a las plantas que ya existen y podamos mejorar la calidad del agua en México<sup>2</sup>.

Lograr que todos los cuerpos de agua recuperen su calidad, para satisfacer las necesidades de la población y así contribuir en la calidad de vida de la población; requiere que se mantengan libre de descargas de aguas residuales. Para la caracterización de las aguas residuales existen parámetros que permiten clasificarlos (Martín, Betancourt, Salas, & Peñate, 2006)

-Sólidos en suspensión: son sólidos que no pasan a través de la membrana de tamaño a 0.46 micras.

-Grasas y aceites: son determinados por el uso de un disolvente apropiado, que al evaporarse se tiene un peso obtenido.

-Nitrógeno: se presenta en las aguas residuales en forma de amonio, junto a nitratos y nitritos, generalmente se utilizan métodos espectrofotométricos.

-Organismos patógenos: son contaminantes provenientes de material fecal, para contarlos se utilizan los Coliformes Totales Fecales.

---

<sup>2</sup> <https://agua.org.mx/actualidad/aguas-residuales-contaminacion-en-mexico/> revisado el 25-jun-2019 a las 12:45.

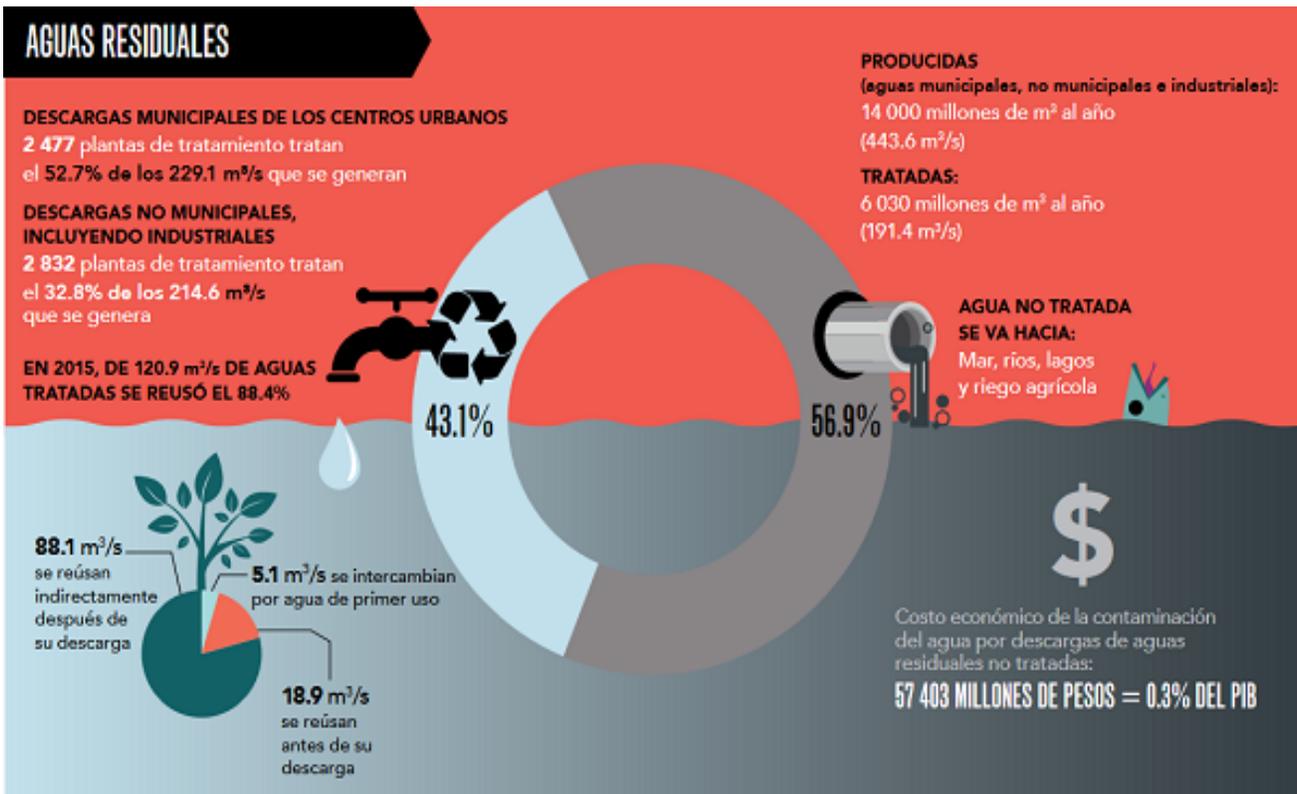


Figura 8. Aguas residuales. Infografía de aguas residuales y su impacto al ambiente (CONAGUA 2018).

## 2.5 Contaminación por compuestos nitrogenados.

El nitrógeno es un compuesto tóxico para los organismos acuáticos y tiene un papel importante en la eutrofización. Las formas más importantes encontradas del nitrógeno son amonio, nitrito y nitrato (Vymazal, 2007). La actividad del ser humano ha alterado significativamente el Ciclo del nitrógeno, dando como resultado problemas ambientales (Camargo & Alonso, 2007).

Los compuestos nitrogenados al ser de gran importancia para el desarrollo de la vida acuática, pero al encontrarse en altas cantidades tendrá como consecuencia un desequilibrio en el ecosistema (Çelik, 2006).

Una de las principales características de un cuerpo de agua natural contaminado es la presencia de un color verde intenso, este fenómeno es conocido como eutrofización, esto debido al crecimiento de poblaciones de microalgas y algunas cianobacterias. Estos organismos al requerir luz directa, altas temperaturas, fosfatos y compuestos nitrogenados, esto conlleva al aumento de temperatura en la superficie ocasionado que las cianobacterias produzcan y liberen exo-toxinas que provocan la muerte de la vida marina.

La acumulación de compuestos nitrogenados como consecuencia de la descarga de aguas residuales y de un uso inadecuado de fertilizantes, provocan que no sea posible la transformación de amonio a nitrato, por tanto, las plantas acuáticas no se desarrollan óptimamente (Rodríguez, 2004).

La toxicidad de compuestos nitrogenados se presenta a concentraciones elevadas de amonio, nitrato y nitrito provocando que se merme la capacidad de los animales acuáticos para sobrevivir. El amonio en específico, tiene los efectos más tóxicos para los animales acuáticos, porque, origina la destrucción de los epitelios bronquiales generando una supresión del Ciclo de Krebs.

El efecto en la salud humana se contrae al beber agua contaminada por nitrógeno, tiene efecto adverso, produciendo metahemoglobina, promoviendo el cáncer en el tracto gastrointestinal, provocando náuseas, diarrea o neumonía. De acuerdo con el centro para el control y prevención de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés Center for Disease Control and Prevention) la concentración letal es de 0.002 mg/L.

## **2.6 Legislación para los límites permitidos de amonio en aguas.**

La norma NOM-001-SEMARNAT-1996 que establece los *límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas en aguas y bienes nacionales*, tiene como objetivo proteger su calidad y posibilitar los usos del agua. Se define como carga

de contaminantes a la masa de nitrógeno expresada por unidad de volumen (miligramo/litro) que tiene un previo tratamiento para remover los contaminantes básicos como; grasas, aceites, materia flotante, sólidos sedimentados, empleado a los cuerpos receptores como las zonas marinas, presas, terminando donde hay flujo de agua.

Se utiliza la norma como una guía para la metodología de cuantificación de nitrógeno y se puede solicitar una validación para realizar alguna metodología alterna a esta norma.

La norma mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 para la descarga de nitrógeno total en cuerpos receptores tipo embalse para riego agrícola, que es de 40 mg/L, se menciona que el nitrógeno al tener concentraciones elevadas es un contaminante y debe ser monitoreado. En la tabla 1, se muestra el intervalo permitido en la NOM-001-SEMARNAT-1996.

**TABLA 1. INTERVALO DE CONCENTRACIÓN PERMITIDO EN LA NOM-001-SEMARNAT-1996 PARA LA DESCARGA DE NITRÓGENO TOTAL EN CUERPOS RECEPTORES TIPO EMBALSE PARA RIEGO AGRÍCOLA.**

Parámetro	Embalses para riego agrícola	Embalses naturales y artificiales	Aguas costeras	Suelo
Nitrógeno total	40-60 mg/L	15-60 mg/L	15-25 mg/L	No aplica

## 2.7 Uso de agua residual tratada.

El agua residual tratada es utilizada en diferentes actividades humanas tales como el riego agrícola y jardines, su uso en sanitarios entre otros. El objetivo es producir agua reutilizable para el ambiente, que sustituya al agua potable en algunas actividades humanas como el riego de parques y jardines (NOM-003-SEMARNAT, 1997).

## 2.8 Muestreo en agua.

La Norma Mexicana NMX-AA-003-1980 *Aguas Residuales. - Muestreo* que establece los lineamientos generales y las recomendaciones para muestrear las descargas de

aguas residuales, con el fin de determinar sus características físicas y químicas.<sup>3</sup> Se indica que las muestras deber ser representativas de las condiciones que existan al momento y hora del muestreo y se debe contar con el volumen suficiente para efectuar en la muestra las determinaciones correspondientes.

El objetivo del muestreo es analizar las variables microbiológicas, compuestos químicos y su calidad (SEMARNAT, 1996). Su aplicación obligatoria es para todo sitio que contenga agua.

Los tipos de muestreo que manejan las normas NMX-AA-003-1980 y la NOM-001-SEMARNAT-1996 son:

- Muestra simple: es la toma de muestra realizada en el punto de la descarga, de manera continua, en un día normal de operación de manera que refleja cuantitativa y cualitativamente los procesos representativos de las actividades generadas en la descarga, la toma de muestra debe ser necesaria para llevar a cabo los análisis necesarios para la composición.
- Muestra compuesta: en la muestra del resultado de la mezcla del número de muestras simples, para conformar la muestra compuesta, el volumen de cada una de las muestras simples debe ser proporcional al caudal de la descarga en el momento de su toma.

Para el correcto muestreo se debe definir el objetivo y seguir lo establecido en la NMX-AA-003-1980. Otro factor para tomar en cuenta es el uso del agua a analizar, para medir la efectividad del proceso.

Las técnicas de muestreo varían de acuerdo con situaciones específicas con base a objetivos previstos del muestreo.

---

<sup>3</sup> <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166762/NMX-AA-003-1980.pdf>

## **2.9 Métodos de cuantificación de amonio.**

Para este punto se han abordado el ciclo del nitrógeno, los microorganismos que intervienen en él y la problemática que ocasionan los compuestos nitrogenados en los cuerpos acuáticos. Para este apartado se plantean los procedimientos para conocer la actividad nitrificante.

La medición de parámetros fisicoquímicos como la concentración de los compuestos nitrogenados se determina por diversas técnicas de laboratorio como lo son: técnica de Nessler, titulometría, espectrofotometría. La aplicación de una u otra técnica es regida por las condiciones fisicoquímicas del agua en análisis (APHA, 1998).

