



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**ESTUDIO DEL PROCESO RESPIRATORIO Y ESTRUCTURA
DE UN LODO DESNITRIFICANTE EN PRESENCIA DE
ACETATO Y TOLUENO EN UN SBR**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

LANDY HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS:
FLOR DE MARÍA CUERVO LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2005

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Microbiana del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACYT Registro 0471-O y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio: 400200-5-33668-U “Eliminación de compuestos aromáticos por nitrificación-desnitrificación: Estudio fisiológico, bioquímico y fisicoquímico del proceso”.

Iztapalapa, D.F. a 15 de Diciembre del 2005

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**ESTUDIO DEL PROCESO RESPIRATORIO Y ESTRUCTURA DE UN LODO
DESNITRIFICANTE EN PRESENCIA DE ACETATO Y TOLUENO EN UN SBR**

Que presentó

Landy Hernández Rodríguez

Comité Tutorial

Directora: Dra. Flor de María Cuervo López

Asesores: Dr. Jorge Gómez Hernández

Dr. Germán Buitrón Méndez

Jurado

Presidente: Dra. Florina Ramírez Vives

Secretario: Dra. Anne Claire Texier

Vocal: Dr. Eric Houbron

Vocal: Dr. Felipe Martínez Orta

Agradecimientos

A mis asesores Dra. Flor de María Cuervo López, Dr. Jorge Gómez Hernández, Dr. Germán Buitrón Moreno, por su tiempo dedicado a este trabajo y su ayuda en el entendimiento de la fisiología microbiana.

Al jurado por la revisión, sugerencias y evaluación en la defensa del mismo.

A mis hermanas Blanca y Eva por su apoyo en tiempos agradables y difíciles durante toda mi vida.

A Marco Polo por su apoyo, amor, compañía y esmero sin duda alguna en su ayuda en el laboratorio.

A Diana por su compañía, amistad y por convertir los momentos de estrés en risas.

A Alberto por su valiosa ayuda en sus comentarios.

A Armando, Citlali, Sergio, Arturo, Amalia, Emanuel, Ricardo, Felipe, Alejandro y Edna compañeros y amigos del Laboratorio de Fisiología Microbiana (W103), por su asesoría y haber hecho un ambiente de trabajo agradable.

A CONACyT, que financió el proyecto “Eliminación de compuestos aromáticos por nitrificación-desnitrificación: Estudio fisiológico, bioquímico y fisicoquímico del proceso”: 400200-33668-U.



Dedicado

A mis Padres por su apoyo incondicional y
enseñarme a valorar cada paso en mi vida.

INDICE	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	
Panorama actual	4
1.1 Procesos biológicos	5
1.2 Digestión anaerobia	5
1.3 Ciclo del nitrógeno	6
1.4 Desnitrificación	8
1.4.1 Bioquímica de la desnitrificación	8
1.4.2 Factores que afectan a la desnitrificación	9
1.5. Reactor de lote secuenciado (SBR)	10
1.5.1 Desempeño del SBR	12
1.5.2 Eliminación de compuestos nitrogenados en el SBR.	13
1.6 Tolueno	14
1.6.1 Efectos del tolueno en la salud	15
1.6.2 Eliminación y mineralización del tolueno	15
1.7 Composición de lodos	18
1.7.1 Estabilidad de los lodos	19
1.8 Sustancias exopoliméricas (SEP).	20
1.8.1 Composición de las SEP.	21
1.8.2 Efecto de los nutrientes sobre las SEP	23
1.8.3 Efecto de las SEP sobre la sedimentabilidad de los lodos	23
1.9 REFERENCIAS	25
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general	33
2.2 Objetivos particulares	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Estabilización del reactor UASB continuo desnitrificante en estado estacionario.	35
3.1.1 Obtención de inóculo en el reactor UASB	35
3.1.2 Condiciones desnitrificantes en el reactor UASB	35
3.1.3 Medición del gas producido	36
3.2 Reactor de lote secuenciado (SBR)	37
3.2.1 Condiciones de operación en el SBR	37
3.2.2 Condiciones de operación del SBR alimentado con acetato como fuente de electrones.	38
3.2.3 Condiciones de operación del SBR con tolueno como fuente de electrones	38
3.2.4 Evaluación del proceso respiratorio en el cultivo en el SBR	38
3.2.5 Ensayos abióticos en el SBR	39
3.2.6 Evaluación de la sedimentabilidad del lodo	39
3.3 Métodos de análisis	40
3.3.1 Compuestos nitrogenados	40

