

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Efecto de Diferentes Soportes Naturales en la Nitrato Reducción Catalizada por
Sistemas de Biopelículas

Por:

FERNANDO OCAÑA DE LA CRUZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre de 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Efecto de Diferentes Soportes Naturales en la Nitrato Reducción Catalizada por
Sistemas de Biopelículas

Por:

FERNANDO OCAÑA DE LA CRUZ

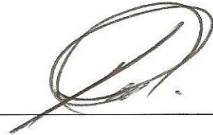
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

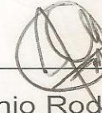
Aprobada



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Asesor Principal



M.C. María Teresa Ruiz de León
Coasesor



Dr. José Antonio Rodríguez de la Garza
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre de 2013.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

JESUS OCAÑA RAMIREZ Y JESUS DE LA CRUZ ZARATE

Con cariño, respeto y amor, por el apoyo que me brindaron y valores que me inculcaron durante toda mi formación, por el sacrificio y esfuerzo que realizaron al apoyarme para alcanzar mis objetivos y así recibirme como Ing. en Agrobiología. Gracias por depositar su confianza en mí siempre, se los agradeceré por toda la vida, dedicada para ustedes especialmente.

A MIS HERMANOS:

JOSE ANGEL, JUAN CARLOS, JORGE HUMBERTO, AIME Y GABRIELA.

Con mucho aprecio, respeto y amor para todos ustedes que a pesar de la distancia y el tiempo que estuve lejos de ustedes, siempre me dieron ánimos de seguir adelante, con sus consejos tan sabios y su prudencia positiva hacia mi persona, gracias por creer en mí y por nunca dejarme solo en todo momento.

A MI FAMILIA:

En general a cada uno y todos mis tíos, primos, sobrinos quienes siempre estuvieron dando ánimos a seguir luchando por alcanzar mi sueño. Así también a todos mis amigos de Chiapas por estar siempre con migo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional y compartirlo con cada uno de mis seres queridos.

A Mis Padres:

Jesús Ocaña Ramírez y Jesús De la Cruz Zarate

A mi madre, por ser el pilar más importante y darme la vida, por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional sin importar la distancia y el tiempo que estuvimos lejos. A mi padre, a pesar de nuestra distancia, siento que siempre estuviste a mi lado recorriendo cada sendero y luchando junto a mí por llegar a realizar mis sueños.

Dr. Silvia Yudith Martínez Amador, por haberme apoyado en la elaboración de la tesis y por sus consejos muy sabios, por su dedicación al trabajo de investigación y apoyarme en todos momentos de una manera prudente en lo moral y académico.

A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

Y a todos mis amigos, que siempre estuvieron conmigo en cada uno de mis momentos, siempre los recordare especialmente amigos:

Emilia, Beyanira, Jazmín, Ana Cristina, Karina, Laura, Elizabeth, Coraquetzally, Diana, Mario, Gil, entre otros. Que gracias a su apoyo, y conocimientos hicieron de esta experiencia una de las más especiales en cada momento vivido en el transcurso de la carrera.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

DEDICATORIA	1
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE DE GENERAL	III
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE SIGLAS	VIII
RESUMEN	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
Hipótesis	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Evolución de los procesos de biopelícula y tecnologías innovadoras	5
2.1.1 Biopelículas	5

2.1.2 Características de la biopelícula...6

2.1.3 Composición microbiológica...6

2.1.4 Formación de la biopelícula...7

2.2 Propiedades de las biopelículas...8

2.2.1 Heterogeneidad...8

2.3 Diferentes procesos son responsables del desprendimiento de biomasa de la biopelícula, y cuatro categorías de desprendimiento pueden ser distinguidas...9

2.3.1 Soportes utilizados para la inmovilización de microorganismos en el tratamiento anaerobio...10

2.4. Soportes utilizados en la fase experimental...11

2.5 Nitrificación, Desnitrificación, Reducción Desasimilativa de Nitrato a Amonio (RDNA) y Oxidación Anaerobia de Amonio (ANAMMOX)...13

2.5.1.1 La Nitrificación...13

2.5.1.2 La Desnitrificación...17

2.5.1.3 Reducción Desasimilativa de Nitrato a Amonio (RDNA)...21

2.5.1.4 Oxidación Anaerobia de Amonio (ANAMMOX)...22

2.5.2 Aplicación del tratamiento anaerobio en aguas residuales contaminadas con iones nitrato...24

III. METODOLOGÍA...29

3.1 Descripción del sitio...29

3.2 Procedimiento...29



PDF Complete

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

3.3 Terminología y descripción de elementos utilizados... 30

3.4 Material, equipo y reactivos utilizados durante la parte experimental de la tesis... 31

3.5 TÉCNICAS DE ANÁLISIS UTILIZADAS DURANTE LA INVESTIGACIÓN... 32

3.5.1 Técnica para determinar amoniaco por el método de Nesslerización... 32

3.5.2 Técnica para determinar la Demanda Química de Oxígeno (DQO)... 36

3.5.3 Determinación del ion nitrato mediante la técnica de ácido cromotrópico... 38

3.6 Diseño experimental... 40

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN... 41

V. CONCLUSIÓN... 50

VI. LITERATURA CITADA... 51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de Varianza de Consumo de Nitrato de efectos de cinco especies catalizadas por biopelículas, así como las horas y la interacción entre especies x horas 41

Cuadro 2. Comparación de medias de cinco especies utilizadas como soporte para el desarrollo de una biopelícula nitrato reductora para el caso de Consumo de Nitrato 42

Cuadro 3. Comparación de medias de cinco especies utilizadas como soporte para el desarrollo de una biopelícula nitrato reductora para el caso de Consumo de Nitrato en horas 44

Cuadro 4. Análisis de Varianza de la Demanda Química de Oxígeno de efectos de cinco especies catalizadas por biopelículas, así como las horas y la interacción entre especies x horas 46

Cuadro 5. Comparación de medias de cinco especies utilizadas como soporte para el desarrollo de una biopelícula nitrato reductora para el caso de Consumo de la Demanda Química de Oxígeno 47

Cuadro 6. Comparación de medias de cinco especies utilizadas como soporte para el desarrollo de una biopelícula nitrato reductora para el caso de Consumo de la Demanda Química de Oxígeno en horas 49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acoplamiento entre la desnitrificación y la ANAMMOX para la eliminación de nitrógeno: desnitrificación; ANAMMOX; foe, fuente orgánica de electrones 24

Figura 2. Reacción después del proceso químico y resultado de la DQO 37

Figura 3. Resultados del consumo de cinco especies en el proceso de la nitrato reducción 43

Figura 4. Resultados del tiempo transcurrido para que se efectuara el proceso de nitrato reducción 45

Figura 5. Reacción de la Demanda Química de Oxígeno en base a las especies 48

INDICE DE SIGLAS

- AMO $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Enzima Amonio Mono-oxigenasa
- ANAMMOX $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Oxidación Anaerobia de Amonio
- BAO $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Bacterias Oxidantes de Amonio
- BNO $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Bacterias Oxidantes de Nitrito
- DQO $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Demanda Química de Oxígeno
- EPS $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Polímeros Extracelulares Secretados
- HAO $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Hidroxilamina Óxido-reductasa
- HCl $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Ácido Clorhídrico
- H₂SO₄ $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Ácido Sulfúrico
- MACM $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Mezcla de Atrapamiento de Células Microbianas
- mg/l $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Miligramo por Litro
- mmol $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Milimoles
- NaNO₃ $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Nitrato de Sodio
- NH₄⁺ $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Amonio
- NOR $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Nitrito Óxido-Reductasa
- N₂ $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Nitrógeno Molecular
- N₂O $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Oxido Nitroso
- NO₃⁻ $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Nitrato
- RDNA $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Reducción Desasimilativa de Nitrato a Amonio
- RLLGE $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Reactor de Lecho de Lodo Granular Expandido
- SVS $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Sólidos Volátiles Suspendidos
- ZnSO₄ $\tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ} \tilde{\circ}$ Sulfuro de Zinc

RESUMEN

Las biopelículas son una serie de microorganismos organizados en forma de colonias adheridas a diferentes superficies. Los soportes pueden clasificarse dependiendo el origen, sintético como el polietileno, poliéster, vidrio y de origen natural como el bambú, carbón vegetal, tezontle y el coyonoxtle. A continuación se presentan los resultados de una investigación que se realizó en el Laboratorio de Biología del Departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, y el objetivo de la investigación fue evaluar el desempeño de sistemas de biopelículas en el proceso de nitrato reducción catalizada sobre biopelículas desarrolladas sobre cinco soportes. Los soportes fueron: escamas de conos de *Cupressus sempervirens* y *Pinus halepensis*, trozos de fibra de nopal (*Opuntia spp*), coyonoxtle (*Opuntia imbricata*) y viruta (restos de madera). Los experimentos se realizaron bajo un diseño complemente al azar con cinco repeticiones, en un arreglo factorial A x B mediante la prueba de Tukey. Como medio se preparo agua residual sintética de nitrato y acetato de sodio en una proporción 3:1, lodo anaerobio y los soportes. La reacción fue monitoreada por el consumo de nitrato y la demanda química de oxígeno. Se observó que en los reactores que contenían las escamas de conos, el consumo de nitrato fue lento de un 19.8 % a las 48 horas, en comparación de los demás tratamientos que alcanzaron un 100% de consumo de nitrato en 12 horas. Los resultados obtenidos en los reactores que contenían coyonoxtle, fibra de nopal y viruta no tuvieron diferencia significativa según la prueba de Tukey por lo cual, cualquiera de estos puede ser utilizado para obtener un buen porcentaje de remoción de nitrato. Mientras que para la DQO el coyonoxtle y la fibra de nopal fueron más eficientes en un 1.7 % en el periodo de 34 horas, mientras que en los tres soportes fue lento en un 5.1% en un lapso de 34 horas, según la prueba de Tukey.

Palabras claves: biopelículas, soportes naturales, nitrato reducción.

I. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales provienen del sistema de abastecimiento de agua de una población, después de haber sido modificadas por diversos usos en actividades domésticas, industriales y comunitarias, según su origen, resultan de la combinación de líquidos y residuos sólidos transportados por el agua que proviene de residencias, oficinas, edificios comerciales e instituciones, junto con los residuos de las industrias y de actividades agrícolas. La actividad humana está modificando la velocidad de algunos de los procesos involucrados en el ciclo natural del nitrógeno, produciendo acumulaciones de compuestos nitrogenados en las aguas y, en consecuencia, la contaminación de estas.¹⁴ Los niveles de nitratos en el agua potable pueden ser un indicador de la calidad del agua en general. Los niveles elevados de nitratos pueden sugerir la posible presencia de otros contaminantes, tales como microorganismos, pesticidas, fertilizantes, que podrían causar problemas de salud.

Las biopelículas son conglomerados de microorganismos donde predominan las bacterias heterótrofas impartiendo al conjunto adhesión gracias a la producción de polímeros extracelulares, principalmente polisacáridos. Las bacterias se agrupan en colonias con el objeto de buscar protección ante posibles condiciones adversas del medio.^{20, 34} Los microorganismos formadores de biopelículas poseen algunas ventajas sobre los microorganismos suspendidos: 1) mayor persistencia dentro del sistema; 2) mayores tasas de crecimiento; 3) mayor incremento en la actividad metabólica; y 4) mayor resistencia a la toxicidad.^{19, 34}

El ion nitrato es uno de los causantes de la eutroficación de los lagos, lagunas y estanques, este proceso consiste en el enriquecimiento de las aguas en nutrientes a un ritmo tal que no puede ser compensado por la eliminación o mineralización total, siendo una de las principales manifestaciones la proliferación de algas y macrófitos en función de la carga de nutrientes; aunque este proceso es natural, las actividades humanas pueden acelerar grandemente este proceso. Los niveles altos de nitratos en el agua potable pueden causar una enfermedad

potencialmente fatal en los infantes, principalmente en menores de seis meses conocida como síndrome del bebé azul o metahemoglobinemia.²⁸ El ion nitrato también es tóxico para el ganado, siendo frecuente el envenenamiento de estos por la concentración excesiva de este ion, ocasionada debido al uso de fertilizantes químicos o por prácticas que el hombre realiza como la administración de medicamentos a los animales. También hay acumulación excesiva de nitratos cuando las plantas están expuestas a bajas temperaturas y escasa luz solar, así como cuando tienen deficientes fuentes de minerales como fósforo y potasio.

Estudios sobre sulfato reducción y desnitrificación han demostrado que el ion sulfato y nitrato ejercen una inhibición indirecta sobre el proceso metanogénico, ya que los productos intermedios o productos de estos procesos resultan más tóxicos para la metanogénesis por ejemplo los óxidos nitrosos producidos en la desnitrificación y el sulfuro de hidrógeno producto final de la sulfato reducción. La desnitrificación transitoria y localizada en los suelos consiste en la reducción anaeróbica del nitrato a compuestos volátiles (N_2 , N_2O , NO). Es producida por bacterias que respiran y solamente pueden crecer anaeróbicamente en presencia de nitrato, por ejemplo *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus licheniformis*, *Paracoccus denitrificans* y *Thiobacillus denitrificans*.