Para este trabajo, se empleó la determinación de la velocidad nitrificante, donde el principal objetivo es establecer la constante media de saturación y su constante de remoción, nos apoyamos del método de análisis óptico donde, es el estudio de la interacción de la radiación con la materia como una función de la longitud de onda (Kowalchuk, 2001).

## **2.10 Determinación de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ).**

Para la determinación de  $\text{NO}_2^-$  se utiliza la reacción de Griess que es una técnica empleada en determinar la reducción del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), esta puede ser visible al observar la aparición de un color rojo cuando reacciona el nitrito con los dos reactivos (ácido sulfanílico y  $\alpha$ -naftilamina), la acción del color formado es resultado de la formación de un compuesto diazoico. (Richards & Kletsch, 1964)

En la figura 9 se observa la comparación de los resultados en la prueba de Griess, donde la presencia de color rojo grosella indica la reducción del nitrato (Mac Faddin, 1980). El método utiliza la determinación de la actividad de la enzima nitrato reductasa que reduce el nitrato a nitrito y se evidencia con la formación de un color rojo grosella con el reactivo de Griess. Al presentarse un resultado negativo se aprecia un color amarillo paja, se debe agregar unas trazas de Zinc y se observa el color desarrollado.

Donde la ausencia de color rojo indica que el microorganismo redujo los nitratos a óxido nítrico y/o nitrógeno molecular, si el color rojo se desarrolla luego de agregar Zinc indica que el microorganismo no reduce los nitratos.

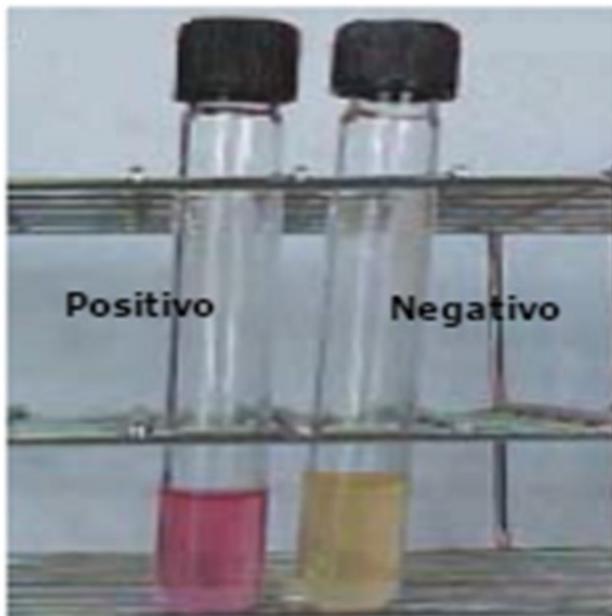


Figura 9. Resultados para la prueba de Griess.

## 2.11 Cinética química.

La cinética química estudia la velocidad de los procesos de reacción y el mecanismo del cuál una especie química se transforma en otro, la cinética química se considera una de las cuatro ramas de la fisicoquímica. La velocidad es la masa en moles de un producto formado por unidad de tiempo en un sistema que este equilibrio. El mecanismo es la secuencia de eventos químicos individuales cuyo global la reacción observada. Por tanto la cinética química que estudia las velocidades es la cinética de reacciones (Chang, 2018).

El cambio en la concentración de reactivos con el tiempo es indicado por:

$$\text{Rapidez} = \frac{-\Delta[R]}{\Delta t} = mL$$

De acuerdo con la “Ley de rapidez” de Harold S. Jonston (Chang, 2018), indica que la rapidez de una reacción no es constante, sino que es proporcional a las concentraciones de un reactivo (R) y un producto (P). La ley se define en la concentración del reactivo y es afectado por la temperatura. En las figuras 8 y 9, se muestran gráficamente los tipos de reacción.

- Orden cero.

Donde; Reactivo → Producto, y la rapidez =  $K \text{ (Ms}^{-1}\text{)}$  se dice que es independiente a la concentración del Reactivo.

Teniendo un gráfico:

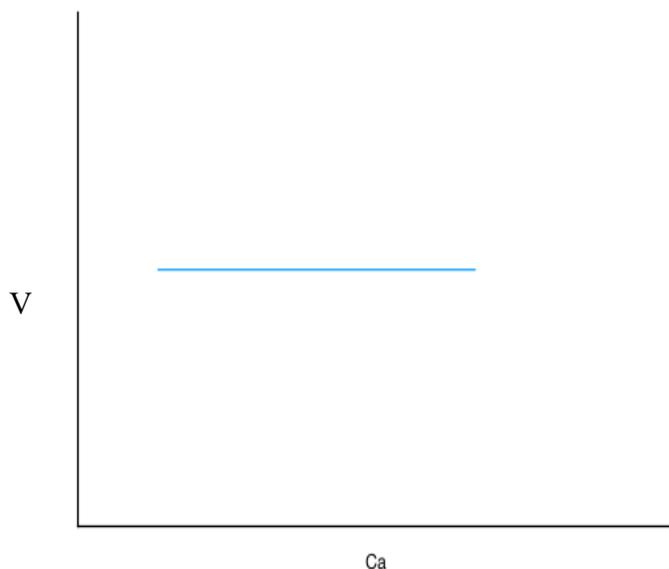


Figura 10. Reacción de orden cero. (Chang, 2013).  $[Ca]$  = concentración de producto formado.

- Primer orden.

Dependiente de la concentración de R.

Donde; rapidez=  $k[R]$

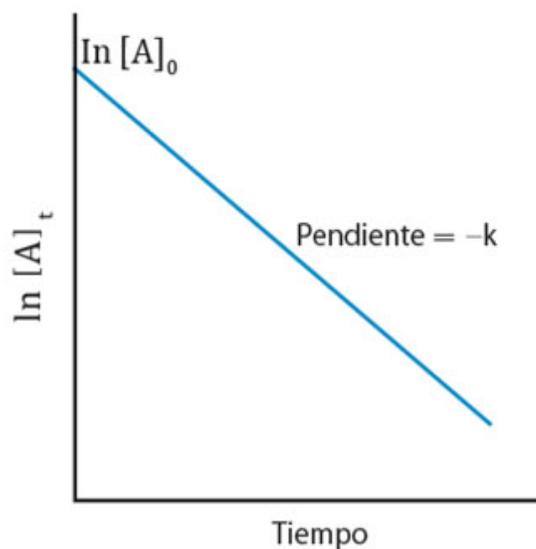


Figura 11. Reacción de primer orden.

Pendiente negativa al calcular el Ln. debido al decaimiento exponencial de la concentración de acuerdo con el tiempo transcurrido forma natural de la reacción. (Chang, 2018).

- Velocidad.

El estudio de la velocidad y los mecanismos por el cual hay transformación en una reacción, es la masa expresada en moles del producto formado o del reactivo consumido por unidad de tiempo. La velocidad depende de la temperatura, presión y concentración de los reactivos. Esto ayuda a comprender las etapas en que los reactivos se convierten en productos.

# **CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO.**

## **3.1 Hipótesis.**

La concentración inicial de nitrógeno amoniacal influye en la velocidad específica de nitrificación y en la formación quistes nitrificantes.

## **3.2 Objetivo general.**

Determinar la velocidad específica de nitrificación y la formación de quistes de bacterias nitrificantes empleando agua enriquecida con amonio a tres diferentes concentraciones.

## **3.3 Objetivos particulares.**

- Aislar e identificar las bacterias nitrificantes, procedentes de una muestra de lodos activados, mediante medios de cultivo selectivos.
- Determinar la velocidad de transformación de nitrógeno amoniacal en medios de cultivo enriquecidos con 40, 160, 240 mg/L de sulfato de amonio.
- Realizar el seguimiento del proceso de nitrificación mediante observaciones al microscopio y técnicas colorimétricas para compuestos nitrogenados, bajo condiciones controladas de laboratorio.

### 3.4 Estrategia de trabajo.

En la figura 12 se muestra el diagrama de flujo de la estrategia de trabajo que se realizó.

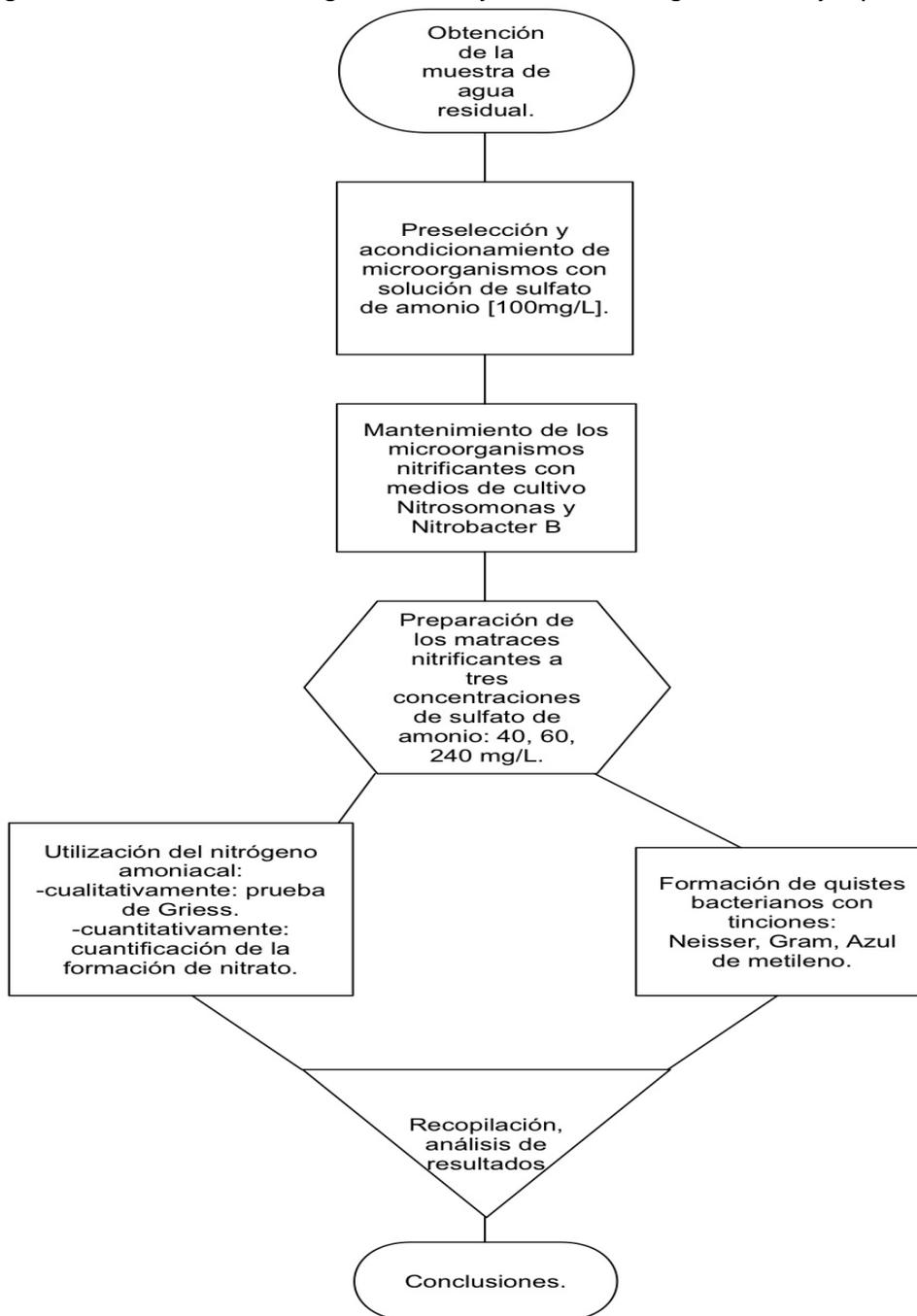


Figura 12 Diagrama de flujo de la estrategia de trabajo seguida.