3.3.1.1 Cuantificación de (NO_3^-), nitrito (NO_2^-).	40
3.3.1.2 Cuantificación de los gases: N_2 , N_2O , CH_4 y CO_2 .	41
3.3.2 Compuestos carbonados	42
3.3.2.1 Cuantificación de carbono total y carbono inorgánico	42
3.3.2.2 Cuantificación de acetato	43
3.3.2.3 Cuantificación de tolueno	44
3.3.3 Cuantificación de biomasa: sólidos suspendidos volátiles (SSV)	45
3.3.4 Sustancias exopoliméricas (SEP)	46
3.3.4.1 Extracción de las sustancias exopoliméricas	46
3.3.4.2 Cuantificación de carbohidratos	46
3.3.4.3 Cuantificación de proteínas	47
3.3.5 Índice volumétrico del lodo IVL	48
3.3.6 Velocidades de sedimentación	48
3.4 REFERENCIAS	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Fuente de lodo desnitrificante: Reactor UASB	52
4.2 Ensayos abióticos	53
4.3 Análisis del proceso respiratorio en el SBR	53
4.3.1 SBR con acetato inoculado con 2 g SSV/l	53
4.3.2 SBR con tolueno con 2 g SSV/l	55
4.3.3 Efecto de la concentración de SSV sobre el proceso respiratorio con tolueno.	59
4.4 Evaluación de la sedimentabilidad del lodo desnitrificante en el SBR	61
4.4.1 Ensayos con acetato y tolueno	61
4.4.1.1 Comportamiento del IVL	61
4.4.1.2 Comportamiento de las PE y CE	62
4.4.1.3 Relación PE/CE	63
4.4.1.4 Relación entre las variables de respuesta	63
4.4.2 Efecto de la concentración de los SSV sobre la sedimentabilidad	64
4.4.2.1 IVL y V_s	64
4.4.2.2 Comportamiento de las PE y CE	65
4.4.2.3 Relación PE/CE	67
4.4.2.4 Relación entre las variables de respuesta	67
4.5 REFERENCIAS	68
5. CONCLUSIONES	73
ANEXO	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Propiedades fisicoquímicas del tolueno	14
Tabla 2.	Composición de las SEP (Fleminger y Wingender 2001).	22
Tabla 3.	Composición del medio desnitrificante para el reactor UASB	37
Tabla 4.	Coeficientes de variación de los métodos de análisis.	48
Tabla 5.	Balance de materiales en el proceso desnitrificante en presencia de acetato y tolueno como donadores de electrones	55
Tabla 6.	Eficiencias de consumo de sustrato (E) y rendimientos de formación de productos ($Y_{P/S}$) en el proceso desnitrificante usando diferentes concentraciones de SSV en los 15 ciclos evaluados.	59
Tabla 7.	Velocidades volumétricas de consumo de tolueno y nitrato.	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo del Nitrógeno (Zumft, 1997).	07
Figura 2	Secuencia enzimática de la desnitrificación.	09
Figura 3	Ciclo de operación de un SBR (Lloyd y col., 1997).	11
Figura 4.	Diversas vías de eliminación del tolueno bajo condiciones aerobias.	17
Figura 5	Vía para la eliminación del tolueno (Biegert y col, 1996).	17
Figura 6	Asociación reversible de bacterias que se adhieren mediante polímeros extracelulares (Schmidt y Ahring, 1996).	20
Figura 7.	Reactor UASB de laboratorio.	35
Figura 8.	Reactor SBR de laboratorio.	38
Figura 9.	Ejemplo de una curva de calibración para la determinación de nitrato.	41
Figura 10.	Curva de calibración para la determinación de carbono total.	43
Figura 11.	Curva de calibración para la determinación de carbono inorgánico.	43
Figura 12.	Curva de calibración para la determinación de acetato.	44
Figura 13.	Curva de calibración para la determinación de tolueno.	45
Figura 14.	Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos.	47
Figura 15.	Curva de calibración para proteínas.	47
Figura 16.	Perfil de las velocidades de carga y descarga de los compuestos carbonados (A) y nitrogenados (B) en el reactor continuo desnitrificante (UASB).	52
Figura 17.	Perfil de velocidades específicas de consumo ((▲) q_s de N-NO ₃ , (■) q_s de C-acetato) en el SBR bajo condiciones desnitrificantes y de producción ((♦) q_p de C-HCO ₃ y (●) q_p de N ₂).	53
Figura 18.	Perfil de compuestos carbonados en el SBR bajo condiciones desnitrificantes, (▲) q_s de C-tolueno, (●) q_p de N-NO ₃ , (■) q_s de N ₂ y (♦) q_p de C-HCO ₃ en el reactor inoculado con 2 g SSV/l.	56