La contaminación por nitratos en la actualidad, es un problema generalizado y creciente que afecta tanto a la calidad de las aguas superficiales como a las subterráneas. Esta contaminación de las aguas por nitratos es un problema causado principalmente por el uso masivo de fertilizantes nitrogenados y por la ineficaz gestión de purines en explotaciones ganaderas. La máxima preocupación entorno a la contaminación del agua por nitratos radica en el efecto que puede tener sobre la salud humana la ingesta de los mismos, bien disueltos en agua o bien en los alimentos. El consumo de agua con altas concentraciones en nitratos supone un riesgo para la salud, especialmente en los niños, provocando metahemoglobinemia, enfermedad caracterizada por inhibir el transporte de oxígeno en la sangre. Asimismo, los nitratos pueden formar nitrosaminas y nitrosamidas, compuestos potencialmente cancerígenos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar cual de los cinco soportes naturales es eficiente para aumentar la velocidad de consumo de nitrato de las biopelículas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer una metodología para eliminar la mayor cantidad de materia hidrolizable que pudiera interferir en las lecturas.
2. Evaluar el efecto del uso de conos de *Cupressus sempervirens* y *Pinus halepensis*, así como fragmentos de fibra de nopal (*Opuntia spp*), coyonoxtle (*Opuntia imbricata*) y viruta, sobre a la velocidad de consumo de nitrato por las biopelículas.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

HIPÓTESIS

Al menos el uso de uno de los soportes naturales potenciará la velocidad de consumo de nitrato en sistemas de biopelículas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

Los reactores con biopelícula cada vez se vuelven más importantes en el campo del tratamiento de aguas residuales. Las ventajas que ofrecen este tipo de sistemas en comparación con los sistemas de lodos activados incluyen: mejor respuesta ante altas cargas orgánicas, mejor estabilidad ante condiciones extremas de pH, temperatura y sustancias tóxicas, y la capacidad de disminuir volúmenes de construcción.^{58, 83} Estas ventajas son propiciadas por una gran concentración de biomasa en el reactor y por altas tasas de eliminación de contaminantes. Principalmente estos sistemas son apropiados o convenientes cuando se requieren organismos de lento crecimiento o cuando se tiene un pobre rendimiento de la biomasa.⁸³

2.1 Evolución de los procesos de biopelícula y tecnologías innovadoras.

La historia del tratamiento biológico de las aguas residuales se inicia a finales del siglo XIX precisamente con un proceso de biopelícula, un filtro biológico (Peters and Alleman 1982). Durante la primera mitad del siglo XX los sistemas de tratamiento basados en biopelícula, como los lechos bacterianos (filtros percoladores) dominaron la tecnología del tratamiento de aguas. Posteriormente, los sistemas de fangos activos, una vez caducada la vigencia de su patente, desplazaron en preferencia a los de biopelícula, en gran parte debido a un conocimiento más amplio de su funcionamiento y a un estancamiento en el desarrollo de la tecnología de biopelícula. En las últimas décadas, una serie de factores como el incremento en el volumen de agua residual, la limitación de espacio disponible y la promulgación de normativas ambientales cada vez más exigentes han promovido el desarrollo de nuevas tecnologías.⁵⁰

2.1.1 Biopelículas.

El término biopelícula (biofilm) hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados en un exopolímero compuesto de glicocálix (75%) y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas.

La biopelícula es una estructura compleja, formada por agregados celulares y huecos intersticiales. La biopelícula se forma sobre un soporte de origen natural o sintético. La estructura es morfológica y fisiológicamente distinta a la de cultivos libres (fangos activados).

2.1.2 Características de la biopelícula.

Los microorganismos están unidos a la superficie de un sólido que actúa como soporte. No es necesario separar los microorganismos del agua tratada para posteriormente recircularlos al reactor.

El sustrato, el oxígeno y los nutrientes deben ser transportados a través de la biopelícula hacia los microorganismos generalmente por difusión. La disposición de la biopelícula es distinta en cada sistema:

“ Lechos bacterianos: material soporte fijo en el reactor, a través del cual pasa el agua residual.

2.1.3 Composición microbiológica.

La biopelícula típica de los procesos de tratamiento de aguas residuales urbanas está formada por:

“ Bacterias: *Achromobacterium*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Zooglea*; también filamentosas (*Sphaerotillus*) y nitrificantes.

“ Protozoos: contribuyen al buen funcionamiento del proceso, al producir clarificación del efluente mediante depredación.

Hongos: producen más biomasa a igualdad de eliminación de sustrato y pueden producir bloqueos en el tránsito del agua (ramificaciones).

“ Algas: pueden captar nitrógeno y minerales del agua residual, así como suministran oxígeno al medio (<5% de la necesidad real)

2.1.4 Formación de la biopelícula.

En primer lugar, la superficie soporte sufre un acondicionamiento, debido al contacto con el agua residual. En segundo lugar se produce la adsorción bacteriana, en dos fases:

“ Adsorción reversible: colonizándose la superficie con bacterias gram negativas seguidas de filamentosas.

“ Adsorción irreversible de las células: se producen polímeros extracelulares (EPS) secretados hacia la superficie por las bacterias, formándose una matriz sobre la que quedan retenidos los microorganismos denominada glucocalix.

Los microorganismos aislados son más susceptibles que las colonias organizadas e incluidas en el exopolímero ya que forman una capa impermeable en donde sólo los microorganismos más superficiales se ven afectados. (Betancourth y col., 2004).

Lista de parámetros que influyen en la arquitectura de la biopelícula y por lo tanto dentro de los procesos de transporte:

- Exopolisacáridos.
- Desprendimiento.
- Transferencia de masas.
- Fisiología de células.
- Interacciones célula a célula.
- Materia particulada.
- Morfología de la biopelícula.
- La escala.
- Población microbiana.
- Distribución microbiana.
- Actividad predadora.
- Hidrodinámica.

- Tipo de sustrato.
- Concentración del sustrato y cinética.
- Comportamiento electrostático del medio ambiente.
- Propiedades físico químicas del medio ambiente.
- Tipo de sustrato.
- Rugosidad del sustrato.

2.2 Propiedades de las biopelículas.

Las biopelículas son altamente heterogéneas en estructura. Esto tiene un impacto significativo sobre como la biopelícula crece y como ocurre el transporte de materiales dentro y fuera de la biopelículas, un proceso que mantiene la permanencia de la biopelícula en un estado más activo, pero el cual también resulta en sólidos suspendidos en el efluente.

2.2.1 Heterogeneidad.

Esta ha sido conocida por cerca de dos décadas que las biopelículas son usualmente espacialmente y temporalmente no uniformes. Wanner y Mujer (1986) propusieron modelos de procesos que podrían describir el desarrollo y el funcionamiento metabólico de las biopelículas en una dimensión, perpendicular al sustrato. La validez de estos modelos fue más tarde demostrada por varios investigadores usando micro electrodos y técnicas de crio-seccionamiento para establecer los perfiles totales constituyentes en la biopelícula. Más recientemente técnicas tales como el escaneo microscópico de láser confocal y la resonancia magnética nuclear han sido usadas para demostrar la heterogeneidad de las biopelículas.

Reciente investigación ha demostrado, sin embargo, que muchas biopelículas tienen no uniformidades en propiedades físicas (densidad, porosidad, difusión, etc) con profundidad, tan bien como en concentraciones constituyentes. Las biopelículas pueden no ser uniformes lateralmente, importante para el transporte advectivo, también como el transporte de difusión, en la biopelícula. Esto puede

destacar por las variabilidades en la diversidad microbiana y en los procesos de reacción en diferente lugar dentro de la biopelícula. Finalmente, las superficies de las biopelículas no son usualmente lisas; los contornos rugosos de la superficie impactan las hidrodinámicas del paso del flujo de la biopelícula, y consecuentemente el transporte de masas de medio líquido a través de la biopelícula.

2.3 Diferentes procesos son responsables del desprendimiento de biomasa de la biopelícula, y cuatro categorías de desprendimiento pueden ser distinguidas.

1. Abrasión
2. Erosión
3. Desprendimiento de secciones de biopelícula (sloughing)
4. Ataque por predadores

La abrasión y la erosión se refieren a la remoción de pequeños grupos de células de la superficie de la biopelícula. Estos procesos de desprendimiento están diferenciados por su mecanismo. La erosión es causada por fuerzas resultantes del movimiento de fluido en contacto con la superficie de la biopelícula, mientras que la abrasión es causada por la colisión de partículas, por ejemplo durante el deslavado. Sloughing, en contraste se refiere al desprendimiento de relativamente grandes cantidades de partículas cuyo tamaño característico es comparable o más o menos grande más que el espesor de la biopelícula misma. El desprendimiento de partes de la biopelícula ocurre cuando fuerzas externas exceden la resistencia interna dentro de la biopelícula. Por ejemplo durante el deslavado de reactores de biopelículas sumergidas, fuerzas externas son intencionalmente incrementadas por el bombeo de aire y agua dentro del reactor en rangos de flujo altos. Durante la fluidización, las partículas colisionan resultando en un desprendimiento de secciones de biopelícula. Sin embargo, aunque las explicaciones del mecanismo pueden ser estipuladas para algunos de los fenómenos de desprendimiento, otros no pueden ser bien explicados.

Por ejemplo, una explicación no suficiente puede ser dada de los eventos de desprendimiento de secciones de biopelícula (sloughing) en filtros percoladores que ocurren según la estación. Además las explicaciones del mecanismo basadas en fuerzas externas y procesos internos influenciando la resistencia de la biopelícula, otras investigaciones han sugerido que la comunicación de célula a célula podría ser usada para explicar ciertos patrones de desprendimiento selectivo. El desprendimiento selectivo podría ser una explicación para el mantenimiento de una porosidad interna dentro de una biopelícula que incrementa la transferencia de masas total dentro de la biopelícula permitiendo el transporte por movimiento horizontal de un fluido (transporte advectivo). El desprendimiento de biopelícula es casi un campo de investigación emergente y los mecanismos reales que controlan el desprendimiento están lejos de empezar a ser bien entendidos.

El proceso total de desprendimiento será una combinación de procesos físicos, biológicos y químicos. Sin embargo, dependiendo del tipo de operación, un mecanismo de desprendimiento tal vez sea dominante. En biofiltros sumergidos, el deslavado está regularmente aplicado a remover exceso de biomasa para prevenir el atascamiento. La abrasión es proclive a ser el proceso de desprendimiento dominante en biofiltros sumergidos. Por otro lado, el desprendimiento de secciones de biopelícula (y tal vez erosión) serán el o los procesos de desprendimiento en filtros percoladores o de contacto biológico rotatorio. De esta manera, cuando aplican modelos matemáticos o cuando hacen experimentos de laboratorio, se debería tomar cuidado para implementar el modo apropiado de desprendimiento del sistema de biopelícula de interés.

2.3 Soportes utilizados para la inmovilización de microorganismos en el tratamiento anaerobio.

El interés por la identificación de las diferentes poblaciones bacterianas presentes en sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales ha ido en aumento durante las dos últimas décadas, ya que permite una mejor comprensión de los procesos involucrados en la depuración de aguas residuales.

Los soportes pueden clasificarse dependiendo del origen ya sea sintético o natural. De origen sintético como materiales de poliuretano, polietileno, poliéster, vidrio, cloruro de polivinilo, poliestireno, alúmina, etc., y de origen natural como el bambú, carbón vegetal, arcilla, piedra pómez, zeolita, arena, roca volcánica, antracita, tezontle, coyonoxtle, entre otros que han sido usados en diversas investigaciones con la finalidad de inmovilizar microorganismos.

2.4 Soportes utilizados en la fase experimental.

Opuntia imbricata

Planta parecida a un arbusto, que mide 5m de altura. Es carnoso y se ve como si estuviera hinchado; no tiene hojas y está provisto de espinas. Las flores son de color rosa fuerte y los frutos son carnosos, es originaria de México. Presente en climas semiseco y templado entre los 2000 y los 2750 msnm asociada a pastizal, matorral xerófilo, bosques de encino, pino y de juníferos. La composición química de *O. imbricata* se han aislado los alcaloides de isoquinolina mescalina, 3-4-dimetoxi-beta-fenetilamina, tiramina y 3-metoxi-tiramina. También se ha identificado el triterpeno cucurbitacina B. Esta planta produce daños mecánicos. Los animales comen los frutos, que tienen miles de glóquidas (pequeñas espinas), que se incrustan en los labios, llegando a formar una especie de cepillo; los borregos y las vacas son generalmente los que sufren este daño.

Cupressus sempervirens

Árbol que puede alcanzar 30 m de talla, con porte columnar o extendido. Corteza delgada de color pardo grisáceo, con largas fisuras longitudinales que no se exfolian. Ramillas cilíndricas, subtetrágonas, de alrededor de 1 mm de grosor. Hojas escamiformes, delgadas, aplanadas, con punta obtusa, deprimidas, imbricadas, de color verde oscuro mate, sin glándulas resiníferas. Inflorescencias masculinas terminales, de color amarillo. Inflorescencias femeninas terminales, solitarias o en grupos. Conos ovoideo-esféricos, de 2-3.5 cm de diámetro, de color verde, pasando a gris marrón lustroso en la madurez. Están formados por 10-14

escamas, con 8-20 semillas de ala estrecha por escama. Maduración bianual. Contiene una gran cantidad de lignina.

Opuntia sp.

El nopal es una planta silvestre que sobrevive en regiones desérticas y frías. No requiere de mucha agua para su cultivo, por lo que es una buena fuente de ingresos para muchos agricultores que no cuentan con los recursos necesarios y viven en zonas áridas o semiáridas. Se dice que tiene un papel ecológico importante, ya que detiene la degradación del suelo deforestado, o sea, convierte tierras improductivas en productivas. Los cladodios (pencas) están recubiertos por una cutícula del tipo lipídica, interrumpida por la presencia de los estomas mismos que permanecen cerrados durante el día. La cutícula del cladodio evita la deshidratación provocada por las altas temperaturas del verano. La hidratación normal del cladodio alcanza hasta un 95% de agua en peso. El Nopal contiene vitaminas A, Complejo B, C, minerales: Calcio, Magnesio, Sodio, Potasio, Hierro y fibras en lignina, celulosa, hemicelulosa, pectina, y mucílagos que en conjunto con los 17 aminoácidos ayudan a eliminar toxinas.

Pinus halepensis

Árbol de 15 a 20 m de altura y hasta 70 cm de diámetro normal. El tronco es macizo y tortuoso, de corteza gris rojiza y copa irregular. Estróbilos rojizos de forma oval de unos 10 cm de longitud. Acículas largas agrupadas de 2 en 2, muy flexibles y ligeramente amarillentas. Frutos: Conos o piñas ovoides, simétricos, de 8 a 12 cm de largo, de pedúnculo corto, color marrón claro amarillento, fructificación en otoño cada dos años. Nacen sobre pedúnculos cortos que se curvan hacia abajo permaneciendo en el árbol varios años. Los conos serótinos con una gran cantidad de lignina presente.