## **CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **4.1 Obtención de la muestra de agua residual.**

El agua residual parcialmente tratada (ARCU), fue obtenida de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria (PTARCU), a partir del sedimentador secundario. Para obtener el desarrollo de los microorganismos nitrificantes, éste tuvo que ser enriquecido con 100 mg por litro de sulfato de amonio de acuerdo con los trabajos de (Rodríguez, 2004; Hanaki, 1990). De la muestra de agua residual enriquecida se transfirió una alícuota de 25 mL a un matraz Erlenmeyer de 1L con 875 mL de una solución de sulfato de amonio y se incubó a temperatura ambiente con aireación con una bomba de aire marca Sunny por 30 días.

### **4.2 Preparación del medio de cultivo.**

Los medios de cultivo utilizados fueron medio *Nitrosomonas* y medio *Nitrobacter B* que fueron preparados de acuerdo lo descrito por Hanaki (1990) y Ronald (1999), para la obtención de *Nitrosomonas sp.* (NS) y otro para *Nitrobacter sp.* (NB) respectivamente. Se prepararon los dos medios en la presentación de medio líquido.

### **4.3 Obtención de los microorganismos nitrificantes.**

Para la obtención de los microorganismos nitrificantes se realizaron muestreos cada tercer día a partir de muestra de agua residual enriquecida. Los medios líquidos de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter B* fueron inoculados por asada y se incubaron a 27°C con agitación por 30 días. Se realizó una tinción de Gram para corroborar el crecimiento de las bacterias nitrificantes.

#### 4.4 Observación microscópica bacterias nitrificantes.

Para la observación morfológica de las bacterias nitrificantes se realizaron tinciones de Gram, azul de metileno y Neisser, las que fueron observadas 100x en un microscopio marca Zeiss Scope A1.

#### 4.5 Preparación de los matraces de tratamiento.

Los matraces de tratamiento de transformación de nitrógeno amoniacal a nitratos por nitrificación se prepararon en cuatro matraces Erlenmeyer de un litro y se acondicionaron adicionándoles 50 mL de la muestra acondicionada previamente con 950 mL de una solución de sulfato de amonio 100 mg/L de acuerdo con Rodríguez (2004), posteriormente se incubaron a temperatura ambiente, en condiciones de obscuridad para lo cual, los matraces cubriéndose con papel aluminio. Las condiciones en las que se operaron los matraces se enlistan en la Tabla 2.

**TABLA 2 CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LOS MATRACES ERLENMEYER.**

Parámetros	Columna BC ARCU	Columna ARCU
Temperatura (°C)	TA	TA
pH	7.0-8.5	7.0-8.5
Luz	Ausencia	Ausencia
Inóculo (mL)	50	50
Concentración de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ppm)	40	40
Aire bombeado	sí	Sí
Concentración de flujo de oxígeno (mg/L)	5	5

BC= Columna blanco.

ARCU= Columna con microorganismos de la planta de tratamiento de agua residuales (PTAR) de Ciudad Universitaria.

TA= Temperatura ambiente.

#### **4.6 Prueba para la determinación de nitritos y nitratos.**

Para determinar la presencia de nitritos se realizó obteniendo una muestra de 2 mL de cada una de las columnas y se colocaron en tubos de ensaye de 13 X 100, se adicionaron dos gotas de los reactivos de Griess A y Griess B (Britania), (veáse página 33). La ausencia de color rojo indica que el microorganismo redujo los nitratos a óxido nítrico y/o nitrógeno molecular. La visibilidad de color rojo surge luego de agregar trazas de Zinc, indicando que el microorganismo no reduce los nitratos.

#### **4.7 Cuantificación de amonio.**

Para medir la cantidad de amonio se realizó una cuantificación por absorbancia de las columnas de tratamiento diseñadas, el procedimiento fue utilizar una solución que contenía hipoclorito de sodio 5.25% marca Clorox (reactivo oxidante), arsenito de sodio marca Meyer 0.45g, N-1 naftiletilendiamina (NED) Meyer 0.06g, HCl 4N marca Fisher. Se tomó un 1 mL de muestra de los matraces y se adicionaron 0.5 mL del reactivo oxidante, enseguida se agitó y se dejó en reposo por 1.5 h. Posteriormente se adicionó 0.05 mL de arsenito y 0.5 mL de sulfatilamida, dejando que reaccione por 8 minutos y una vez transcurrido el tiempo se añadió 0.05 mL de NED dejando en reposo por 10 minutos; dando tiempo para la realización de la reacción para formar una coloración rosa mexicano (indicando la reacción con amonio a nitrato), siendo estable por 2 horas. De esta forma quedó listo para la lectura en un espectrofotómetro marca (HAUS) a una longitud de onda de 540 nm.

#### **4.8 Observación de formación de quistes nitrificantes.**

Para la observación en el microscopio se realizaron tinciones que permitieran ver la formación de los quistes bacterianos. La primera tinción realizada, fue la tinción de Gram, siguiendo de la tinción Azul de Metileno, para finalmente realizar la tinción de Neisser.

## **CAPÍTULO 5. DISEÑO EXPERIMENTAL.**

### **5.1 Obtención del inóculo y acondicionamiento.**

En esta etapa se hizo la toma de muestra. La muestra fue extraída de la Planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria. Específicamente, del sedimentador secundario, se extrajo la muestra de los lodos activados y se le adicionó agua enriquecida de amonio a una concentración de 100 mg/L, cada tercer día se adicionó 20 mg de sulfato de amonio. Este proceso duró durante quince días. Lo anterior, fue con objeto de acondicionar la muestra, propiciando que se favorezca la presencia y actividad de microorganismos nitrificantes. Se fue observando su crecimiento al realizarse una tinción de Gram, donde se corroboró su presencia al día quince.

### **5.2 Mantenimiento de los microorganismos nitrificantes.**

En esta etapa ya se contaba con los microorganismos nitrificantes, así que se procedió a la realización de los medios líquidos; *Medio Nitrobacter B* y *Medio Nitrosomonas*, en la figura 13 se aprecian los medios de cultivo líquidos sin inocular que de acuerdo con la bibliografía (Ronald, 2010) son medios selectivos para dichas bacterias. Se realizaron los medios para obtener los microorganismos para cerciorarse de que estamos trabajando con las bacterias necesarias para este trabajo.

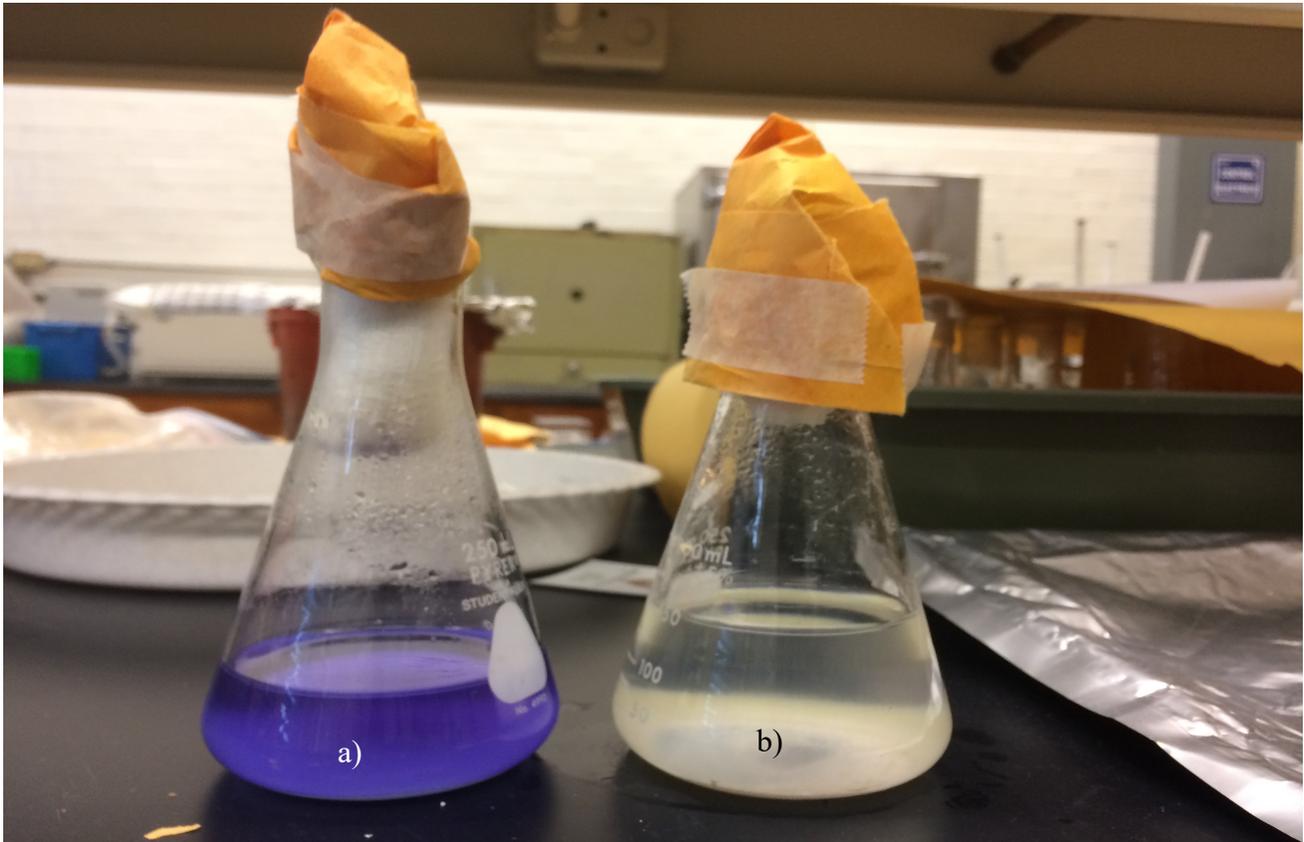


Figura 13. Medios de cultivo líquidos para *Nitrosomonas* sp. *Nitrobacter* sp .  
a). Medio en matraz Erlenmeyer para *Nitrosomonas* coloración morada b) Medio en matraz Erlenmeyer para *Nitrobacter* coloración blanca. Ambos medios son selectivos. Sin inocular (Ronald, 2010).