Figura 19.	Perfil de compuestos carbonados en el SBR bajo condiciones desnitrificantes, (\blacktriangle) q_s de C-tolueno, (\bullet) q_p de N-NO ₃ , (\blacksquare) q_s de N ₂ y (\blacklozenge) q_p de C-HCO ₃ en el SBR inoculado con 4 gSSV/l y 8 gSSV/l.	60
Figura 20.	Perfil de la PE en presencia de acetato (\bullet) y tolueno (\circ) en el SBR	63
Figura 21.	Reactor SBR inoculado con 4 gSSV/l y SBR inoculado con 8 gSSV/l.	65
Figura 22.	Comportamiento de las proteínas exopoliméricas en los SBR alimentados con diferentes concentraciones de SSV.	66
Figura 23.	Comportamiento de los carbohidratos exopoliméricos en los SBR alimentados con diferentes concentraciones de SSV.	66

RESUMEN

ESTUDIO DEL PROCESO RESPIRATORIO Y ESTRUCTURA DE UN LODO DESNITRIFICANTE EN PRESENCIA DE ACETATO Y TOLUENO EN UN REACTOR DE LOTE SECUENCIADO (SBR).

El tolueno es un hidrocarburo monoaromático usado como aditivo en diversos productos del petróleo, como la gasolina y el diesel. Ha sido considerado un contaminante de alta prioridad por la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos, ya que ocasiona daños a la salud humana así como al ambiente. La eliminación del tolueno ha sido estudiada en diversos procesos, uno de ellos es la desnitrificación. La desnitrificación es un proceso de tipo anóxico el cual acopla la oxidación de materia orgánica con la reducción de nitrato. Por lo anterior, es necesario estudiar sistemas biológicos los cuales permitan evitar que descargas de estos compuestos causen daño a los cuerpos receptores de agua.

Uno de los problemas operacionales más comunes en el tratamiento de aguas residuales es la falta de sedimentabilidad del lodo. Esta falta se ha asociado con las sustancias exopoliméricas (SEP) del lodo, ya que cuando aumenta la concentración de SEP, se presenta inestabilidad en el lodo aún cuando el proceso respiratorio no se vea afectado. En sistemas de lote secuencial (SBR), los cambios de sedimentabilidad en el ciclo, son un problema serio. Cuando en el influente se encuentran disolventes como el tolueno, el problema se hace más notorio.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la fisiología del proceso respiratorio desnitrificante con acetato y tolueno como fuentes de energía en un SBR y la sedimentabilidad del lodo a través de las SEP, así como evaluar el efecto de la concentración de los SSV sobre el proceso respiratorio y la sedimentabilidad del lodo con tolueno.