Viruta de madera

La madera es un material de origen orgánico. Es uno de los materiales más versátiles utilizado en diversas aplicaciones; desde muebles y objetos decorativos

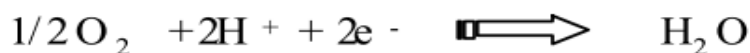
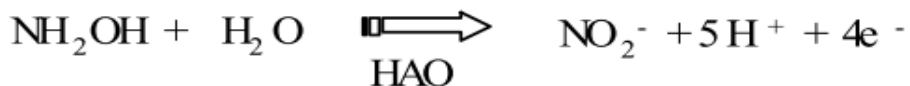
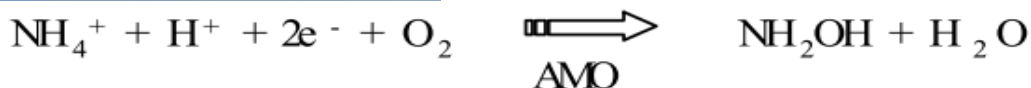
hasta elementos estructurales en la construcción de obras civiles. Es un recurso natural que podemos utilizar pero debemos ir renovando para garantizar la sostenibilidad de su uso y para la conservación del medio ambiente ya que los bosques desempeñan un papel fundamental en el ciclo del carbono minimizando los efectos adversos del cambio climático. La madera está constituida por componentes estructurales como la celulosa y lignina y componentes no estructurales como resinas, taninos, azúcares, almidón y otros.

2.5 Nitrificación, Desnitrificación, Reducción Desasimilativa de Nitrato a Amonio (RDNA) y Oxidación Anaerobia de Amonio (ANAMMOX).

2.5.1.1 La Nitrificación.

La nitrificación es un proceso aerobio realizado por microorganismos Gram-negativos litoautotróficos que pertenecen a la familia *Nitrobacteriaceae*, no son esporulados y pueden ser esféricos, bacilares o espirales.^{33,61} Los cultivos nitrificantes generalmente tienden a formar estructuras denominadas flóculos, cuya estabilidad parece depender de la formación de sustancias exopoliméricas.⁵¹ El proceso respiratorio nitrificante se lleva a cabo en dos etapas: 1) oxidación de amonio a nitrito y 2) oxidación de nitrito a nitrato. En cada una de ellas participan microorganismos de géneros diferentes, es decir, no se han identificado microorganismos que puedan convertir directamente el amonio a nitrato.^{61, 76}

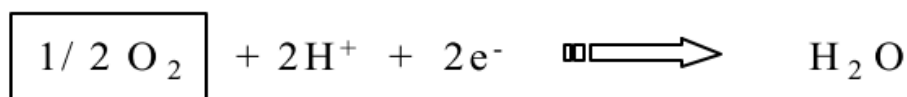
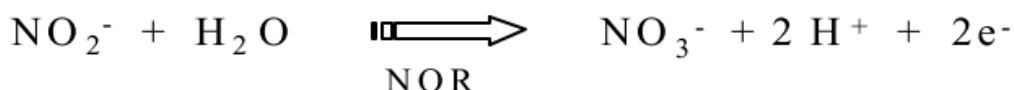
La oxidación del amonio se realiza por bacterias de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosolobus*, entre otros. En un primer paso, la enzima amonio mono-oxigenasa (AMO) transforma al amonio en hidroxilamina, que posteriormente se convierte en nitrito, mediante la hidroxilamina óxido-reductasa (HAO).^{42, 49}:



Dur

ante esta etapa ocurre el mayor consumo de oxígeno (4.33 mg O₂ / mg N-NH₄⁺ oxidado), además de que se generan iones hidrógeno, propiciando en el cultivo un descenso del pH.²⁷ La enzima AMO es membranal,⁴⁷ mientras que la HAO se localiza en el periplasma.³⁸ La oxidación de la hidroxilamina aporta 4 electrones, único sitio reductor en donde se genera energía, lo que explica por qué estas bacterias tienen un rendimiento de crecimiento muy bajo.

La oxidación del nitrito a nitrato la pueden realizar bacterias del género *Nitrobacter* y *Nitrosococcus*, por citar dos ejemplos, mediante la acción de la nitrito óxido-reductasa (NOR):



Esta enzima es un complejo enzimático formado por el citocromo c, una quinona y una deshidrogenasa dependiente del NADH. Esta reacción implica la generación de un potencial redox de +430 mV el cual se emplea en la fosforilación oxidativa y para la reducción del NAD.³³ De esta forma, el rendimiento celular es alrededor de 0.08 g células/g N-NH₄⁺ para las oxidantes de amonio y 0.05 g células/g N-NO₂⁻ para las oxidantes de nitrito.⁸²

Los valores de la constante de afinidad, K_s, descritos para ambas etapas de la nitrificación muestran variaciones notorias.⁷ Para la oxidación del amoniaco a nitrito, los valores de K_s van de 0.063 a 4.59 g N-NH₄⁺/m³, y para el nitrito a nitrato

van de 0.34 a 1.9 g N-NO₂-/m. Las variaciones tan grandes podrían deberse a que su determinación se realizó bajo una diversidad de condiciones experimentales, en consorcios microbianos (lodos) y cultivos axénicos.

Existen evidencias de que no todas las bacterias nitrificantes son litoautótrofas y aerobias estrictas. Por ejemplo, *Nitrosomonas* puede presentar una respiración facultativa si se cultiva en un medio anaerobio con nitrito e hidrógeno como fuente de energía.¹³ Por otro lado, *Thiosphaera pantotropha* puede desarrollarse heterotróficamente, como *Nitrobacter*, cuando crece en un medio con acetato.⁶⁴ Así, la eficiencia nitrificante disminuye por la mayor asimilación de nitrógeno.

Algunos de los factores ambientales que controlan la nitrificación y el crecimiento microbiano son la temperatura, el oxígeno y el pH. Se sabe que la velocidad específica de crecimiento (μ , h⁻¹) se modifica con la temperatura. En relación a esto, los valores de μ_{max} de cultivos axénicos caen dentro del intervalo entre 0.014 y 0.064 h⁻¹,⁶¹ en el intervalo de temperatura de 15 a 32 °C. En una planta de tratamiento el intervalo de velocidades puede ser más amplio.

El oxígeno parece ser la variable más importante en la nitrificación.⁷⁰ Los resultados son variables y suponen que la concentración de oxígeno disuelto sigue una relación tipo Monod:

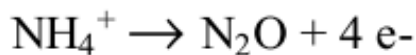
$$\mu = \mu_m [C]/K_c + [C]$$

donde C es la concentración de oxígeno disuelto y K_c es el coeficiente de saturación. Los valores promedio para la K_c varían entre 1.0 y 1.3 mg/l, aunque no se debe tomar como norma.⁸⁴

Como bien se sabe, la saturación depende de otras variables, destacando la temperatura y la concentración de los demás solutos presentes. *Nitrosomonas europaea* produce NO y N₂O a partir de hidroxilamina, cuando la concentración de

oxígeno disuelto es muy baja.⁴¹ Un caso especial es el de *Alcaligenes faecalis*, que bajo condiciones totalmente aerobias produce N_2O a partir de NH_4^+ y NO_2^- .

En los dos casos mencionados es escasa la información sobre el mecanismo que lleva a la formación de los óxidos de nitrógeno, sin embargo, es evidente el papel regulador que ejerce el oxígeno.^{4, 65} De algún modo, esto ya sugiere que los microorganismos nitrificantes pueden ser de respiración facultativa. El rendimiento energético para las bacterias nitrificantes es menor cuando se forman los óxidos nítrico y nitroso, que cuando se forma nitrato por la oxidación del amonio, dado el siguiente flujo de electrones:



Por lo tanto, el crecimiento de las bacterias nitrificantes será aún menor.²² De hecho, en función de la concentración de O_2 el proceso nitrificante se puede volver desnitrificante. De esta manera, se puede pensar que la formación de NO y N_2O es una ruta de emergencia para la obtención de energía cuando el oxígeno está limitado.

En relación al pH, se ha observado que la K_s de *Nitrosomonas* para la fuente nitrogenada aumenta a valores ácidos, por lo que se ha concluido que el sustrato para la oxidación es el amoniaco y no el ión amonio.⁴⁵ Sin embargo, es necesario más trabajo para desligarlo de otros eventos que el propio cambio de pH implica. Podría generalizarse que los nitrificantes se ven favorecidos por un ambiente alcalino próximo a un pH de 8. La nitrificación se detiene por completo a valores por debajo de 5,⁶¹ aunque no es claro si el agente causal es el pH o la acumulación de ácido nitroso, el cual inhibe la oxidación de amonio.⁶

Uno de los métodos ampliamente utilizados en la eliminación de nitrógeno presente tanto en aguas residuales urbanas como en gran parte de las aguas industriales, es la combinación de los procesos biológicos de nitrificación y desnitrificación. En la nitrificación el amonio se oxida secuencialmente a nitrito y nitrato mediante la intervención de dos grupos distintos de bacterias autótrofas: las bacterias oxidantes de amonio (BAO) que realizan la oxidación de amonio a nitrito, y las bacterias oxidantes de nitrito (BNO) que llevan a cabo la oxidación del nitrito a nitrato. La desnitrificación, reducción de nitrato a nitrógeno molecular en condiciones anóxicas, es llevada a cabo por diferentes géneros de bacterias, tanto heterótrofas como autótrofas.

2.5.1.2 La Desnitrificación.

Una vez que se ha oxidado el amonio a nitrato, este último puede ser reducido a N_2 mediante la desnitrificación biológica.⁴⁸ La desnitrificación es un proceso respiratorio anaerobio heterótrofo del tipo anóxico (similar al de los microorganismos de respiración aerobia) donde la reducción del nitrato hasta N_2 sigue una serie de pasos que involucran la actividad de enzimas diferentes.⁷⁴

Los géneros desnitrificantes más citados incluyen, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera*, entre otros. La mayoría de ellos son heterótrofos, pero algunos pueden crecer autotróficamente en hidrógeno y CO_2 , o en compuestos sulfurados reducidos.⁷⁵ La mayoría de estos microorganismos poseen la enzima nitrato reductasa para reducir nitrato a nitrito. Algunas especies, como *Pseudomonas aureofaciens*, no poseen la óxido nitroso reductasa, así que su producto final es N_2O .⁷²

El primer paso de la desnitrificación es la reducción de NO_3^- a NO_2^- , catalizado por la nitrato reductasa. Se han identificado dos tipos de nitrato reductasa, una membranal de tres subunidades (120, 60 y 20 kDa), que emplea ubihidroquinona en el transporte de electrones y cuyo centro activo se orienta hacia el citoplasma. La otra es una enzima soluble que se localiza en el periplasma, está formada por dos subunidades (94 y 19 kDa) y aún no está bien caracterizada.^{8, 69} En general,

se asume que la reducción de nitrato a nitrito ocurre a través de molibdeno como centro.^{49, 71}

El segundo paso es la reducción de NO_2^- a NO por medio de la nitrito reductasa. Se han identificado dos tipos, una contiene cobre, mientras que la otra contiene el hemo cd1.⁴⁶ La que contiene cobre es un homotrímero con dos átomos de cobre por monómero,³² mientras que la que contiene el hemo cd1 es un homodímero con un hemo c y un hemo d₁ por cada monómero.³⁰ La reducción de NO a N_2O , está catalizada por la óxido nítrico reductasa, localizada en la membrana citoplasmática.³⁵ Ha sido aislada de *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas stutzeri*. Está formada por una subunidad, de 16 kDa que contiene un hemo c y otra de 53 kDa que incluye un hemo b.¹⁵ De las enzimas de la desnitrificación, ésta es la menos caracterizada.⁴⁹

La última etapa de la desnitrificación es la reducción de N_2O a N_2 . Es llevada a cabo por la óxido nitroso reductasa, localizada en el periplasma. Contiene ocho átomos de cobre distribuidos en dos monómeros de aproximadamente 70 kDa, cada uno.^{5, 23} Esta enzima es severamente inhibida por la presencia de oxígeno.²⁹

Debido a esto, es importante evitar la entrada de oxígeno en el proceso desnitrificante para no liberar N_2O , gas que contribuye al efecto invernadero del planeta.⁴¹

Evidencias recientes han mostrado que la concentración de cobre en el influente de un reactor continuo desnitrificante juega un papel importante para evitar la acumulación de N_2O durante la eliminación de concentraciones altas de nitrato.¹⁸

La cinética de la desnitrificación se puede representar por el modelo de Monod, teniendo en cuenta ambos sustratos, de manera que:

$$\mu = \mu_m * \left[\frac{S}{K_s + S} \right] * \left[\frac{N}{K_n + N} \right]$$

donde S y N son, respectivamente, las concentraciones de los sustratos orgánicos y nitrogenados, y K_s y K_n sus respectivas constantes de saturación.⁸⁴ Se ha mencionado que el valor de la constante de saturación K_n del nitrato es muy baja (alrededor de 0.1 g N-NO₃⁻/l), por lo que la desnitrificación se considera como independiente de la concentración de nitrato. Esto no ha quedado claro, sin embargo, en el caso de aguas residuales con un alto contenido de nitrógeno, dado que se ha encontrado acumulación de intermediarios durante su tratamiento (Bernet *et al*, 1996; Catalan *et al*, 1997; Cervantes *et al*, 1998; Shing *et al*, 1996).^{9, 16, 18, 68} Al respecto, Betlach y Tiedje (1981) propusieron que la acumulación de intermediarios durante el proceso desnitrificante podría ser explicado por la siguiente secuencia de reacciones:



Cada paso tiene una velocidad específica que depende de las características cinéticas de cada enzima. Así, si las enzimas involucradas en los últimos pasos presentan una velocidad de reacción menor que las de la primera etapa, habrá la acumulación de intermediarios. Algunas evidencias encontradas en la literatura muestran concordancia con lo anterior. De hecho, se ha visto que la reducción del óxido nitroso es la etapa más lenta durante la reducción de nitrato a N₂, por lo tanto, hay acumulación de N₂O.¹⁷

Las evidencias han mostrado que la velocidad desnitrificante está asociada con el crecimiento microbiano y puede quedar descrita por la siguiente ecuación.³⁶

$$dS / dt = \left[\frac{\mu_{max}}{Y_d} \right] * \left[\frac{S}{K_d + S} \right] * [X_d]$$

donde X_d es la biomasa desnitrificante y Y_d , el rendimiento (g biomasa/g NO_3^-).