### **5.3 Preparación de los matraces nitrificantes y observación de quistes nitrogenados.**

Esta etapa fue realizada con la previa preparación de los matraces Erlenmeyer, se trabajó por duplicado a tres concentraciones diferentes: la propuesta del trabajo de tesis de Segura (2007) de 160 mg/L, la propuesta en la Norma Oficial Mexicana que indica la cantidad permisible para descargar amonio en ríos y aguas residuales de 40 mg/L, y la concentración propuesta para este trabajo de Tesis de 240 mg/L. Las condiciones que se controlaron fueron mencionadas en la Tabla 2 (veáse página 40), que son condiciones requeridas para el crecimiento viable de los microorganismos nitrificantes. Para poder observar la formación de los quistes bacterianos, se realizaron tinciones: Gram, Neisser y azul de metileno, esto nos permitió ver la formación de los quistes y así determinar la concentración de sulfato de amonio óptima en la formación de los quistes nitrogenados y proseguir con la cuantificación del nitrato formado.

### **5.4 Utilización de nitrógeno amoniacal.**

Para la realización de las actividades que arrojaron los resultados cinéticos de este trabajo, se realizaron las lecturas de la concentración donde se observó mayor formación de quistes bacterianos, se utilizaron los reactivos oxidantes (veáse página 41) y se adicionaron a las muestras de las columnas, para cuantificar el aumento de nitrato por espectrofotometría. A la para se realizó la prueba de Griess (veáse página 33) para ver la reacción de nitrificación.

## **CAPÍTULO 6. Resultados y discusión.**

### **6.1 Resultados de la obtención del inóculo y acondicionamiento de los microorganismos nitrificantes.**

El resultado obtenido de la muestra de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria, específicamente en el sedimentador secundario donde se obtuvo la muestra de los lodos activados, la cual fue acondicionada y enriquecida para lograr que las bacterias pudieran realizar el proceso de nitrificación de una manera más rápida. Con esto se logró la obtención de los microorganismos nitrificantes, para poder acondicionarlos.

Con el acondicionamiento de los microorganismos fue posible obtener un buen inóculo en el siguiente procedimiento, estos resultados se corroboran con lo reportado por Rodríguez (2004) y por Segura (2007) que establecen el uso de agua residual enriquecida con sulfato de amonio a 100 mg/L para aislar bacterias nitrificantes. Por lo tanto, se puede decir que en el presente estudio si fue factible la obtención de estos microorganismos con la metodología empleada Rodríguez (2004) y Segura (2007).

### **6.2 Resultados de la formación de quistes bacterianos.**

Para la realización del proceso de observación en el microscopio ya se contaba con los microorganismos nitrificantes acondicionados, los cuales fueron inoculados en los medios líquidos Medio Nitrobacter B y Medio Nitrosomonas de acuerdo al Handbook of Microbiological Media (Ronald, 2010), que recomienda el uso de estos medios de cultivo para tener los cultivos en menor tiempo de incubación que fue de 30 días. En esta etapa del estudio se procedió a la confirmación morfológica de los quistes, mediante su observación al microscopio. Las tinciones que se observaron fueron: tinción de Gram (Figura 14). Al aplicar estas técnicas se pudieron observar bacterias nitrificantes en forma de agregados de tamaño variable en el cultivo antes mencionado.

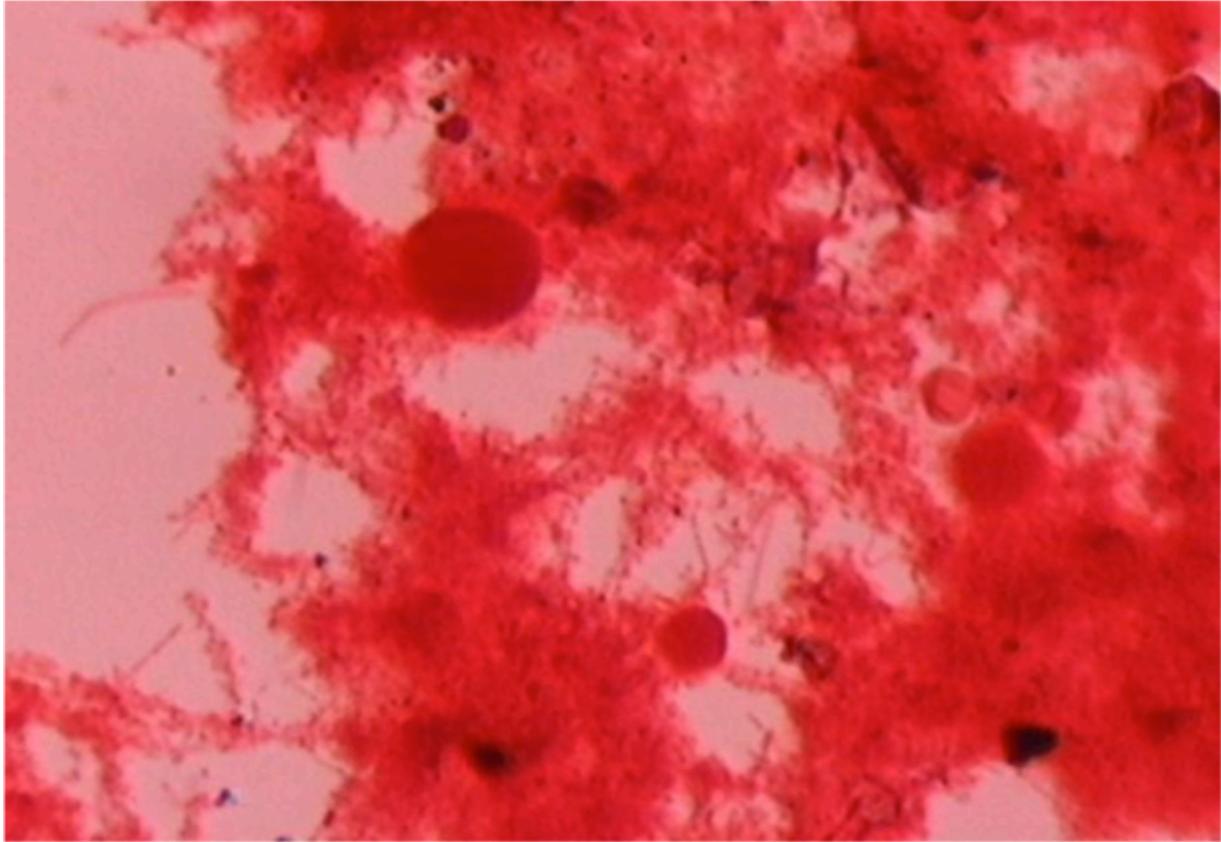
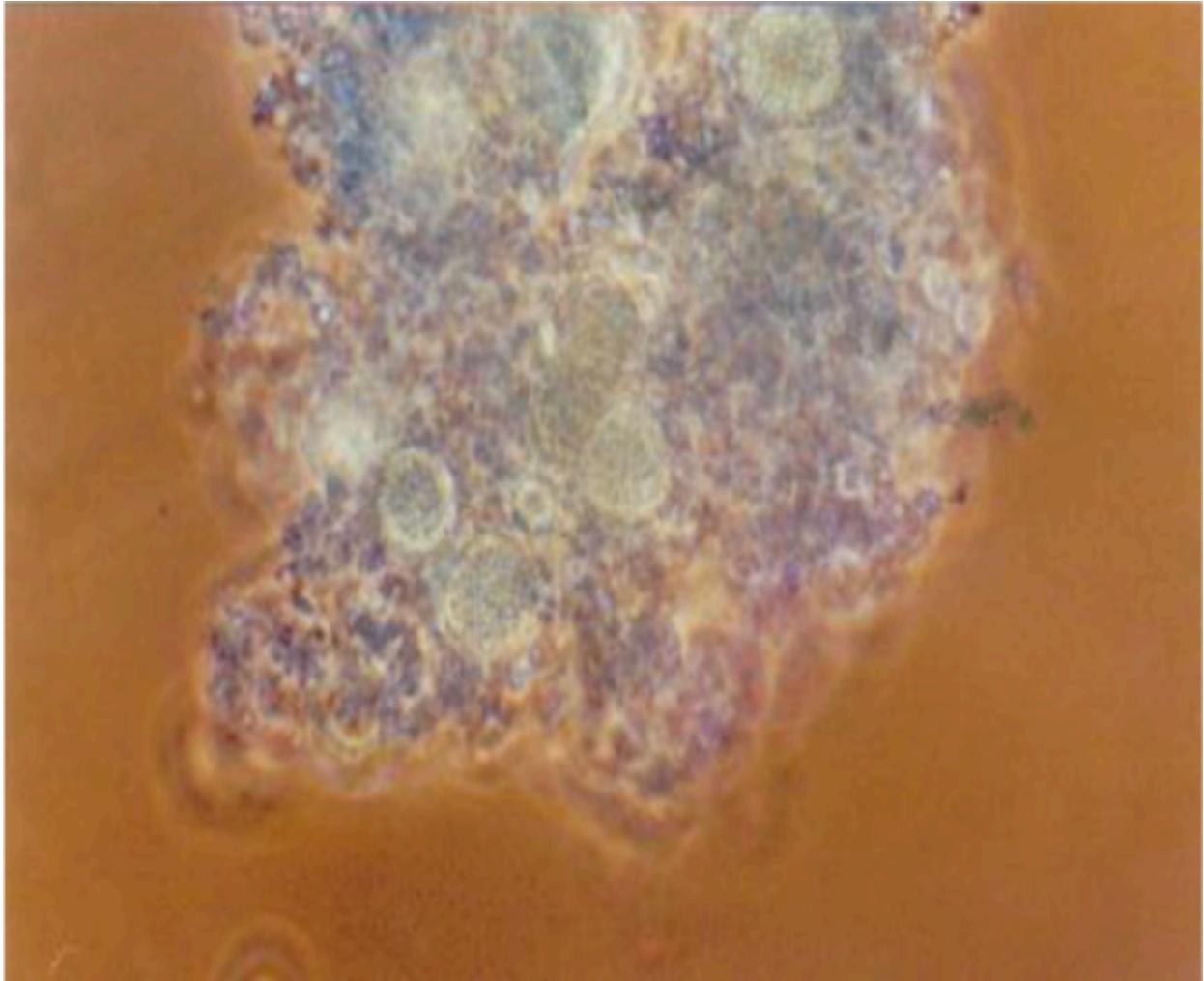


Figura 14. Tinción de Gram de *Nitrosomonas*. Señalados por una flecha amarilla (40x).