En la primera etapa con acetato, se obtuvieron $E_{C\text{-acetato}}$ y $E_{N\text{-NO}_3}$ cercanas al 100%, así como Y_{N_2} y $Y_{C\text{-HCO}_3}$ cercanos a 1. Las velocidades específicas de consumo y de producción aumentaron 4 veces su valor inicial, durante los primeros 24 ciclos, después se mantuvieron constantes. En la segunda etapa con el tolueno, las $E_{C\text{-tolueno}}$ y $E_{N\text{-NO}_3}$ fueron de 63 y 100%, respectivamente. Los Y_{N_2} y $Y_{C\text{-HCO}_3}$ se mantuvieron cercanos a 1. Las velocidades de consumo de sustratos aumentaron 1.5 veces y las velocidades de producción 2 veces su valor inicial durante los primeros 17 ciclos y después permanecieron constantes. Esto indica que el proceso respiratorio no se vio afectado en presencia de tolueno. Se ensayaron tres diferentes concentraciones de SSV (2, 4 y 8 g SSV/l) y se encontró que las eficiencias de consumo de tolueno y nitrato fueron 66 y 94%, respectivamente. Los Y_{N_2} y $Y_{C\text{-HCO}_3}$ se mantuvieron cercanos a 1, lo anterior nos indica que la concentración de SSV no tuvo efecto sobre el proceso respiratorio.

En los ensayos con acetato, el lodo tuvo una buena sedimentabilidad con valores de IVL de 57 ± 2 ml/g. La concentración de proteína exopolimérica (PE) fue de 28 ± 14 mg/L, y la de carbohidratos exopoliméricos (CE) fue de 6 ± 1 mg/L. Cuando se alimentó tolueno, el lodo mantuvo una buena sedimentabilidad y valores de índice volumétrico del lodo (IVL) de 40 ± 27 ml/g. Sin embargo, se encontró que la PE generada fue 1.75 veces mayor que con acetato (49 ± 32 mg/L). En cuanto a los CE, se encontró que la concentración con tolueno fue 3.4 veces mayor que con acetato (21 ± 9 mg/L). Aunque las velocidades de sedimentación (V_s) obtenidas con tolueno disminuyeron un 49%, y las concentraciones de SEP aumentaron, no se presentó pérdida de sedimentabilidad del lodo. Un análisis estadístico mostró que las PE presentan una mejor correlación con las V_s (0.635), que con el IVL (0.087).

La alimentación con tolueno, promovió cambios en la concentración de las PE y CE producidos en el lodo desnitrificante, no obstante, estos cambios en las SEP no afectaron la sedimentabilidad del lodo. Por lo que se puede decir que el sistema SBR puede ser una propuesta tecnológica adecuada. Cuando se ensayaron las diferentes concentraciones de SSV se encontró que las concentraciones de PE y CE aumentaron 2 veces en los reactores inoculados con 4 y 8 g SSV/L con respecto al reactor inoculado con 2 g SSV/L. La falta de sedimentabilidad se hizo visible en el reactor inoculado con 8 g SSV/L donde la concentración de PE era mayor que 100 mg PE/L.

SUMMARY

STUDY OF THE RESPIRATORY PROCESS AND STRUCTURE OF A DENITRIFYING SLUDGE IN THE PRESENCE OF ACETATE AND TOLUENE IN A SEQUENCING BATCH REACTOR (SBR).

Toluene is a monoaromatic hydrocarbon used as an antiknock additive in diverse petroleum products, such as gasoline and diesel. It has been considered a high priority contaminant by the Agency of Environmental Protection in the United States, since harmful effects have been observed in human health as well as in the environment. The elimination of toluene in diverse processes, one of them by means of denitrification, has been studied. Denitrification is an anoxic type of process which couples the oxidation of organic matter with the reduction of nitrate. Due to the latter, the necessity to develop biological systems which do not permit residual water discharges with this compounds to cause harm to water receiving bodies is important.

One of the most common operational problems in the treatment of residual waters is the lack of sedimentability of the sludge. This deficiency has been associated with the exopolimeric substances (EPS) of the sludge, since as EPS concentration increases, sludge instability is presented even when the respiratory process is not affected. In sequencing batch reactor systems (SBR), changes in the sedimentability in the cycle are a serious problem. When dissolvents as toluene are found in the influent, the problem is more notorious.