En consecuencia, será importante considerar la concentración de sustrato asimilable (y soluble) al ajustar la relación C/N para tener un proceso desnitrificante eficiente. De hecho, hay resultados que indican que la acumulación de N_2O en un proceso desnitrificante está también relacionada con la concentración de carbono orgánico en el sistema de reacción.⁶⁷

Una variable ambiental que también puede influir en la acumulación de intermediarios indeseables en un proceso desnitrificante es el pH. Se ha descrito que en condiciones ácidas (pH 6 o menor) se acumula ácido nitroso, muy tóxico para las bacterias.³¹ A valores de pH ligeramente alcalinos, el nitrato es convertido en N_2 .⁷⁴

Cabe decir que estos estudios del efecto del pH sobre la desnitrificación han sido realizados en cultivos en lote. En cultivo en continuo, por el contrario, no se observó acumulación de intermediarios de la desnitrificación en el intervalo de pH de 6 a 9, aun cuando se utilizó una velocidad de carga alta (1000 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L-d}$), pero el proceso si fue totalmente inhibido a pH de 5.⁵⁹

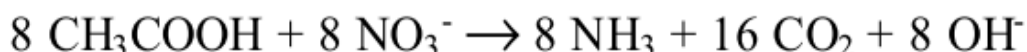
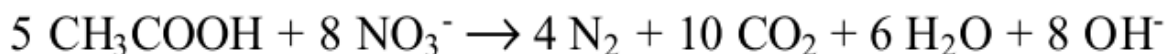
Considerando lo anterior, puede establecerse que la acumulación de intermediarios indeseables en un proceso desnitrificante no sólo es resultado de la inhibición de una enzima de la secuencia respiratoria, sino también a las condiciones de cultivo, tales como una relación C/N baja, la insuficiencia de iones cobre o molibdeno, tiempo de retención hidráulica corto respecto de la velocidad desnitrificante, el valor de pH y la presencia de oxígeno, entre otras.

2.5.1.3 Reducción Desasimilativa de Nitrato a Amonio (RDNA).

Otra forma de reducción del nitrato es la denominada reducción desasimilativa de nitrato a amonio (RDNA). Esta es realizada por una nitrato reductasa no asociada a la membrana, la cual emplea NADH y formato como donadores de electrones.⁴⁴ La presencia de la RDNA en un proceso de eliminación de nitrógeno de aguas residuales, impide la reducción del nitrato a N₂. Es por ello que a la RDNA se le considera un ~~pequeño~~ corto circuito dentro del ciclo del nitrógeno.²²

Uno de los factores ambientales que determinan considerablemente el tipo de ruta que seguirá el nitrato en su reducción, es la relación C/N. A valores bajos, se favorece la desnitrificación, y en estas condiciones se obtiene el mayor cambio de energía libre.⁵⁷

En cambio, generalmente se observa que a valores altos de C/N predomina la RDNA,³ ya que al limitarse los aceptores de electrones (el nitrato) se favorece la vía que permite un mayor grado de reducción (del propio nitrato), lo que se puede apreciar al comparar la estequiometría de ambos procesos:



No obstante, hay resultados que muestran una actividad desnitrificante hasta con relaciones C/N de 25 con una eficiencia del 85%, empleando glucosa o acetato como fuentes reductoras.³⁹ Es posible que la ruta de reducción del nitrato esté determinada por el tipo de fuente reductora. Se ha visto que las bacterias fermentadoras asociadas en un lodo metanogénico transforman parte del nitrato en amonio si están presentes sustratos fácilmente fermentables. En presencia de sustratos no fermentables, la desnitrificación es la vía respiratoria principal. Sin embargo, hay evidencias en reactores en continuo que muestran que es posible la desnitrificación con eficiencias mayores al 80%, empleando glucosa.⁶⁶ En ese

caso, la velocidad específica desnitrificante fue de 8.8 mg N/g SSV-h, que comparada con la obtenida con etanol (220 mg N/g SSV-h), fue mucho menor.⁵²

En otros trabajos no se encontró diferencia en la velocidad específica desnitrificante con distintas fuentes de electrones, tanto fermentables como no fermentables, pero con tiempos de retención hidráulica altos.²⁴ La variabilidad de resultados podría deberse al tipo de microorganismos presentes en los lodos evaluados o a las diferencias en las condiciones de cultivo practicadas, y parece que este último argumento tiene más peso. Al respecto, hay datos que indican que el tipo de inóculo (lodo) no influye en la determinación de la ruta de reducción del nitrato.⁶³

Se ha visto que cuando dos lodos estabilizados fisiológicamente, uno en condiciones metanogénicas y otro en condiciones desnitrificantes, son mezclados en diferentes proporciones, no muestran diferencia en la velocidad ni en la eficiencia desnitrificante cuando son incubados bajo condiciones desnitrificantes (C/N baja).²⁵

Esto parece indicar que es más importante el control de las condiciones ambientales del cultivo, que la actividad original de algunos lodos.

2.5.1.4 Oxidación Anaerobia de Amonio (ANAMMOX).

Se ha encontrado recientemente la formación de N_2 , a partir de nitrito y amonio, bajo condiciones anaerobias. Al proceso se le conoce como %ANAMMOX+ (siglas en inglés de oxidación anaerobia de amonio).⁵⁶ Se tienen datos que muestran que el proceso biológico es de tipo litoautotrófico, muy poco tolerante a la presencia de materia orgánica.^{77, 78, 79} Este proceso ha sido aplicado al tratamiento de aguas residuales con un contenido alto de nitrógeno y materia orgánica limitada, como los efluentes de digestores anaerobios.⁷³

Sin embargo, se ha mostrado que es posible la utilización simultánea de amonio y acetato como donadores de electrones para reducir el nitrato a N_2 , aún cuando el reactor fue alimentado con cargas muy altas de acetato (4 g C-Acetato/Ld).¹⁹

Una de las hipótesis que se plantean en torno a este fenómeno es que la alimentación de dos fuentes de electrones distintas, amonio y acetato, permitió dos vías reductoras diferentes, la ANAMMOX y la desnitrificación (Fig. 1), ambas llevando a la formación de N_2 .

Por lo tanto, el acoplamiento de la desnitrificación heterotrófica y la ANAMMOX litoautotrófica puede representar una alternativa para el tratamiento de aguas residuales con un alto contenido de nitrógeno y de materia orgánica.

Como el amonio es la forma nitrogenada más abundante en las aguas residuales, la adición de nitrato al influente del reactor permitiría la eliminación de amonio y materia orgánica por el acoplamiento de los procesos antes mencionados. Esto representaría una ventaja sobre los procesos depuradores convencionales, dado que la eliminación de amonio y materia orgánica ocurrirían en un solo reactor.

El proceso ANAMMOX ha sido aplicado también en el tratamiento de aguas residuales urbanas. El sistema incluye el empleo de un digestor anerobio en una primera etapa para eliminar la mayor parte de materia orgánica y de sólidos suspendidos. El amonio presente en el efluente del digestor anaerobio es parcialmente oxidado a nitrito (50 % de conversión) ⁴⁶ dando lugar a la eliminación simultánea de amonio y nitrito vía ANAMMOX en un proceso posterior.

La oxidación parcial de amonio a nitrito puede lograrse controlando el tiempo de retención hidráulico (proceso SHARON, siglas en inglés de reactor simple para una alta conversión de amonio a nitrito), o bien, ajustando la concentración del amonio (inhibidor de la oxidación de nitrito) en el reactor nitrificante.⁶ Uno de los inconvenientes del manejo del nitrito es su efecto tóxico elevado. Si el sistema de tratamiento no opera bien, se podría liberar nitrito al ambiente.

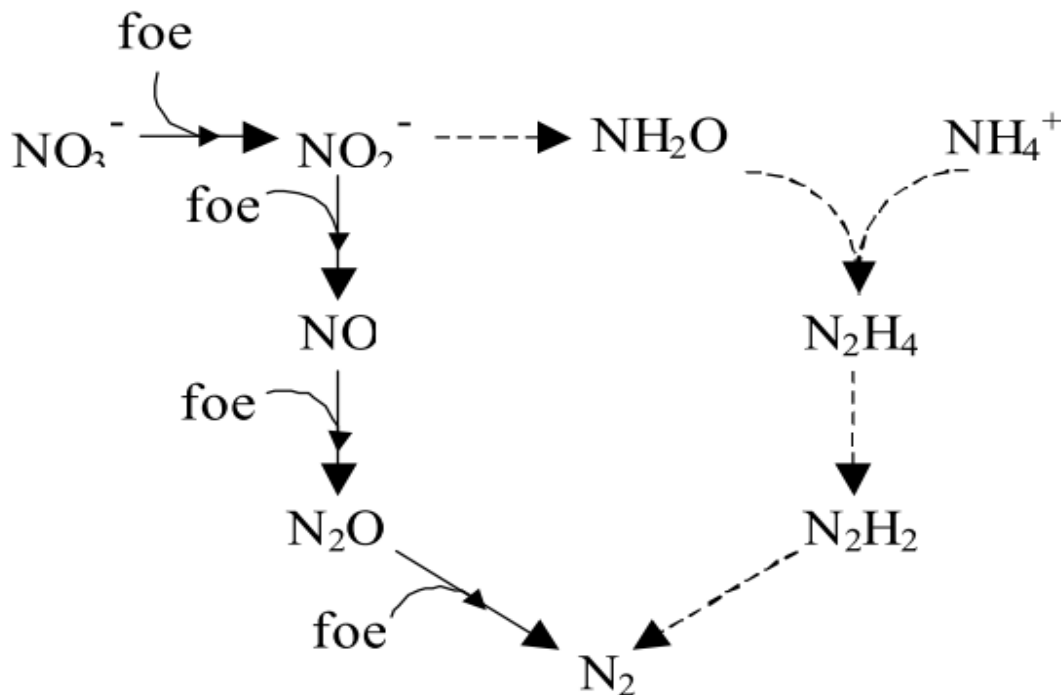


Figura 1. Acoplamiento entre la Desnitrificación y la ANAMMOX para la eliminación

2.5.2 Aplicación del tratamiento anaerobio en aguas residuales contaminadas con iones nitrato.

Panorama de la aplicación del tratamiento anaerobio en aguas residuales reales o sintéticas contaminadas con iones nitrato.

La desnitrificación se ha convertido en los últimos diez años en uno de los procesos biológicos más importantes, debido al alto potencial de reducción de compuestos nitrogenados como nitrato y nitrito y al corto tiempo en que los microorganismos participantes en la desnitrificación consumen estos compuestos.

El nitrógeno presente en aguas dulces es derivado de tres fuentes claves:

1. Agricultura
2. Aguas residuales domésticas y efluentes industriales.
3. Precipitación y deposición seca.

Grandes cantidades derivadas de derivados nitrogenados provenientes de la agricultura se han encontrado en medios acuáticos, y han sido reportados como tóxicos para la biota acuática.

Los parámetros importantes para lograr una desnitrificación exitosa son: el tipo de fuente de carbono siendo más fácil de consumir compuestos sencillos que complejos; la proporción C/N (DQO/NO_3^-) este oscila entre 3 y 7, aunque esto varía según el tipo de fuente de carbono; el potencial de iones hidrógeno siendo óptimo entre 7.0 y 7.5; la temperatura siendo óptima entre 30°C y 37°C; por último se consiguen mejores resultados con un lodo o consorcio inducido, aunque cabe mencionar que aún no teniendo estos parámetros en los rangos óptimos se puede conseguir la remoción de nitrato, pero con acumulación de nitrito y a una velocidad desnitrificante mucho más lenta. En la remoción de nitrato han sido utilizadas varias fuentes de carbono (donadores de protones) por ejemplo: metanol, acetato, etanol, lactato, propionato, compuestos más complejos como celulosa, lignocelulosa, fibras de algodón, excreta de cerdo, aguas residuales, compuestos aromáticos, etc.

Volokita y col. (1996), utilizaron fibras de algodón como fuente de carbono para la reducción microbiana de nitrato en agua potable mediante columnas empacadas con fibra de algodón sin procesar. El algodón (*Gossypium hirsutum*), sirve como substrato químico y soporte físico para la población microbiana. La remoción de nitrato fue rápidamente conseguida sin la formación de nitrito. La velocidad de desnitrificación dependiente del algodón (celulosa) fue afectada por cambios en la temperatura de 14°C fueron aproximadamente la mitad de velocidad observada en 30°C. El algodón fue enteramente consumido en el proceso.

Akunna y col. (1993), demostraron que la reducción de nitrato a amonio en lodo metanogénico el cual no ha sido previamente adaptado al nitrato, también depende de la naturaleza la fuente de carbono disponible. Con glucosa o glicerol, 50% del nitrógeno de la reducción de nitrato fue encontrada como amonio, mientras 100% del nitrato fue desnitrificado a nitrógeno gaseoso en presencia de

ácido acético o láctico. Estudios similares fueron obtenidos por Wilderer y col. (1987), en experimentos donde la adición de glucosa enriqueció a la población fermentativa, reduciendo el nitrato a nitrito, comparado a la adición de acetato donde una población de desnitrificantes verdaderos podría ser establecida. El nitrito es un intermediario durante ambas reacciones nitrato reducción a amonio ó bien nitrato reducción a nitrógeno gaseoso.