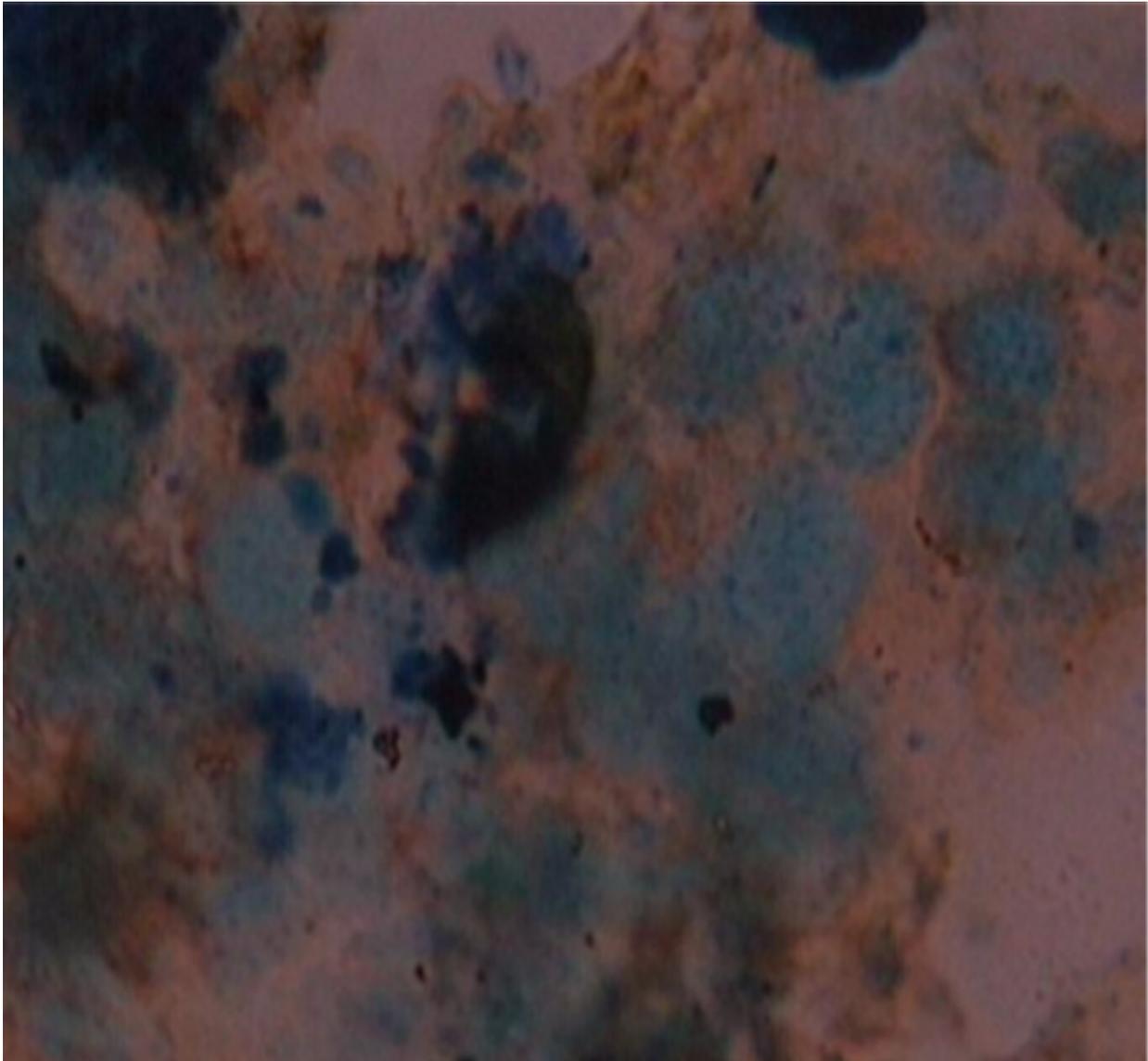
Para la obtención de estos microorganismos provenientes de aguas residuales se ha establecido una manera definitiva para su observación, es de agregados (Hanaki, 1990). Al considerar la metodología utilizada por Rodríguez (2004) se puede afirmar que se aumentó la posibilidad de encontrar a estos microorganismos en forma de agregados en la muestra que proviene de aguas residuales, porque, se le dio a los microorganismos el sustrato que requieren para su crecimiento. También se puede considerar que las condiciones utilizadas fueron las óptimas para su desarrollo, por tanto, encontrarlas de esta manera es debido a las condiciones con las que se trabajó, por lo que tienden a presentar estrategias de sobrevivencia como es la formación de los quistes.

Al contar con una identificación morfológica de las bacterias nitrificantes en las muestras obtenidas, se continuó con la observación microscópica los microorganismos,

por lo que fue posible observar la formación de agregados microbianos tal como lo reporta (Holt, 1999; Ronald, 2010) cuando se adiciona sulfato de amonio y cloruro en los medios de cultivo. En las figuras 15 y 16 se observan los agregados bacterianos a un aumento de 40x y 100x respectivamente en el microscopio de campo claro teñidos Azul de metileno (Holt, 1999; Ronald, 2010).



*Figura 15. Tinción Azul de metileno Nitrosomonas europoeae. (40x) con formación de agregados.*



*Figura 16. Tinción Azul de metileno de bacterias nitrificantes (100x), señalado por una flecha amarilla.*

De acuerdo con los resultados observados, se concuerda que lo reportado por el trabajo de Rodríguez (2004), que es consistente debido a los parámetros controlados y la tinción utilizada para poner en manifiesto la formación de agregados de bacterias nitrificantes que pueden ser observadas en la figura 16, en donde se aprecia que los agregados tienden a formarse debido a las condiciones mostradas en la Tabla 2 (véase página 40), que se utilizaron en el laboratorio.

Al igual que Holt (1999), se pudo observar la formación de los quistes bacterianos con tinciones de Neisser esto con el fin de poner en manifiesto aquellas bacterias que por su metabolismo liberan iones. A continuación, se muestran las tinciones de Neisser en las siguientes figuras 17 a 19.

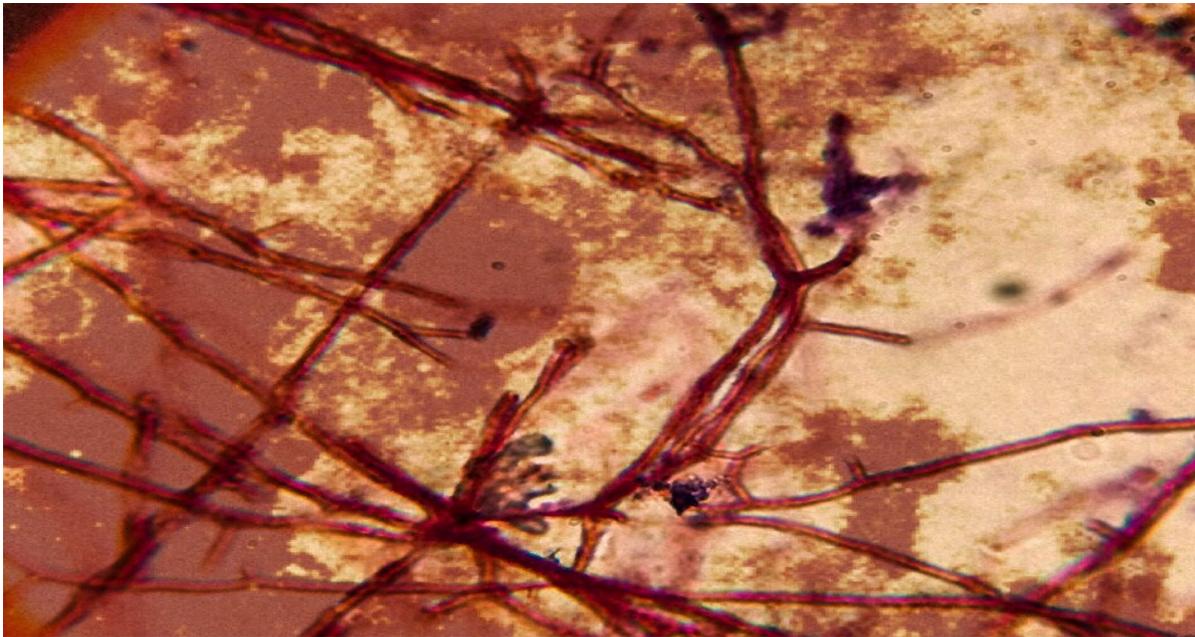


Figura 17. Tinción de Neisser observación a 40x a una concentración de 160 mg/L e indicados por flechas.

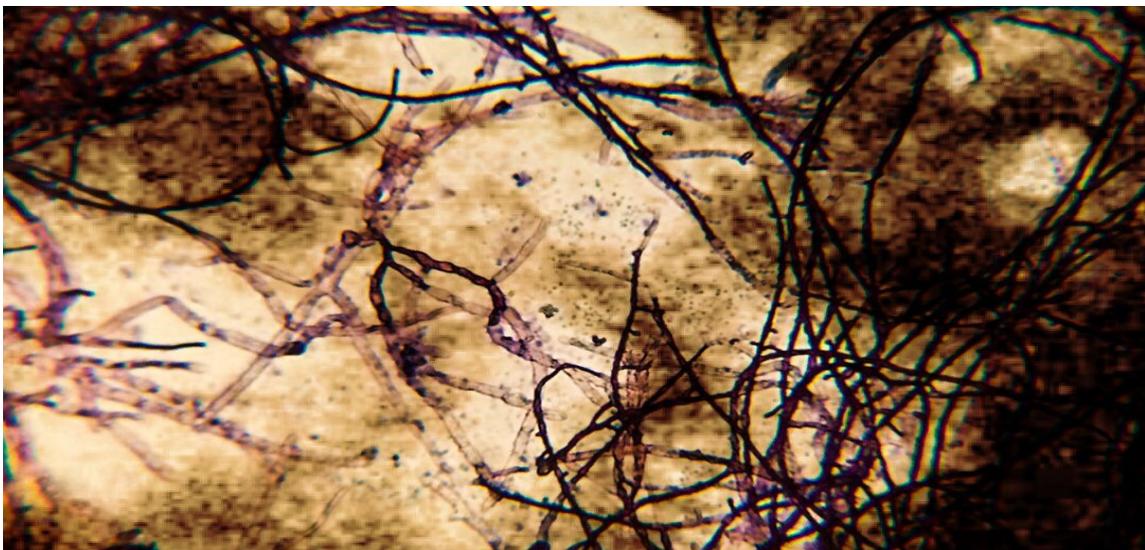


Figura 18. Tinción de Neisser.a 160 mg/L de sulfato de amonio donde se aprecia el aumento de los quistes de bacterias nitrificantes, observación a 40x.