Christensen y col. (1994), encontraron que la demanda de DQO disminuyó (0.085 a 0.055 g DQO/mmol de NO_3^-) cuando el etanol fue usado como sustrato y se incremento con metanol (0.057 a 0.063 g DQO/mmol de NO_3^-).

Mohseni y col. (1998), estudiaron el efecto de tres fuentes de carbono sobre la desnitrificación, utilizaron medios con glucosa, metanol y ácido acético, la eficiencia más alta en la eliminación del $\text{NO}_3^- \text{N}$ fue lograda usando ácido acético como fuente de carbón comparada con el metanol y etanol. Al mismo tiempo, el utilizar el ácido acético ayuda a mantener el pH constante en el efluente. Los sólidos volátiles suspendidos (SVS) y la turbidez en el efluente usando ácido acético y etanol se encontraron cerca de 1.3 y 1.4 veces mejor que utilizando metanol como fuente de carbón, la proporción C/N requerido para la eliminación eficiente de nitrato fue 2.9, 2.35 y 4.3 respectivamente con metanol, etanol y ácido acético; también se encontró que una alta concentración de etanol en el reactor podría resultar en la formación de ácido acético.

Bilanovic y col. (1999), estudiaron el efecto de altas concentraciones de nitrato sobre la desnitrificación. Como fuentes de carbono se compararon el metanol, acetato de sodio y el efluente de un digestor anaeróbico (en una concentración de aproximadamente 800, 1500, 1500 mg/l de DQO respectivamente). La concentración de nitrato utilizada fue de 750 mg/l y la concentración de biomasa anaerobia oscila entre 4 y 5 g SVS/l, la desnitrificación se llevo a cabo en menos de un día con cualquiera de las tres fuentes de carbono, no se observó gran acumulación de nitrito, esto debido a la previa inducción del lodo al nitrato.

Zhang y Verstraete (2001), investigaron el potencial de combinación de metanogénesis y desnitrificación utilizando nitrito mediante un reactor de lecho de lodo granular expandido (RLLGE). Para el experimento en batch se utilizaron 390 mg DQO/l y tres diferentes concentraciones de nitrito (34, 58 y 62 mg NO₂/l). La velocidad de formación de metano se vio disminuida al aumentar la concentración de nitrito, ya que en el reactor con 34 mg de nitrito la producción de metano se aceleró a partir de las 50 h, mientras que en los casos de 58 y 62 mg de nitrito se retardo hasta las 160 h. En todos los casos el nitrito fue completamente desnitrificado entre un 97 a 100%. En los experimentos en el RLLGE la eficiencia de remoción de DQO alcanzó de un 92 a un 97%. Estos resultados demuestran que aunque el nitrito es un inhibidor potencial de la metanogénesis, pero que pese a esto, los procesos de desnitrificación y metanogénesis pueden ser integrados.

Hasselblad y Hallin (1998), realizaron un estudio de desnitrificación adicionando intermitentemente (cada 24 horas o 7 días) fuente de carbono adicional para lo cual utilizaron etanol. El acetato y el etanol, han demostrado dar una respuesta inmediata sobre actividad desnitrificante. 26, 38 La nitrato reducción en la planta a escala piloto incrementó tan pronto como el etanol fue adicionado. La concentración de nitrato en el efluente fue de 5 mg N/l fueron medidos primero después de 7 días de adición de etanol continua. Cuando el suministro de etanol fue parado la remoción de nitrógeno disminuyo inmediatamente y ésta incremento solo tan rápido cuando la adición de etanol fue reanudada. Esto aplicado para ambos 1 día y 6 días de no adicionar etanol. La capacidad desnitrificante no fue afectada por 1 día sin etanol pero después de 6 días sin etanol la capacidad desnitrificante cayó ligeramente.

Devlin y col. (2000), estudiaron el enriquecimiento con seis diferentes fuentes de electrones (acetato, hidrógeno, tiosulfato, azufre, ion ferroso y pirita) en un acuífero contaminado con ion nitrato. Concluyeron que el acetato es el substrato elegido para aumentar el potencial de la desnitrificación.

Akunna y col. (1993), realizaron pruebas usando reactores batch para determinar el potencial de la digestión del lodo sin inducir, para reducir nitrato y nitrito en presencia de cinco diferentes fuentes de carbono: glucosa, glicerol, ácido acético, ácido láctico y metanol. Se encontró acumulación de amonio en el medio con glucosa y glicerol. En los medios de cultivo con ácido acético, láctico y metanol, el amonio no fue detectado. La reducción de nitrato o nitrito en medios con ácido acético o láctico fue esencialmente actividad desnitrificante.

Qian y col. (2001), evaluaron la remoción directa de nitrato con una tecnología de mezcla de atrapamiento de células microbianas (MACM) usando etanol como fuente de carbono, para ello utilizaron tiempos de retención de cero a ocho horas y tres diferentes proporciones de empacamiento (con relación al volumen del reactor) de 35, 22, 12%. La proporción DQO/N fue aproximadamente de 6 y una concentración en el influente de 20 mg nitrato/l a una temperatura de 20 a 25°C. De acuerdo a los resultados obtenidos se obtuvo una mejor eficiencia de remoción de nitrato y DQO (mayor al 90% en los dos casos) a un TRH de 2.4 horas y con una proporción de empacamiento del 35% en donde se observo que el arranque de la desnitrificación fue menor.

Min Cao y col. (2002), utilizaron alcohol polivinílico como una matriz de gel para coinmovilizar bacterias nitrificantes y desnitrificantes por repetido congelamiento y descongelamiento. El estudio se llevo a cabo en un solo reactor ocurriendo una nitrificación y desnitrificación simultánea.

Hulshoff Pol y col. (2000), estudiaron la optimización de la remoción de acetato en reactores sulfidogénicos con adición de diferentes concentraciones nitrato en el último de los tres compartimentos de un reactor bafleado.

III. METODOLOGÍA

3.1 Descripción del sitio.

El experimento se realizó en el Laboratorio de Biología del Departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

3.2 Procedimiento.

Para efectuar el experimento se preparó un medio para las biopelículas con los siguientes soportes; viruta de madera, coyonoxtle, fibra de nopal y escamas de conos de *Pinus halepensis* y *Cupressus sempervirens*. Los cuales al inicio se colocaron en agua en el transcurso de un día para que expulsaran materiales químicos como celulosa, el proceso se realizó en el laboratorio de Biología de la UAAAN. Se decantó el soporte con el agua y se cambió nuevamente hasta llegar al tercer día. Posteriormente se sometieron a un tratamiento que consistió en una hidrólisis ácida, química y térmica, la cual se preparó utilizando 8 ml de H_2SO_4 y se agregó 100 ml de agua destilada, se preparó una porción de 5 litros en una porción de 400 ml de H_2SO_4 y 4600 ml de agua destilada, se sometió a agitación, en un matraz Erlenmeyer durante un periodo de 5 minutos a 10 giros para después ponerse a hervir durante una hora junto con el soporte esto con motivo de eliminar la mayor cantidad de celulosa y resina que contenían los soportes, se repitió el proceso durante cinco días hasta que al sexto día se puso a hervir solamente las escamas de pino y cupressus ya que ambas presentaban turbidez y eliminación de gran cantidad de resinas y celulosas aun, este proceso se repitió durante tres días más. Además se preparó el medio para que se desarrollaran las biopelículas, el cual consistió en mezclar acetato y nitrato de sodio en una porción de 3:1, teniendo que pesar 1.37 gr de nitrato de sodio y 6.9 gr. de acetato de sodio. El volumen total del reactor fue de 250 ml de los cuales se utilizó 120 ml donde se colocó cada uno de los elementos que conforman el experimento en las siguientes cantidades; 90 ml de acetato y nitrato de sodio, 10 gr de soporte y 15 ml de lodo anaerobio en cada reactor, cada soporte con cinco repeticiones los cuales se etiquetaron. Se realizó la curva de calibración de nitratos, la toma de

muestras se hizo cada 4 horas con las pipetas automáticas para que se colocaran en los viales enumerados previamente sometiendo a centrifugación para ser colocadas es refrigeración y después colocarlos en los tubos HACH con agua destilada y ácido de plata, ácido homotrópico y ácido sulfúrico concentrado, y por último se dejó enfriar por ser una reacción exotérmica en baño de hielo después se calentaron en un tiempo de 180 minutos para la toma de lectura en el HACH DR 5000 cada cuatro horas. se analizó en el HACH DR 5000 y también en el espectrofotómetro único 1110 para la curva de calibración de la Demanda Química de Oxígeno.

3.3 Terminología y descripción de elementos utilizados.

- Lodo anaerobio el cual fue traído de la planta de tratamiento de agua de la UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila. Del cual se utilizó volumen de 15 ml para reactores de 250 ml de capacidad.
- Soportes (*Opuntia imbricata*, viruta de madera, fibra de nopal, escamas de conos de *Pinus halepensis* y escamas de *Cupressus sempervirens*)

Los soportes utilizados fueron traídos de la parte del bajío de la UAAAN, fue recolectada en su estado seco y cortado en pedazos que oscilaban entre los 10 y 20 cm.

Por último, después de añadir los 120 gramos a los reactores, se les añadió 90 ml de acetato y nitrato de sodio, 10 gr de soporte y 15 ml de lodos residuales.

Reactores batch

Se utilizaron frascos de plástico de 250 ml de capacidad total (reactores con tapa de plástico enroscada) con 4 tapones de los tubos vacutainer para la toma de muestra, con lo cual se evita la fuga de gas.

Tiempo de monitoreo

Inicialmente y de acuerdo a los datos obtenidos en reactores batch mediante lodo granular anaerobio, motivo por el cual se establecieron 34 horas (3 días).

- Toma de muestras

La toma de muestras se realizaba mediante la extracción de líquido del reactor por medio de jeringas de 10 ml necesarias para la determinación de nitrato, cada 4 horas, hasta que estos no se detectaran, lo cual se hacía aproximadamente por espacio de 24 a 30 horas o más. Y para la determinación de DQO se extraía cada 20 y a las 34 horas las muestras.

- Parámetros determinados

Los parámetros monitoreados fueron: nitrato, y demanda química de oxígeno por métodos espectrofotométricos.

3.4 Material, equipo y reactivos utilizados durante la parte experimental de la tesis.

Material:

- Agitador magnético
- Buretas
- Gradillas de diferente tamaño
- Matraces de aforación de 100, 1000 y 2000 ml
- Matraces Erlenmeyer 125, 250 y 500 ml
- Papel filtro cualitativo
- Parafilm
- Probetas de 50, 100 y 500 ml, Kimax
- Reactores batch de plástico

- Tubos Hach con tapón de rosca
- Vasos de precipitado 100, 500 y 1000 ml, Kimax

3.5.1 Equipo

- Balanza analítica
- Centrífuga
- Espectrofotómetro HACH DR 5000.
- Parrilla de Calentamiento y de agitación
- Pipetas automáticas Labsystems de volumen variable: 20-200ml., 200-1000ml., 1-5 ml., 2-10 ml.

3.5.2 Reactivos.

- Acetato de sodio
- Acido sulfurico
- Agua destilada y desionizada
- Lodo anaerobio proveniente de una planta tratadora de agua residual de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
- Nitrato de sodio

3.5 TÉCNICAS DE ANÁLISIS UTILIZADAS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.

3.5.1 Técnica para determinar amoniaco por el método de Nesslerización.

De un pretratamiento antes de la nesslerización directa con sulfato de zinc y precipitadores de álcalis de calcio, hierro, magnesio, y sulfuro, los cuales forman turbidez cuando se tratan con el reactivo de nessler. Esto también remueve materia suspendida y algunas veces materia coloreada. La adición de EDTA o solución de sal de Rochelle inhibe la precipitación por calcio residual y iones de magnesio en la presencia del reactivo alcalino de nessler. Sin embargo, el uso de

EDTA demanda una cantidad extra de reactivo de nessler para asegurar un exceso de suficiente reactivo de nessler para reaccionar con el amoniaco.

Los colores amarillos a cafés producidos por la reacción nessler-amonia absorbe fuertemente en una concentración amplia de longitud de onda. El color amarillo característico de baja concentración de nitrógeno de amoniaco (0.4 a 5 mg/l) puede ser medido con una sensibilidad aceptable en la longitud de onda de 400 a 425 nm cuando 1 cm de la trayectoria de la luz es proporcionado. Una trayectoria de la luz de 5 cm extiende las medidas en el rango de concentración del nitrógeno de 5 a 60 µg/l. Los colores café rojizos típicos del amoniaco de niveles cercanos a 10µg/l pueden ser medidos en la longitud de onda de 450 a 500 nm. Una selección cuidadosa de longitud de onda y haz de luz permite la determinación fotométrica de concentraciones de nitrógeno amoniacal sobre un nivel considerable. Las desviaciones de la ley de Beer pueden ser evidentes cuando el fotómetro se equipa con filtros delgados de color. Por esta razón, prepare la curva de calibración bajo las condiciones idénticas a las que se adaptan las muestras.

Un reactivo de nessler preparado cuidadosamente puede responder bajo condiciones optimas tan bajas como 1 µg NH₃-N/50ml. En la nesslerización directa, esto representa 20 µg/L. Sin embargo, la reproducción por debajo de 100 mg/L puede ser errónea.

1. Aparatos

1.1.- Equipo colorimétrico, se requiere de alguno de los siguientes:

- Espectrofotómetro, para usar de 400 a 500 nm y provisto de haz de luz de 1cm o más larga.
- Filtro fotométrico, provisto de un haz de luz de 1 cm o más y equipado con un filtro violeta con una transmitancia de 400 a 425 nm. Un filtro azul puede ser utilizado para altas concentraciones de NH₃-N.
- Tubos de nessler, que sean iguales, 50 ml, largos.
- pH-metro, equipado con un electrodo de alto pH.

2. Reactivos.

Utilice agua libre de amoníaco para preparar los reactivos, enjuague, y hacer diluciones.

2.1.- Solución de sulfato de zinc: disuelva 100 gr. de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y diluya a 1 L con agua destilada.

2.2.- Reactivo estabilizador: use EDTA o sal de Rochelle para prevenir precipitación de calcio o magnesio en muestras sin destilar después de la adición de reactivo de nessler alcalino.

A) Reactivo EDTA: disuelva 50 gr. de EDTA en 60 ml de agua con 10 gr de NaOH. Si es necesario, aplicar calor suavemente para completar la disolución. Enfríe a temperatura ambiente y diluir a 100 ml.

B) Solución de sal de Rochelle: disuelva 50 gr. de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua. Remueva el amoníaco presente usualmente en la sal al hervir 30 ml de la solución, después de enfriar, diluir a 100 ml.

2.3.- Reactivo de nessler: disuelva 100 gr. de HgI_2 y 70 g de KI en una pequeña cantidad de agua y añada esta mezcla, agitando, a una solución fría de 160 g de NaOH disueltos en 500 ml de agua. Diluir a 1 L. Almacene en un contenedor de vidrio borosilicatado con tapón de hule y a resguardo de la luz para mantener la estabilidad del reactivo por hasta un año bajo condiciones normales de laboratorio. Verifique el reactivo para asegurar que conduce el color característico con 0.1 mg de $\text{NH}_3\text{-N/l}$ entre los 10 min., después de la adición y que no produce un precipitado con pequeñas cantidades de amoníaco a las 2 h. (PRECAUCION: tóxico, evite su ingestión.).

2.4.- Solución stock de amoníaco: disuelva 3.819 g de NH_4Cl anhidro, secado a 100°C , en agua, y diluir a 1,000 ml; 1.00 ml = 1.00 mg N = 1.22 mg NH_3 .

2.5.- Solución estándar de amoníaco: diluir 10.00 ml con agua; 1.0 ml = 10.00 μg N = 12.2 μg NH_3 .

2.6.- Soluciones de color permanente:

- A) Solución de cloroplatinato de potasio: disuelva 2.0 g de K_2PtCl_6 en 300 ml a 400 ml de agua, adicione 100 ml de HCl concentrado y diluir a 1 l.
- B) Solución de clorato cobaltoso: disuelva 12.0 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ en 200 ml de agua.
- C) Adicione 100 ml de HCl concentrado y diluir a 1 l.

3. Procedimiento.

a. Tratamiento de aguas sin destilar: si es necesario, remover los residuos de cloro de la muestra recién recolectada adicionando una cantidad equivalente de agente desclorinizante. (No almacene muestras cloradas sin desclorinización previa).

Adicione 1 ml de solución de $ZnSO_4$ a 100 ml de muestra y mezcle bien. Adicione de 0.4 a 0.5 ml de una solución de NaOH 6N para obtener un pH de 10.5, determinado con un pH-metro y con un electrodo de vidrio de pH-alto, y mezclar suavemente. Deje la muestra unos minutos en reposo, en su transcurso un precipitado floculante pesado se precipitara, dejando una supernata incolora.

Clarifique al centrifugar o filtrar. Examine cualquier papel filtro utilizado para estar seguro que no se presenta el amoniaco como contaminante. Haga esto al dejar correr agua a través del filtro y probando el filtrado por nesslerización. Filtre la muestra, desechando los primeros 25 ml. (PRECAUCION: puede perder amoniaco durante el tratamiento de muestras sin destilar por el pH alto. Diluir las muestras al rango sensible de nesslerización antes del pretratamiento).

b. Desarrollo de color:

1) muestras sin destilar: utilice 50 ml de muestra o una porción diluida a 50 ml con agua. Si la porción sin destilar contiene concentraciones suficientes de calcio, magnesio, u otros iones que producen turbidez o precipitado con el reactivo de nessler, adicione 1 gota (0.05 ml) del reactivo de EDTA o 1 a 2 gotas (0.05 a 0.1

ml) de solución de sal de Rochelle. Mezcle bien. Adicione 2 ml de reactivo de nessler si el reactivo EDTA es utilizado o 1 ml de reactivo de nessler si se utiliza sal de Rochelle.

2) Muestras destiladas: neutralice el ácido bórico utilizado para absorber el amoníaco destilado al adicionar ya sean, 2 ml de reactivo de nessler, un exceso que eleve el pH al nivel alto deseado, o alternadamente, neutralizando él ácido bórico con NaOH antes de agregar 1 m de reactivo de nessler.

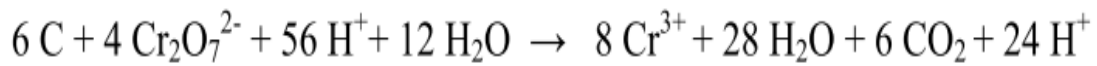
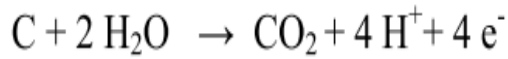
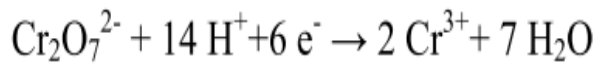
3) Mezcle muestras tapándolas con tapones limpios de plástico (lavadas muy bien con agua) e invirtiendo los tubos al menos 6 veces. Manténgalos en tales condiciones de temperatura y tiempo de reacción que el mismo blanco, muestras y estándares. Deje que se produzca la reacción por al menos 10 min. Después de agregar el reactivo de nessler. Mida el color en muestras y estándares. Si el NH_3N es muy bajo, utilice un tiempo de contacto de 30 min. para la muestra, blanco y estándares. Mida el color ya sea fotométricamente o visualmente como se menciona mas abajo.

c. Medición fotométrica: mida la absorbancia o transmitancia con un espectrofotómetro o un fotómetro con filtro.

3.5.2 Técnica para determinar la demanda química de oxígeno (DQO).

La materia orgánica es oxidada por el dicromato de potasio en un medio fuertemente ácido en presencia del catalizador (Ag_2SO_4 y H_2SO_4). La coloración pasa de un color amarillo a verde-azul y se lee a una absorbancia de 600 nm. Esta es la base de las mediciones de los reactores anaerobios las condiciones de los parámetros de operación para los tratamientos de efluentes industriales y urbanos.

Reacción:



amarillo

verde-azul

Figura 2. Reacción después del proceso químico y resultado de la DQO.

Materiales:

- 2 Dispensores de 1-5 ml o pipetas.
- Tubos de HACH con tapón rosca.
- Frascos ámbar de 1 litro
- Matraces de aforación de 1 litro.
- Baño con hielo.

Equipo:

- Espectrofotómetro HACH DR 2010
- Termoreactor TR-3000 MERK

Reactivos:

- Dicromato de potasio, ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
- Sulfato de Mercurio, (HgSO_4)
- Acido sulfúrico, (H_2SO_4)
- Sulfato de Plata, (Ag_2SO_4)

- Biftalato de Potasio, (HOOC-C₆H₄-COOK)

1. Solución Digestora para altas concentraciones (mayores a 75 mg DQO/l):

Secar durante 2 horas a 103°C, 20 g. de K₂Cr₂O₇ (Dicromato de Potasio). Enfriar en un desecador y pesar 10.216 g. de dicromato, pasar este dicromato a un matraz de aforación de un litro y añadirle 500 ml de agua destilada, adicionar 33.3 g de HgSO₄ (sulfato mercúrico), adicionar 167 ml de ácido sulfúrico concentrado lentamente por ser una reacción exotérmica en baño de hielo, por último aforar a 1 litro con agua destilada cuando la mezcla se haya enfriado, en el caso de que no todas las partículas se hayan disueltos, se mezcla con un agitador magnético, para después pasar esta mezcla a un frasco ámbar, ya que puede sufrir una descomposición por la luz. Pesar los reactivos en material de vidrio o plástico.

2. Solución de sulfato de plata en ácido sulfúrico: pesar con precisión 15 g de sulfato de plata, pasar este compuesto a un matraz de aforación de 1 litro, aforar a 1 litro con ácido sulfúrico concentrado, dejarlo reposar durante dos días en un lugar seco y oscuro para su completa disolución. Después pasar esta solución a un frasco ámbar.

3.5.3 Determinación del ion nitrato mediante la técnica de ácido cromotrópico.

Dos moles del ion nitrato reaccionan con una mol de ácido cromotrópico, con la formación de un producto amarillo. El máximo de la absorción del producto de reacción se observa a 410 nm el color se desarrolla en el transcurso de 10 min. Y es estable hasta por 24 h.

Las sustancias que interfieren la reacción son los oxidantes fuertes, así como también nitritos que forman con el ácido cromotrópico productos de color amarillo, sin embargo su interferencia puede ser considerada en el transcurso del análisis, para esto se le adicionan reductores tales como sulfito de sodio o la carbamida, la cual reacciona con los nitritos con la formación de nitrógeno gaseoso. La interferencia de iones como cloro e iones FeCl₄ se soluciona añadiendo una sal

de arsénico. Interfieren con bario, plomo, estroncio, los cuales forman un precipitado así como también yodo, iones de selenito, selenato, sin embargo estos no se encuentran con frecuencia en cantidades suficientes.

El ion cromato en concentraciones por arriba de 20 mg/l, interviene formando una sustancia coloreada.

1. Curva estándar de nitratos.

Se pesan 1.371 g/L de (NaNO_3), que contienen 1 g/l (Solución Madre). Hacer las diluciones correspondientes hasta obtener (0, 5, 10, 20, 30 y 40 mg/l), la curva de calibración se puede hacer dependiendo de las concentraciones utilizadas para los experimentos, ya sean mayores o menores a estas.

Materiales:

- Tubos de 13 x 100.
- Frascos ámbar de 0.5 y 1.0 litro
- Baño con hielo

Equipo:

- Espectrofotómetro para medir a una longitud de 410 nm.

Reactivos:

- Ácido cromotrópico [2,4, dihidroxinaftaleno-2,7,-ácido disulfónico]
 $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 2$
- H_2O
- Ácido sulfámico
- Ácido sulfúrico concentrado

1) Ácido cromotrópico: (AH) Pesar 0.125 g de ácido cromotrópico dihidratado y disolver en 54.5 ml de H₂SO₄ (concentrado). En caso de ser anhidro el ácido cromotrópico se pesan 0.11 g de este.

2) Ácido sulfámico: Prepararlo al 2% diluir en H₂O desionizada preferentemente o destilada

Procedimiento:

1) Colocar 1 ml (si la muestra excede los 50 mg de nitrato/l, es necesario hacer una dilución 1:10 o mayor de manera tal que las absorbancias no excedan a 1) de muestra en un tubo de ensaye de 10 ml dentro de un baño de hielo

2) Adicionar 0.04 ml de ácido sulfámico al 2%. (dejar reposar 4 minutos dentro del baño de hielo)

3) Agregar 0.4 ml de AH. (dejar reposar 3 minutos dentro del baño de hielo)

4) Finalmente depositar 2.56 ml de H₂SO₄ (Reposar 45 en el baño con hielo).

5) Leer en el espectrofotómetro a 410 nm.

6) Hacer un blanco con agua desionizada o destilada.

3.6 Diseño experimental.

Los experimentos se realizaron por quintuplicado, T1; *Pinus halepensis*, T2; *Cupressus sempervirens*, T3; *Opuntia imbricata*, (coyonoxtle), T4; *Opuntia sp* (fibra de nopal), T5; viruta, se estableció un diseño complemente al azar con cinco repeticiones en un arreglo factorial A x B donde A= ESPECIES y B=HORAS. Los datos fueron analizados usando el software R ver 2.14.1(R Development Core Team, 2011) utilizando la prueba de Tukey.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se muestran los resultados del análisis de varianza del efecto de cinco soportes naturales en la nitrato reducción catalizada por biopelículas, donde se determino diferencias altamente significativas, en las horas el porcentaje del coeficiente de variación fue aceptable, mientras que para las interacciones de las especies x horas, no existió diferencia significativa. Lo anterior fue analizado por el software R ver 2.14.1(R Development Core Team, 2011).

Cuadro 1. Análisis de Varianza de Consumo de Nitrato de efectos de cinco especies catalizadas por biopelículas, así como las horas y la interacción entre especies x horas.

Fuentes	gl	SC	CM	F	p
Especies	4	5.850	1.4626	13.7149	1.225e ^{-0.9**}
Horas	7	61.770	8.8242	82.7484	2.2e ^{-16 **}
Especies-Horas	28	4.404	0.1591	1.4917	0.06581 ^{NS}
Error	160	17.062	0.1066		

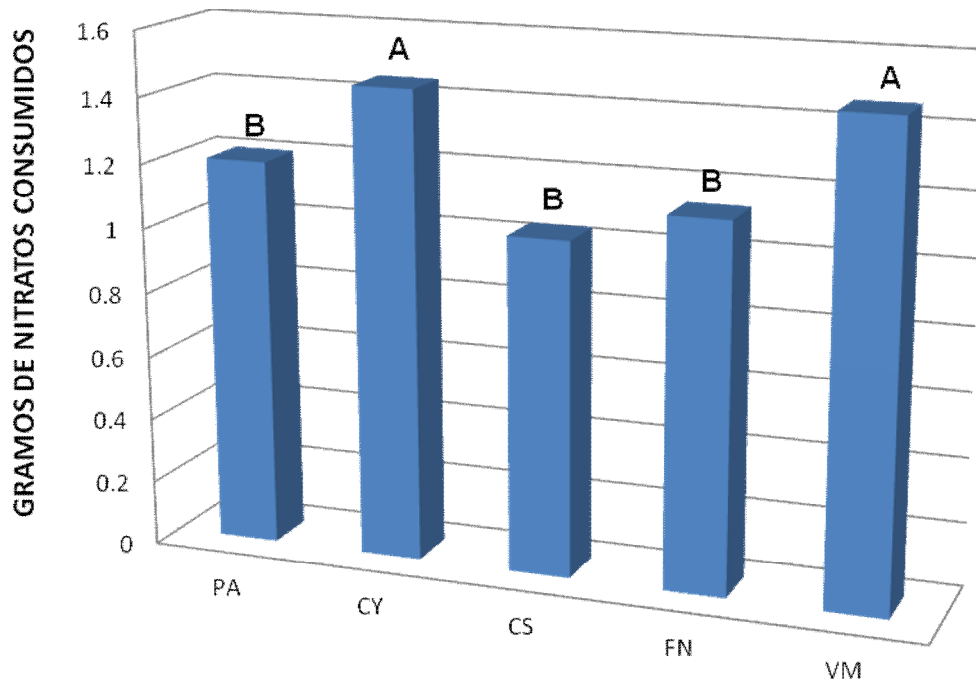
CV: Coeficiente de Variación (25.95%). **: Diferencia altamente significativas (p m0.01) NS: Diferencias No significativas.