Figura 19. Tinción de Neisser. observación a 40x a una concentración de 16mg/L. Indicado por flecha.

De acuerdo con las observaciones al microscopio, se aprecia que la presencia de los quistes corresponde a lo reportado por Rodríguez (2004), pues la utilización del sustrato hace que se formen los quistes, esta formación de agregados se debe a la utilización del sustrato que ayuda a las bacterias nitrificantes a poder sobrevivir en el medio de cultivo.

Esto nos permitió darnos cuenta de que dentro de las tres concentraciones con las que se trabajó la concentración de 160 mg/L es la mejor concentración para la obtención de los quistes provenientes de microorganismos nitrificantes, en la Tabla 3, se puede apreciar las concentraciones y las observaciones de quistes de manera cualitativa.

**TABLA 3 CONCENTRACIONES Y FORMACIÓN DE QUISTES.**

Concentración de amonio [mg/L]	Formación de quistes.
40	+
160	+++
240	++

+: poca formación de quistes.

++: regular formación de quistes.

+++ : mucha formación de quistes.

Tras obtener la mejor concentración para la formación de quistes se continuo con los parámetros constantes, aunque debido a la acumulación de ácido nitroso que genera la disminución del pH por lo tanto fueron ajustados con NaOH 1 M, esto, la variación de pH indica que se lleva a cabo un proceso de nitrificación y se prosiguió con los resultados del proceso de nitrificación.

### 6.3 Resultados de la prueba reducción de nitritos y cinética de reacción.

Tras corroborar que la mejor concentración para la formación de quistes fue de 160 mg/L y manteniendo los parámetros; temperatura, pH, luz, de las metodologías establecidas por Rodríguez (2004) y Segura (2007), se pudo hacer la detección de microorganismos nitrificantes con la determinación de nitritos con la prueba de Griess con la cual se puso de manifiesto la actividad nitrificante, para esta prueba se tomaron por duplicado muestras en diferentes días de experimentación correspondientes a la concentración de 160mg/L, estos resultados se pueden observar en la Figura 20.



Figura 20. Prueba de Griess muestra Tomada de la columna nitrificante de la concentración de 160 mg/L.

Se tomó de referencia lo establecido en el manual de Britania (2019), donde se establece que se puede diferenciar visualmente los grupos amonio-oxidante y nitrito-oxidante con la prueba de Griess, lo cual en este estudio se observó un cambio de tonalidad de incoloro a rosa, lo que indica que ocurrió una transformación de amonio a nitrito poniendo en manifiesto la actividad nitrificante de las bacterias a la concentración

160 mg/L de sulfato de amonio, se obtuvieron muestras a diferentes tiempos y de esta manera se pudo observar la formación de los agregados bacterianos, que se observaron con tinciones desde la figura 15 a la figura 19 (véase a partir de la pagina 48).

Con la detección de los nitritos y la obtención de los agregados bacterianos se puede coincidir con lo señalando en la metodología empleada por Rodríguez (2004), donde se menciona que va en conjunto la prueba de Griess y la formación de los quistes, pues es un proceso que realizan estos microorganismos en su supervivencia natural, además, se pudo concordar con Richard (1971) y Segura (2007), donde mencionan que las bacterias nitrificantes se pueden observar con la formación de agregados bacterianos en las muestras provenientes de aguas residuales.

Para la evaluación de la cinética de reacción se evaluó la concentración remanente del sustrato (amonio), de acuerdo con lo sugerido por Flemming (2000), que establece la cuantificación de la formación de nitrato y el consumo de amonio por fotometría. Los parámetros que se utilizaron para controlar las condiciones de los matraces nitrificantes y así tener un mejor resultado, se mencionan en la Tabla 2 (véase página 40), esto de acuerdo con lo reportado por Segura (2007). Se trabajó con las tres concentraciones propuestas, a pesar de observar una mejor formación de quistes a la concentración de 160 mg/L de sulfato de amonio, donde se aprovecha mejor el amonio. A continuación, se exponen las figuras (Figura 21 a Figura 23), donde que representa el tratamiento de la columna de nitrificación de las tres concentraciones.

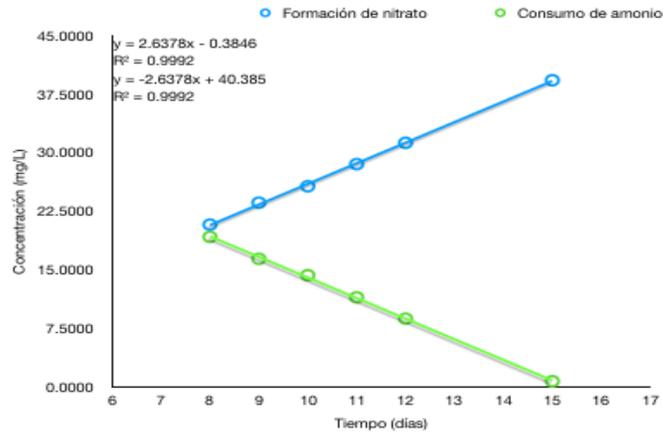


Figura 21. Gráfica formación de nitrato 40 mg/L de sulfato de amonio. La recta azul corresponde a la formación de nitrato, la recta verde corresponde al consumo de amonio.

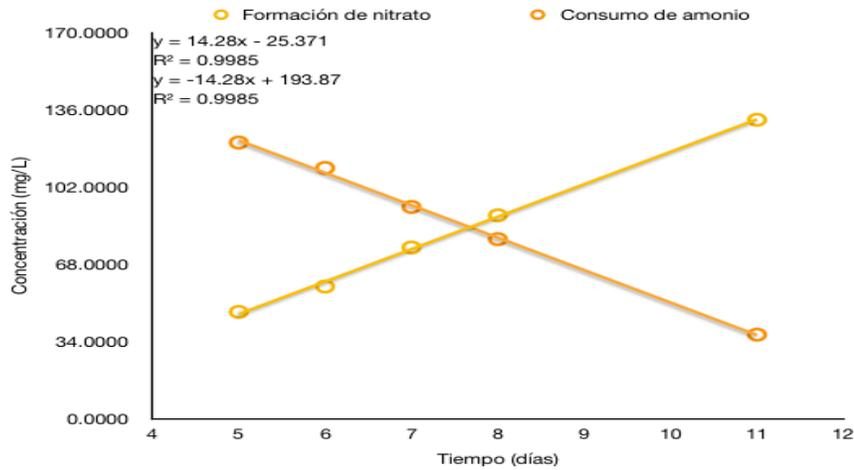


Figura 22. Gráfica concentración 160mg/L. de sulfato de amonio. Recta amarilla indica la formación de nitrato, recta anaranjada indica el consumo de amonio.

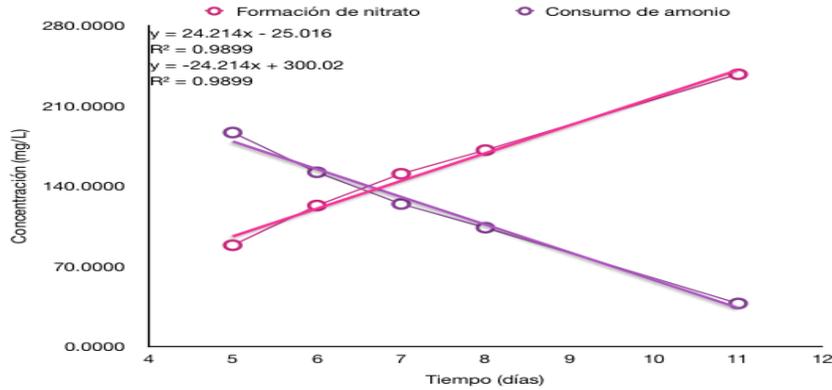


Figura 23. Gráfica concentración 240mg/L de sulfato de amonio Recta rosa indica la formación de nitrato, recta morada indica el consumo de amonio.

En las figuras 21, 22 y 23 se puede observar el perfil de nitrificación durante el tiempo de estudio. Es así como en la Figura 21, en el día 15, donde se determinó la presencia de 39.27 mg/L de  $\text{NO}_3^-$  y 0.73 mg/L de  $\text{NH}_4^+$ , en la Figura 22 y Figura 23, coincide con la del día 11, en cuanto a consumo de amonio y formación de nitratos. Los resultados observados, indican que la concentración de amonio decrece en función del tiempo y a su vez, la concentración de nitrato aumenta. Esto sucede gracias a la presencia del inóculo de bacterias nitrificantes con previo acondicionamiento, pues siguen una cinética de orden uno en ambos casos. Las constantes de transformación, generación y orden de reacción se obtuvieron al analizar los resultados experimentales. Haciendo una comparación entre los tres matraces y sus diferentes concentraciones. Se observa que el tiempo requerido para lograr el mismo grado de consumo  $\text{NH}_4^+$  para los tres matraces es menor para las concentraciones de 160 mg/L y 240 mg/L. Se infiere que la velocidad de biodegradación de amonio y biogeneración de nitrato dependen de su concentración inicial, por tanto, se modifica la constante de velocidad (k) que es la velocidad específica de la reacción.

**TABLA 4 PARÁMETROS CINÉTICOS DEL ANÁLISIS CINÉTICO DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE ORDEN CERO.**

Parámetro	40 mg/L		160mg/L		240 mg/L	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
k (mg/L)/día	-2,67	2.678	-14.28	14.28	-24.214	24.214
R	0.999	0.999	0.998	0.998	0.989	0.989

Los resultados obtenidos indican que después de 11 días de operación de los matraces, el porcentaje de remoción de amonio es mayor al 99% pasando en algunos casos de 131.5 mg/L a 8.5 mg/L. Para estos resultados se debe considerar que las concentraciones finales de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) el nitrógeno acumulado influye en la biomasa de células nuevas. De acuerdo con el trabajo de Segura (2007) los resultados obtenidos se coinciden que después de 11 días el porcentaje alcanzado en la remoción de amonio es mayor al 90%.

Se puede afirmar que bajo las condiciones experimentales que se establecieron para el trabajo que los quistes bacterianos se desarrollaron mejor a 160 mg/L, esto asociado a la utilización del nitrógeno en los matraces. Se puede observar que la utilización del sustrato sirve para formar los quistes, que como sabemos son formados para sobrevivir.