En el cuadro 2 se muestran los resultados del análisis de varianza y comparación de medias de las especies para el consumo de nitrato. Mediante la comparación de medias se determinó cuales de las especies consumieron el nitrato en mayor porcentaje. Se puede observar que el CY (Coyonoxtle) y la VM (Viruta de Madera) demostraron tener el mayor número consumo de nitrato en comparación con los demás tratamientos, mientras que PA (*Pinus halepensis*), CS (*Cupressus sempervirens*) y FN (Fibra de Nopal) presentaron un consumo menor de nitrato según la prueba de Tukey ($p= 0.05$) todos obtuvieron una deferencia altamente significativa según se muestra.

Cuadro 2. Comparación de medias de cinco especies utilizadas como soporte para el desarrollo de una biopelícula nitrato reductora para el caso de Consumo de Nitrato

Tratamientos	Especies	Valores
T1	PA	1.204 B **
T2	CY	1.451 A **
T3	CS	1.037 B **
T4	FN	1.135 B **
T5	VM	1.463 A **

** : Diferencias altamente significativa. PA: *Pinus halepensis*. CY: *Coyonoxtle*. CS: *Cupressus sempervirens*. FN: *Fibra de nopal*. VM: *Viruta de madera*



	PA	CY	CS	FN	VM
■ ESPECIES	1.204	1.451	1.037	1.135	1.463

Fig. 3 Resultados del consumo de cinco especies en el proceso de la nitrato reducción.

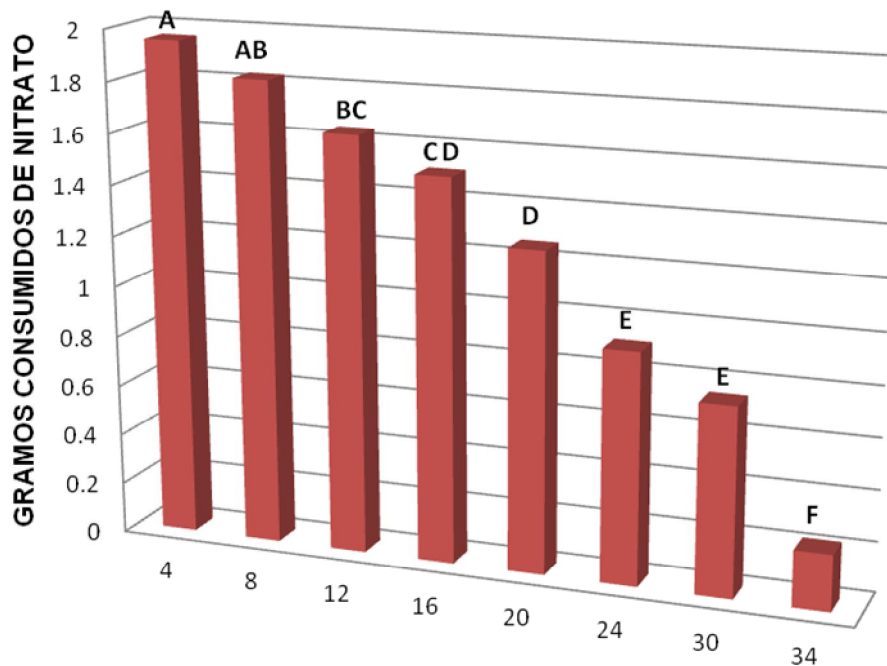
En base al consumo de nitrato por medio de las especies se registraron las siguientes lecturas (Fig. 3). Para el Coyonoxtle (CY) y la Viruta de madera (VM), se obtuvo 1.451 mg/l para CY y 1.463 mg/l para VM, consumiendo el nitrato en mayor cantidad mientras que para el *Pinus halepensis* (PA), *Cupressus sempervirens* (CS) y Fibra de Nopal (FN) el consumo fue lentamente. El objetivo fue Identificar: cual de los cinco soportes naturales es eficiente para aumentar la velocidad de consumo de nitrato, resultando la viruta de madera que de acuerdo a su composición la celulosa es un elemento primordial de esta, resultados obtenidos de trabajos con celulosa mientras mayor cantidad de carbono exista mayor será el consumo de nitrato según Hirata *et al*, 2001; y de acuerdo a los resultados obtenidos por Alvarado *et al*, 2007; en *Opuntia imbricata* (Coyonoxtle) se obtuvo la eficiencia en remoción de 1.8 mg/l de nitrato.

En el cuadro 3 se muestran los resultados del análisis de comparación de medias de las horas para el consumo de nitrato. Mediante la comparación de medias se determinó en que tiempo se consumió el nitrato en mayor porcentaje. Se puede observar que en el tiempo de cuatro horas y el tiempo de ocho horas demostraron consumir en mayor proporción el nitrato en comparación con los demás tiempos (horas de muestreo), en los cuales el nitrato se consumió en menor proporción según la prueba de Tukey ($p= 0.05$) obteniendo una diferencia altamente significativa según se muestra. Lo anterior demuestra que la concentración de ion nitrato es un estimulador de la reacción.

Cuadro 3. Comparación de medias de cinco especies utilizadas como soporte para el desarrollo de una biopelícula nitrato reductora para el caso de Consumo de Nitrato en horas.

Horas	Valores	
4	1.95504	A **
8	1.82568	AB **
12	1.64004	BC **
16	1.50644	CD **
20	1.26	D **
24	0.91104	E **
30	0.74472	E **
34	0.22304	F **

** : Diferencias altamente significativas.



	4	8	12	16	20	24	30	34
■ TIEMPO (HORAS)	1.95504	1.82568	1.64004	1.50644	1.26	0.91104	0.74472	0.22304

Fig. 4 Resultados del tiempo transcurrido para que se efectuara el proceso de nitrato reducción.

En base al tiempo de consumo del nitrato se registraron las siguientes lecturas (Fig. 4). Para el tiempo de cero a 4 horas se removió el nitrato, ya que al haber mayor cantidad de nitrato y acetato las bacterias realizan el proceso de degradación con mayor facilidad y con ello se adhiere rápidamente la biopelícula al soporte y crece de una manera consecuente. En base a los resultados obtenido se llego a la conclusión con Alvarado *et al*, 2007, donde la mayor parte de la remoción del nitrato se da en las primeras 3.3 horas de trabajo. Una concentración inicial de 1000 mg NO₃⁻/L es más alta que otras concentraciones que se han utilizado, así también se comparo con los estudios anteriores de desnitrificación realizado por Mosquera *et al*. 2003, en que se utilizaron 700 mg NO₃⁻/L inicialmente.

En el cuadro 4 se muestran los resultados del análisis de varianza del efecto de cinco soportes naturales en base a la Demanda Química de Oxígeno catalizada por biopelículas, donde no se obtuvo diferencias altamente significativas alguna, en las horas los porcentajes de los coeficientes de variación fueron altamente significativas, mientras que para las interacciones de las especies x horas, no existió diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.01$), se utilizó software R ver 2.14.1 (R Development Core Team, 2011) para el análisis de los datos.

Cuadro 4. Análisis de Varianza de la Demanda Química de Oxígeno de efectos de cinco especies catalizadas por biopelículas, así como las horas y la interacción entre especies x horas.

Fuentes	GL	SC	CM	F	P
Especies	4	0.0058	0.0014	0.4169	0.7958 ^{NS}
Horas	2	0.2491	0.1245	35.3084	7.321e ⁻¹¹ **
Especies-Horas	8	0.0149	0.0018	0.5311	0.8284 ^{NS}
Error	60	0.2117	0.0035		

CV: Coeficiente de Variación (61.5). **: Diferencia altamente significativas NS: Diferencias No significativas. $P < 0.01$

En el cuadro 5 se muestran los resultados del análisis de comparación de medias de las especies para la Demanda Química de Oxígeno. Mediante la comparación de medias se determinó que todas las especies en la Demanda Química de Oxígeno, no presentaron diferencia significativa alguna, según la prueba de Tukey ($p= 0.05$).

Cuadro 5. Comparación de medias de cinco especies utilizadas como soporte para el desarrollo de una biopelícula nitrato reductora para el caso de Consumo de la Demanda Química de Oxígeno.

Tratamiento	Especies	Valores
T1	PA	0.1100 A
T2	CY	0.0988 A
T3	CS	0.0969 A
T4	FN	0.0896 A
T5	VM	0.0839 A

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes. PA: *Pinus halepensis*. CY: *Coyonoxtle*. CS: *Cupressus sempervirens*. FN: *Fibra de nopal*. VM: *Viruta de madera*

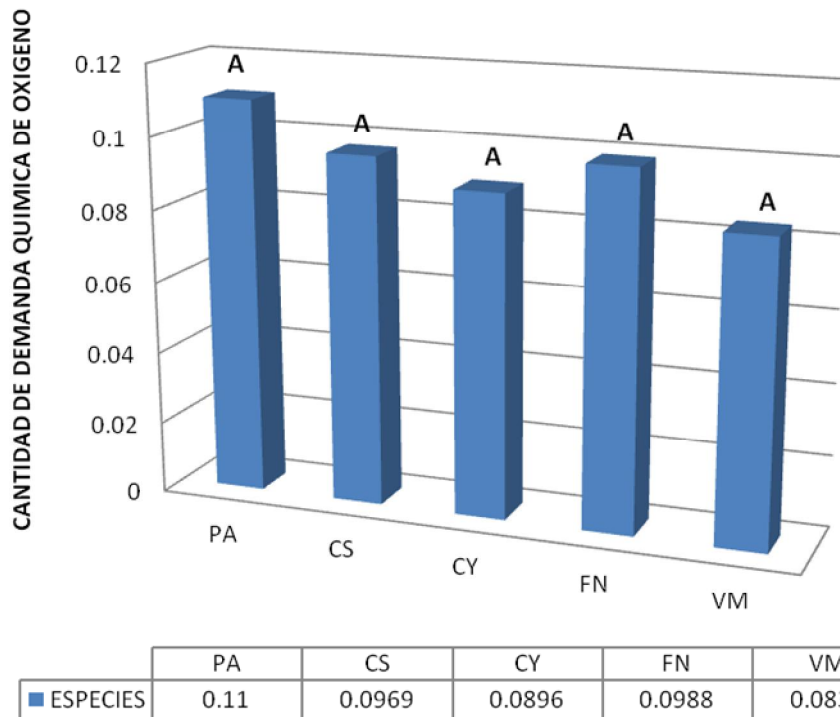


Fig. 5 Reacción de la Demanda Química de Oxígeno en base a las especies

La velocidad inicial a la que disminuye la concentración de nitrato a lo largo del reactor batch con las diferentes especies conteniendo biopelícula desnitrificante es más alta que la velocidad a la que disminuye la DQO, lo que indica que el proceso para la DQO no tiene diferencias significativa alguna en base a las especies por el tiempo en que se realizó el experimento. Esto según resultados de Alvarado *et al*, 2007; quienes trabajaron con *Opuntia imbricata* y obtuvo resultados similares.

En el cuadro 6 se muestran los resultados del análisis de comparación de medias de las horas para la Demanda Química de Oxígeno de efectos de cinco especies catalizadas por biopelículas. Mediante la comparación de medias se determinó que en base a el tiempo se realizo el proceso de la Demanda Química de Oxígeno en menor tiempo, esto según la prueba de Tukey ($p= 0.05$) todas las horas presentaron deferencia significativa alguna según se muestra.

Cuadro 6. Comparación de medias de cinco especies utilizadas como soporte para el desarrollo de una biopelícula nitrato reductora para el caso de Consumo de la Demanda Química de Oxígeno en horas.

Horas	valores
4	0.1720 A
20	0.0829 B
34	0.0326 C

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, los soportes que consumieron mas nitrato en menor tiempo fueron la Viruta de Madera seguido del Coyonoxtle, por lo cual, se recomienda la Viruta de madera para ser utilizado para la remoción de nitrato ya que en el caso de los conos del *Pinus* y el *Cupressus* debido al tratamiento siguieron liberando material orgánico.

VI. LITERATURA CITADA

1. Alvarado, R., Gaona, J., Mata, J., Martínez, S., Garza, Y. y J Rodríguez. 2007. Estudio del proceso de desnitrificación mediante biopelículas desarrolladas en *Opuntia imbricata* en un reactor de flujo continuo. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Morelia, Michoacán, México, 25-29 Junio.
2. Akunna J. C., Bizeau C. and Moletta R., 1993. Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic acid and methanol. *Water Res.*, 27, 1303-1312.
3. Akunna, J. C., C. Bizeau and R. Moletta. 1994. Nitrate reduction by anaerobic sludge using glucose at various nitrate concentrations: Ammonification, denitrification and methanogenic activities. *Environ. Technol.* 15:4149.
4. Anderson, I. and J. Levine. 1986. Relative rates of nitric oxide and nitrous oxide production by nitrifier, denitrifiers and nitrate respirers. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:938-945.
5. Andrew, C., J. Han, S. de Vries, J. van de Oost, B. Averill, T. Loehr and J. Sanders-Loehr. 1994. CuA of cytochrome c oxidase and the A site of N₂O reductasa are tetrahedrally distorted type 1 Cu cysteinates. *J. Am. Chem. Soc.* 116:10805-10806.
6. Anthonisen, A., R. Loehr, T. Prakasam and E. Srinath. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. W. P. C. Fed.* 48:835-852.
7. Beccari, M., D. Marani and R. Ramadori. 1979. A critical analysis of nitrification alternatives. *Water Res.* 13:185-192.
8. Berks, B., D. Richardson, C. Robinson, A. Reilly, A. Willis and S. Ferguson. 1995. The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem. J.* 309:983-992.
9. Bernet, N., F. Habouzit and R. Moletta. 1996. Use of an industrial effluent as a carbon source for denitrification of a high-strength wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:92-97.
10. Betancourth M., Botero J.E., Rivera S.P., 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*, 35 (3): 34-39
11. Betlach, M. and J. Tiedje. 1981. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide and nitrous oxide during bacterial denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:1074-1084.