## Conclusiones y perspectivas.

- Se identificaron los microorganismos nitrificantes, procedentes de una muestra de lodos activados, mediante medios de cultivo selectivos y el uso de las tinciones de Gram, Azul de metileno y Neisser que permitieron visualizar los quistes nitrogenados característicos de estos microorganismos.
- El acondicionamiento de los microorganismos, empleando sulfato de amonio, permitió el acondicionamiento de lodo activado, favoreciendo la presencia de bacterias nitrificantes, lo que mejoró la eficiencia de la remoción de sustrato.
- Se determinó la velocidad específica de transformación del  $\text{NH}_4^+$  de las tres concentraciones, para las concentraciones de 40 mg/L, 160 mg/L y 240 mg/L de sulfato de amonio, el resultando de las velocidades de reacción fue de 2.678, 14.28 y 24.214 (mg/L) /día, respectivamente. Comparadas estas velocidades se observa que la concentración de 160 mg/L tuvo una velocidad de reacción más rápida respecto a la formación de quistes.
- Se realizó el seguimiento del proceso de nitrificación mediante observaciones al microscopio y técnicas colorimétricas para evidenciar la presencia de compuestos nitrogenados, bajo condiciones controladas de laboratorio. La reacción de Griess resultó ser buena herramienta indirecta para la identificación de la actividad de bacterias nitrificantes.
- Se confirmó que la concentración inicial de nitrógeno amoniacal influye en la velocidad específica de nitrificación y consecutivamente en la formación quistes nitrificantes.

La solución técnica, y ambientalmente aceptable que se proporciona en este trabajo es con el fin de disminuir la cantidad de nitrógeno presente en cuerpos de agua, tanto, naturales y artificiales, esto con el propósito de dar una mejor calidad y poder abastecer agua potable, tener uso recreativo, industrial, y proporcionar protección a la vida silvestre.

Es de vital importancia generar conciencia para no realizar descargas amoniacales al agua, y dar la importancia requerida a acciones del tratamiento de aguas con altos contenidos de nitrógeno amoniacal.

## Bibliografía.

- Camargo, J., & Alonso, A. (2007). *Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático*. España: Ecosistemas.
- Chang, R. (2018). *Química*. China: Mc Grawhill.
- Carrera, J. (2001). *Biological elimination of nitrogen in an high load effluent*. EE.UU: Tesis Doctoral.
- Castellanos, J. (2016). *Caracterización de bacterias oxidadoras de amonio aisladas del humedal de la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad de Boyacá*. Colombia: MSc .
- CONAGUA. (2018). *Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento*. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Anthonisen, A., Loehr, R., & Prakasam, T. (1976). *Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid*. EE.UU: Water Pollution Control Federation.
- APHA. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: American Public Health association.
- Arana, F. (2018). *Ecología para principiantes*. México: Trillas.
- Baxter, R., Hastings, N., & Glass, E. (2008). *Animal Genetics*. EE.UU: Nature.
- Biohinski, R. C. (2000). *Bioquímica*. Wilmington, Delaware.: Addison Wesley Iberoamericana.
- Britania. (2019). *Metodología de Prueba de Griess*. México: Britania.
- Brodham. (24 de enero de 2020). *biol*. Obtenido de Biol edu: [http://fire.biol.wvu.edu/brodham/biol346\\_S07/labman\\_week2.pdf](http://fire.biol.wvu.edu/brodham/biol346_S07/labman_week2.pdf)
- Burrell, P., Phalen, C., & Hovanec, T. (2001). *Identification of Bacteria Responsible for Ammonia Oxidation in Freshwater Aquaria*. EE.UU: Applied and Environmental Microbiology.
- Dionisi, H., Layton, A., Harms, G., Gregory, I., & Sayler, G. (2002). *Quantification of society*. EE.UU: doi.
- Dongen, U. (2019). *Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater*. EE.UU: Sharon.
- Emilia, L., Rincón, C., Ancízar, F., & Guitiérrez, A. (2012). *Dinámica del Ciclo del Nitrógeno y Fósforo en Suelos Nitrogenados*. México: Dinámica.
- Flemming, B. (2000). *A revised extual classification of gravel-free muddy sediments on the basis of ternary diagrams*. EE.UU: Continental Shelf Research.
- George, A., & John, R. (2002). *Ammonia-Oxidizinf: A Model for Molecular Microbial Ecology*. EE.UU: NCBI.
- Gross, A., Nemirovsky, A., Zilberg, D., Khaimov, A., Brenner, A., Snir, E., & Ronen, Z. (2003). *Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intensive recirculating saline water aquaculture*. EE.UU: Aquaculture.
- Gruber, N., & Galloway, J. (2008). *An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle*. EE.UU.: Nature.
- Hanaki. (1990). *Environmental Metal Pollutans, Reactive Oxygen Intermedaries and Genotoxicity*. Japon: Springer.

- He, J., Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., & Zheng, Y. (2007). *Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of the Chinese upland red soil under long-term fertilization practices*. EE.UU.: Environmental Microbiology.
- Heidey, C., Paul, L., Thomas, S., Willy, V., & Browyn, P. (2018). *Rapid removal of ammonium from domestic wastewater using polymer hydrogels*. EE.UU: Nature.
- Holt, J. (1999). *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Vol. 3. Baltimore: Maryland.
- Hooper, A., & Terry, K. (1974). *Photoinactivation of ammonia oxidation in Nitrosomonas*. EE.UU: Journal of Bacteriology.
- Huang, Z., Jiang, Y., & Song, X. (2018). *Ammonia-oxidizing bacteria and archaea within biofilters of a commercial recirculating marine aquaculture system*. EE.UU: AMB Express.
- Junium, C., Dickson, A., & Uveges, B. (2018). *Perturbation to the nitrogen cycle during rapid Early Eocene global warming*. EE.UU: Nature.
- Kowalchuk, G. A. (2001). *Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology*. Washington: Annual Review of Microbiology.
- Kraiem, K. (2019). *Comparative study on pilots between ANAMMOX favored conditions in a partially saturated bertical flow constructed wetland and a hybrid system for rural wastewater treatment*. España: Elsevier.
- MacFaddin. (2014). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. EE.UU: Panamericana.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2017). *Brock: Biología de los microorganismos*. Slovenia: Pearson Addison Wesley.
- Martín, I., Betancourt, J., Salas, J., & Peñate, B. (2006). *Guía sobre tratamientos de aguas urbanas para pequeños núcleos de población*. España: ITC.
- Mexicana, N. (2010). *NMX-AA-026-SCFI-2010 Análisis De Agua - Medición De Nitrógeno Total En Aguas NATurales, Residuales y Residuales Tratadas*. México: Gobierno de México.
- Nicolas, G., & James, G. (2008). *An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle*. EE.UU: Nature.
- Poth, M., & Focht, M. (1985). *Kinetic analysis of N<sub>2</sub>O production by Nitrosomonas europaea: An examination of nitrifier denitrification*. EE.UU.: Applied and Environmental Microbiology.
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (2015). *Microbiología*. España: Mc Graw-Hill-Interamericana.
- Richards, A., & Kletsch, R. (1964). *The Spectrophotometric Determination of Ammonia and Labile Amino Compounds in Fresh Seawater by Oxidation to nitrite*. Washington: University of Washington.
- Rodríguez, R. (2004). *Estudio de la actividad bacteriana nitrificante en solución acuosa y su reconocimiento "in situ"*. Ciudad de México: UNAM.
- Ronald, M. A. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. Washington, D.C.: CRC Press.
- Ruiz, G., Jeison, D., & Chamy, R. (2003). *Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration*. EE.UU: Water Reasearch.
- S. Çelik, B. Ö. (2006). *Removal of ammonia by natural clay mineral using fixed and fluids bed columns reactor*. Alemania: Aquacultar engineering.

- Segura, B. (2007). *Efecto de la variación de oxígeno disuelto en la velocidad específica de nitrificación de agua y agua residual enriquecida con amonio*. Ciudad de México: UNAM.
- Sekine, M., Akizuki, S., Kishi, M., Korusawa, N., & Toda, T. (2019). *Simultaneous biological nitrification and desulfurization treatment of ammonium and sulfide-rich wastewater: Effectiveness of a sequential batch operation*. Japan: Chemosphere.
- SEMARNAT. (1996). *NOM-001SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes Nacionales*. Ciudad de México: SEMARNAT.
- Usacheva, M., Teichert, M., & Biel, M. (2019). *Comparation of the methylene blue and touidine blue photobacteriacidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms*. EE.UU.: Laser in Surgery and Medicen.
- Vymazal, J. (2007). *Removal of Nutrients in Various Types of Constructed Wetlands*. EE.UU: Science of The Total Environment.
- Washington, C., Stephen, D., William, M., Koneman, E., & Gary, W. (2008). *Koneman. Diagnóstico microbiológico*. EE.UU: Panamericana.
- Zeng, R., Lemaire, R., & Yuan, Z. (2019). *A novel wastewater treatment process: Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal*. EE.UU: Water Science and Tecnology.

## CAPÍTULO 7. Anexos.

### 7.1 Medio enriquecido.

El medio medio enriquecido se elaboró de acuerdo con lo reportado por (Hanaki, 1990) se tomaron 100 mL de lodos y se les añadió 900 mL de agua destilada enriquecida con sulfato de amonio a una concentración de 100 mg/L. Cada tercer día se le fue añadiendo al medio, esto con el fin de no perder demasiado volumen en esta parte experimental.

### 7.2 Medios líquidos.

Para la realización de los medios líquidos, se prepararon los medios: *Nitrosomonas* y *Nitrobacter B*, se realizaron de acuerdo con la metodología reportada por Ronald, 2010, estos medios son útiles para el cultivo y mantenimiento de *Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp. respectivamente.

#### Medio *Nitrosomonas*.

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  .....3.0 g.
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  .....0.5 g.
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....0.05g.
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....4.0mg.
- Rojo de cresol..... 25 mL.
- Solución Fe/EDTA 0.1 mL. Realizada con:
  - EDTA..... 0.14 g.
  - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....0.5g.
  - $\text{H}_2\text{SO}_4$  .....0.05 mL.
- 1 L de agua destilada a pH=7.5

Se adiciona el  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 500mL de agua destilada, se mezcla y los demás componentes se adicionan a los otros 500mL. Se mezclan todos los componentes y se meten a la autoclave.

### **Medio *Nitrobacter* B.**

- $\text{NaNO}_3$  .....1.0 g.
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  .....0.5 g.
- $\text{NaCl}$  .....0.3 g.
- $\text{MgSO}_4$  .....0.5 g.
- $\text{MnSO}_4$ .... 2.0 mg.
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ..... 5.0 mg.
- 1 L de agua destilada.

Se adicionan los componentes a un litro de agua destilada, se mezclan y se meten a la autoclave por 15 minutos.

La elaboración de los medios de cultivo se hizo en zona aséptica.

La adición de la muestra se realizó a partir del medio enriquecido.

### **7.3 Tinción de Neisser.**

Reactivos para realizar la tinción de Neisser.

Solución I.

-Reactivo A:

- 0.2 gramos de azul de metileno a 10 mL de etanol al 96%, aforarlo a 100 mL de agua destilada.

-Reactivo B:

- 0.1 gramo de cristal violeta a 1 mL de agua.
- 3.3 mL de cristal violeta a 6.7 mL de etanol al 96%, aforarlo a 100 mL.

## 7.4 Cuantificación de nitrato.

Para la parte de la cuantificación de nitrato, se realizó de acuerdo con los descrito por (Richards & Kletsch, 1964) la lista de los reactivos se menciona a continuación.

- Hipoclorito de sodio, se utilizó solución comercial marca Clorox con concertación de 5.25% NaClO. Se tomó 0.3 mL y se aforo a 50 mL.
- Arsenito de sodio: Se disolvió 0.45 g del reactivo en 5.5 mL de HCl 1 N y se aforo a 50 mL.
- N-1 naftiletilendiamina (NED): Se disolvió 0.06 g en 50 mL de agua, y se conservó en frasco ambar.
- HCl 4 N
- Sulfatilamida: Se disolvió 0.06 en 50 mL HCl 4 N
- NaOH: Se disolvió 32 g en 200 mL agua.
- Bromuro de potasio: Se pesa 0.058 g y se afora a 10 mL.

La curva patrón se realizó con  $\text{NaNO}_3$ , se realizaron dos curvas patrón, una con concentración de 10 a 40 mg/L y otra de 100 a 400 mg/L.

La manera de realizar la curva patrón fue la siguiente:

1. Se tomó 1 mL de muestra, y se añadió 0.5 mL de sulfatilamida, se agitó y se espera 8 minutos.
2. Se le añade 0.05 mL de NED, se agita y se espera 10 minutos.
3. Se leyó su absorbancia a 540 nm.

Los resultados fueron para la primer curva patrón fueron los siguientes.

**TABLA 5. DATOS PARA CURVA PATRÓN DE NANO3.**

<b>Concentración [ppm]</b>	<b>Absorbancia (540nm)</b>
10	0.022
14	0.034
20	0.055
23	0.068
29	0.089
36	0.116
40	0.13
45	0.145

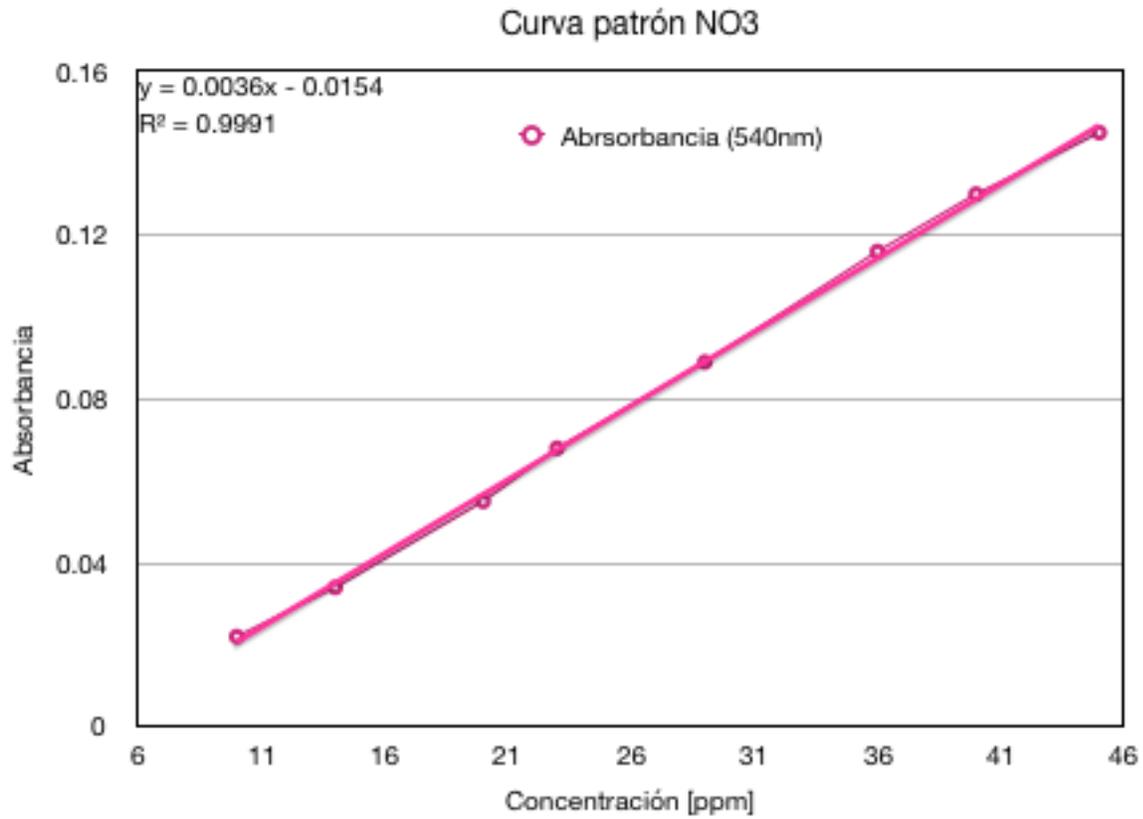


Figura 24. Gráfico curva patrón 10-40 mg/L.

**TABLA 6. DATOS CURVA PATRÓN.**

Concentración [ppm]	Absorbancia (540nm)
100	0.037
140	0.049
200	0.068
230	0.075
290	0.092
360	0.115
400	0.125
450	0.138

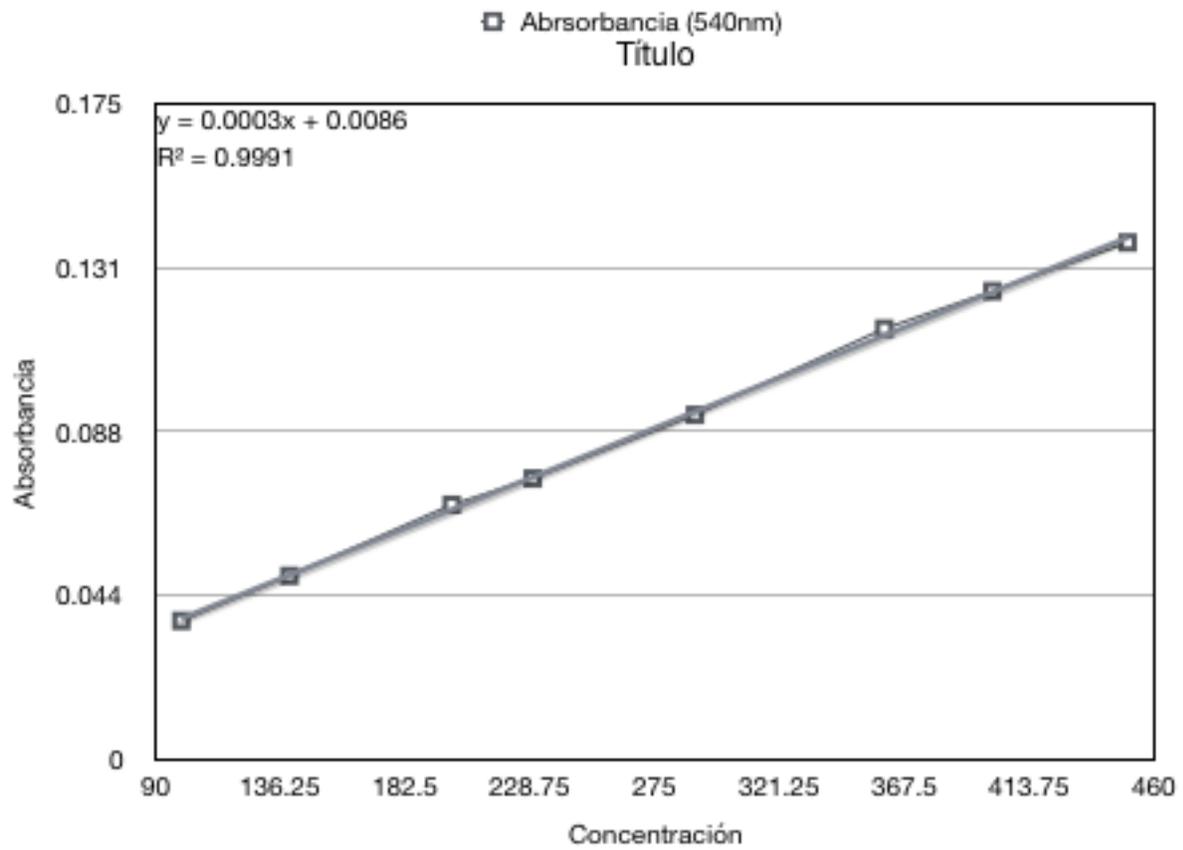


Figura 25. Gráfico curva patrón 100-450 mg/L.

## 7.5 Tabla resultados en la cuantificación de nitrato.

**TABLA 7. VALORES PROMEDIO DE LA CUARTA ETAPA EXPERIMENTAL PARA LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE 40 MG DE AMONIO.**

<b>Día</b>	<b>Concentración mg/L NO3</b>	<b>Concentración mg/L NH4</b>
1	3.9556	36.0444
2	10.3556	29.6444
3	15.4139	24.5861
4	17.2056	22.7944
5	18.7972	21.2028
8	20.3819	19.6181
9	23.2278	16.7722
10	25.2528	14.7472
11	30.2028	9.7972
12	31.2611	8.7389
15	39.2778	0.7222
16	39.3917	0.6083
17	39.4667	0.5333
18	39.5667	0.4333
19	39.6306	0.3694
22	39.6972	0.3028
23	39.8083	0.1917
24	39.8556	0.1444
25	39.9028	0.0972
26	39.9528	0.0472

**TABLA 8. VALORES PROMEDIO DE LA CUARTA ETAPA EXPERIMENTAL PARA LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE 167 MG DE AMONIO.**

<b>Día</b>	<b>Concentración [mg] NO3</b>	<b>Concentración [mg] NH4</b>
1	1.3333	167.1667
4	13.0000	155.5000
5	23.6667	144.8333
6	73.1667	95.3333
7	92.5000	76.0000
8	107.8333	60.6667
11	166.5000	2.0000
12	166.5000	2.0000
13	166.8333	1.6667
14	167.0000	1.5000
15	167.1667	1.3333
18	167.1667	1.3333

**TABLA 9. VALORES PROMEDIO DE LA CUARTA ETAPA EXPERIMENTAL PARA LA CONCENTRACIÓN DE 275 MG DE AMONIO.**

<b>Día</b>	<b>Concentración [mg] NO3</b>	<b>Concentración [mg] NH4</b>
1	1.0000	274.0000
4	81.0000	194.0000
5	88.3333	186.6667
6	152.1667	122.8333
7	181.6667	93.3333
8	204.5000	70.5000
11	275.5000	-0.5000
12	275.5000	-0.5000
13	275.8333	-0.8333
14	276.1667	-1.1667
15	276.3333	-1.3333
18	276.1667	-1.1667