12. Bilanovic D., Battistoni P., Cecchi F., Pavan P. and Mata A. J., 1999. Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. *Water Res.*, 33: 3311-3320.
13. Bock, E., I. Schmidt, R. Stueven and D. Zart. 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* 163:16-20.
14. Camargo J.A. and Alonso A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32(6), 831-849.
15. Carr, G. and S. Ferguson. 1990. The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* 269:423-429.
16. Catalan-Sakairi, M., P. Wang and M. Matsumura. 1997. High-rate seawater denitrification utilizing a macro-porous cellulose carrier. *J. Ferm. Bioeng.* 83:102-108.
17. Cervantes, F., O. Monroy and J. Gómez. 1998. Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol. Lett.* 20:959-961.
18. Cervantes, F., O. Monroy and J. Gomez. 1999. Influence of ammonium on the performance of a denitrifying culture under heterotrophic conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* In press.
19. Characklis, W. G. and Marshall, K. C. (1990). *Biofilms: A basis for an interdisciplinary approach* in *Biofilms*, Characklis, W. G. and Marshall, K. C. eds., Wiley and Sons, New York. pp 3-15.
20. Christensen, B. E. and Characklis, W. G. (1990). *Physical and chemical properties of biofilms* in *Biofilms*, Characklis, W. G. and Marshall, K. C. eds., Wiley and Sons, New York. pp 93-130.
21. Christensen M. H. and Harremoës P., 1994. Biological denitrification of sewage: a literature review. *Prog. Water Technol.*, 8: 509-555.
22. Cole, J. and C. Brown. 1980. Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:6572.
23. Coyle, C. L., W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, H. Körner and W. Jakob. 1985. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas perfectomarina*. Purification and properties of a novel multicopper enzyme. *Eur. J. Biochem.* 153:459- 467.

24. Cuervo, F. M., F. Martínez, M. GutiérrezRojas, A. Noyola and J. Gómez. 1998. Effect of volumetric loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in UASB reactors. V Latin American Workshop-Seminar Wastewater Anaerobic Treatment. Viña del Mar, Chile, 27-30 October.
25. De la Rosa, D., A. Castillo, F. Cervantes and J. Gómez. 1999. Remoción de carbono y nitrógeno en diferentes relaciones de lodos anaerobios y a dos relaciones C/N. VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería - IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería, Huatulco, Oaxaca, México, 12-17 septiembre.
26. Devlin F. J., Eady R. and Butler J. B., 2000. The effects of electron donor and granular iron on nitrate transformations rates in sediments from a municipal watersupply aquifer. *Contaminant Hydrology*, 46: 81-97.
27. Eckenfelder, W. 1989. *Industrial water pollution control*. p. 400, 2a ed. McGraw-Hill, Singapore.
28. Environmental Protection Agency, 1999. Sulfate in drinking water. <http://www.epa.gov/safewater/standard/sulfate.html>.
29. Ferguson, S. 1994. Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek* 66:89-110.
30. Fülöp, V., J. Moir, S. Ferguson and J. Hajdu. 1995. The anatomy of a bifunctional enzyme: structural basis for reduction of oxygen to water and synthesis of nitric oxide by cytochrome cd1. *Cell* 31:369-377.
31. Glass, C., J. Silverstein and J. Oh. 1997. Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environ. Res.* 69:1086-1093.
32. Godden, J., S. Turley, D. Teller, E. Adman, M. Liu, W. Payne and J. Legall. 1991. The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science* 253:438-442.
33. Gómez-Hernández, J., J. M. Lema-Rodicio and J. R. Méndez-Pampín. 1995. La nitrificación biológica con cultivos axénicos o lodos activados. *Ciencia* 46:507523.
34. González, M. S. (1998). *Biopelículas Aerobias en Tratamientos de Aguas Residuales*. Venezuela.
35. Goretski, J. and T.C. Hollocher. 1990. The kinetic and isotopic competence of nitric oxide as an intermediate in denitrification. *J. Biol. Chem.* 265:889-895.

36. Halling-Sørensen, B. and S. Jörgensen (Eds.). 1993. The removal of nitrogen compounds from wastewater, p. 3. Elsevier, Netherlands.
37. Hasselblad S. and Hallin S., 1998. Intermittent addition of external carbon to a enhance denitrification in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.*, 37: 227-233.
38. Hendrich, M., M. Logan, K. Andersson, D. Arciero, J. Lipscomb and A. Hooper. 1994. The active site of hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: evidence for a new metal cluster in enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* 116:11961-11968.
39. Her, J. and J. Huang. 1995. Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Biores. Technol.* 54:45-51.
40. Hirata, A., Y. Makamura, and S. Tsuneda, %Biological nitrogen removal from industrial wastewater discharged from metal recovery processes,+*Wat. Sci. Tech.*, vol. 44, no. 2-3, pp. 171. 179, 2001.
41. Hong Z., K. Hanaki and T. Matsuo. 1994. Greenhouse gas-N₂O production during denitrification in wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* 28:203-207.
42. Hooper, A., T. Vannelli, D. Bergmann and D. Arciero. 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 71:59-67.
43. Hulshoff Pol L. W., Lens L. P. N., Sipma J. and Lettinga G., 2000. Effect of nitrate on acetate degradation in a sulfidogenic staged reactor. *Wat. Res.*, 34 (1): 31-42.
44. Jackson, R., A. Cornish-Bowden and J. Cole. 1981. Prosthetic groups of the NADH-dependent nitrite reductasa from *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.*193: 861-867.
45. Jetten, M., S. Horn and M. van Loosdrecht. 1997. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Water Sci. Technol.* 35:171-180.
46. Jetten, M., S. Logemann, G. Muyzer, L. Robertson, S. de Vries, M. van Loosdrecht and J. Kuenen. 1997. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie van Leeuwenhoek.* 71:75-93.
47. Juliette, L., M. Hyman and D. Arp. 1995. Roles of bovine serum albumin and copper in the assay and stability of ammonia monooxygenase activity in vitro. *J. Bacteriol.* 177:4908-4913.

48. Knowles, R. 1982. Denitrification. *Microbiol. Rev.* 46:43-70.
49. Kroneck, P. M. M., J. Beuerle and R. W. Schumacher. 1992. Metal-dependent conversion of inorganic nitrogen and sulfur compounds, p. 455-505. In: H. Siegel and A. Siegel (ed.). *Metal ions in biological systems*, v. 28. Marcel Dekker, U.S.A.
50. Lazarova, V and Manem, J. 2000. Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment. In *Biofilms II: Process analysis and applications*. Edited by James D Bryers. Wiley series in ecological and applied microbiology, USA, pp. 159-206.
51. Martínez, O. F., S. J. Soriano and J. Gómez. 1998. Análisis químico y electroforético de un lodo nitrificante asociado al IVL. IV Iberian Congress on Biotechnology, I Ibero American Meeting on Biotechnology, Braga, Portugal.
52. Mateju, V., S. Cizinska, J. Krejčí and T. Janoch. 1992. Biological water denitrification-A review. *Enzyme Microb. Technol.* 14:170-183.
53. Mohseni B. A. and Elliot D. J., 1998. Groundwater denitrification with alternative carbon sources. *Wat. Sci.*, 38: 237-243.
54. Mosquerra, C, Campos, J, Sánchez, M, Méndez, R, Lema, J. (2003). Combined system for biological removal of nitrogen and carbon from a fish cannery wastewater. *Journal of Environmental Engineering.* 129(9):826-833.
55. Min Cao G., Zhao Q. and Zhang T., 2002. Characterization of nitrifying and denitrifying bacteria coimmobilized in PVA and kinetics model of biological nitrogen removal by coimmobilized cells. *Enzyme Microbiol. Technol.* 30:49-55.
56. Mulder A., A. van de Graaf, L.A. Robertson and J.G. Kuenen. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16:177-184.
57. Muxí, L. 1994. Aspectos microbiológicos de los procesos de nitrificación-desnitrificación. En *memorias del III Taller y seminario latinoamericano "Tratamiento anaerobio de aguas residuales"*. Montevideo, Uruguay. pp. 55-63.
58. Ouyang C.F., Chiou R.J. ET Lin C.T. 2000. The characteristics of nitrogen removal by the biofilter system. *Water Sci Technol* , 42(12), 137-147.

59. Perez, T. J., C. G. Saucedo and J. Gómez. 1999. Efecto del pH y la fuente de electrones sobre la desnitrificación en régimen estacionario. VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería - IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería, Huatulco, Oaxaca, México, 12-17 Septiembre.
60. Peters, R.W. and Alleman, J.E. 1982. The history of fixed-film wastewater treatment systems. In Proceedings of the First International Conference on Fixed-Film Biological Processes, Kings Island, Ohio, 20-23 April 1982, Volume I, pp. 80-108.
61. Prosser, J. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. In: Rose, A. and Tempest, D. (Eds.) Advances in microbial physiology. p. 125-181. Academic Press, London.
62. Qian X., Yang P. Y. and Maekawa T., 2001. Evaluation of direct removal of nitrate with entrapped mixed microbial cell technology using ethanol as the carbon source. Water Environment Research, 73 (5): 584-589.
63. Quevedo, M., E. Guynot and L. Muxi. 1996. Denitrifying potential of methanogenic sludge. Biotechnol. Lett. 18:1363-1368.
64. Robertson, L. and J. Kuenen. 1988. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: Oxygen uptake and enzyme studies. J. Gen. Microbiol. 134:857-863.
65. Robertson, L., T. Dalsgaard, N. Revsbech and J. Kuenen. 1995. Confirmation of ~~anaerobic~~ aerobic denitrification+ in batch cultures, using gas chromatography and ¹⁵N mass spectrometry. FEMS Microbiol. Ecol. 18:113-120.
66. Sánchez, M., R. Méndez-Pampín, J.M. Lema, O. Monroy and J. Gómez. 1997. Denitrifying activity of methanogenic sludges at several C/N ratios. International symposium of Environmental Biotechnology. Part II posters. pp. 251-254.
67. Schulthess, R. and W. Gujer. 1996. Release of nitrous oxide (N₂O) from denitrifying activated sludge: verification and application of a mathematical model. Water Res. 30:521-530.
68. Shing-Der, C., C. Chiu-Yang, S. Yuan-Chung, C. Chun-Mao and C. Hsiang-Ju. 1996. Treatment of highstrength nitrate wastewater by biological thodsoperational characteristics study. Water Sci. Technol. 34:269-276.

69. Siddiqui, R., U. Warnecke-Eberz, A. Hengsberger, B. Schneider, S. Kostka and B. Friedrich. 1993. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* 175:5867-5876.
70. Stenstrom, M. and R. Poduska. 1980. The effect of dissolved oxygen concentration on nitrification. *Water Res.* 14:643-649.
71. Stouthamer, A. 1976. Biochemistry and genetics of nitrate reductase in bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 14:315-375.
72. Stouthamer, A. H. 1988. Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds, p. 245-303. In: A. J. B. Zehnder (ed.). *Biology of anaerobic microorganisms*. Wiley-Liss, New York.
73. Strous M., Gerven E. van, Zheng P., Kuenen J. G. and Jetten M. S. M. 1997. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) process in different reactor configurations. *Water Res.* 31:1955-1962.
74. Thomsen, J., T. Geest and R. Cox. 1994. Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:536-541.
75. Tiedje, J. M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium, p. 179-218. In: A. J. B. Zehnder (ed.). *Biology of anaerobic microorganisms*. Wiley-Liss, New York.
76. Tjihuis, L., H.D. Huisman, M. van Loosdrecht and J. Heijnen. 1995. Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 47:585-595.
77. Van de Graaf A. A., P. de Bruijn, L. A. Robertson, M. S. M. Jetten and J. Kuenen. 1996. Autotrophic growth of anaerobic, ammonium-oxidizing microorganisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 142:2187-2196.
78. Van de Graaf, A., P. de Bruijn, L. Robertson, M. Jetten and J. Kuenen. 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology* 143:2415-2421.
79. Van de Graff, A., A. Mulder, P. Bruijn, M. Jetten, L. Robertson and J.G. Kuenen 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1246-1251.
80. Vitousek, P. M., H. A. Mooney, J. Lubchenco and J. M. Melillo. 1997. Human domination on Earth's ecosystems. *Science* 277:494-499.

81. Volokita, M., Abeliovich A., Ines M. and Soares M., 1996. Denitrification of groundwater using cotton as energy source. *Wat Sci. Tech.*, 34: 379-385.
82. Wiesmann, U. 1994. Biological nitrogen removal from wastewater. p. 113-154. In: Fiechter, A. (ed.). *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer Verlag, Berlin.
83. Wilderer, P.; Irvine, R.; Goronszy, M. (2001) *Sequencing Batch Reactor Technology*. Scientific and Technical Report N°10, IWA Publishing.
84. Winkler, M. 1986. *Tratamiento biológico de aguas de desecho*, 1a. ed. LIMUSA, México.
85. Zhang D. and Verstraete W., 2001. The anaerobic treatment of nitrite containing wastewater using an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *Env. Tech.*, 22: 905-913.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)