In this work, the physiology of the denitrifying respiratory process with acetate and toluene as sources of energy in a SBR, and the sedimentability of the sludge throughout the EPS were studied. The effect of the volatile solid suspended (VSS) on the respiratory process and the sedimentability of the sludge with toluene were also evaluated.

In the first stage with acetate, $E_{C\text{-toluene}}$ and $E_{N\text{-NO}_3}$ obtained were nearly 100%, and Y_{N_2} and $Y_{C\text{-HCO}_3}$ were close to 1. The specific speeds of consumption and of production they increased 4 times their initial value, during the first 24 cycles, later they stayed constant. In the second stage, with toluene, $E_{C\text{-toluene}}$ and $E_{N\text{-NO}_3}$ were 63 and 100%, respectively. Y_{N_2} and $Y_{C\text{-HCO}_3}$ remained close to 1. At a greater number of cycles, the consumption velocities of the substrates increased 1.5 times and the production speeds 2 times their initial value during the first 17 cycles and later they remained constant.

The respiratory process was not affected by the presence of toluene. Three different concentrations of VSS were studied (2, 4 and 8 g VSS/L), for which the consumption efficiencies of toluene and nitrate were 66 and 94%, respectively. Y_{N_2} and $Y_{C\text{-HCO}_3}$ remained near 1, which indicates that the VSS concentration did not have an effect on the respiratory route.

In the essays with acetate, the sludge presented good sedimentability with IVL values of 57 ± 2 g/mL. The concentration of exopolimeric proteins (PE) was 28 ± 14 mg/L, and that of exopolimeric carbohydrates (CE) was 6 ± 1 mg/L. When toluene was fed, the sludge maintained a good sedimentability and IVL values of 40 ± 27 g/mL. However, it was found that the PE generated was 1.75 times greater than with acetate (49 ± 32 mg/L). With respect to the CE, it was found that the concentration with toluene was 3.4 times greater than with acetate (21 ± 9 mg/L). Although the sedimentation speeds (V_s) obtained with toluene decreased in 49%, and the concentrations of EPS increased, losses in the sedimentability of the sludge were not present. Statistical analysis showed that the PE presented a greater correlation with the V_s (0.635), than with the IVL (0.087).

Feeding with toluene promoted changes in the concentration of the PE and CE produced in the denitrifying sludge, however, these changes in the EPS did not affect sludge sedimentability. When different concentrations of VSS were studied, the concentrations of PE and CE increased twice in the reactors inoculated with 4 and 8 g VSS/L with respect to the reactor inoculated with 2 g VSS/L. The lack of sedimentability was visible in the reactor inoculated with 8 g VSS/L, where the PE concentration was greater than 100 mg PE/L.



Capítulo 1
INTRODUCCIÓN

Panorama actual

Como en la Ciudad de México, muchas de las principales ciudades del mundo enfrentan perspectivas inciertas para asegurar un abastecimiento de agua permanente y confiable. La sustentabilidad del abastecimiento de agua en zonas urbanas está sujeta a muchos factores: la capacidad física del sistema hidrológico, la vulnerabilidad del sistema a la contaminación, la capacidad de tratamiento de las aguas residuales, la distribución y potabilización, sin descontar los diversos aspectos sociales, económicos e institucionales que influyen en la capacidad de una sociedad para administrar sus recursos. Este creciente problema ha llevado, recientemente, al desarrollo de nuevas leyes, al despliegue de nuevos esfuerzos para la conservación de los recursos acuíferos, al desarrollo de programas educativos e investigaciones en la búsqueda de soluciones innovadoras para el tratamiento de efluentes.

El aumento de conciencia del tratamiento de efluentes industriales y urbanos es de vital importancia para disminuir la contaminación ambiental. Resultado de lo anterior es el desarrollo de procesos que combinen una alta eficiencia de tratamiento con bajos costos de construcción y mantenimiento.

Sin duda alguna, las plantas de tratamiento de aguas residuales son herramientas tecnológicas muy importantes para coadyuvar en la preservación del ambiente, en el reuso del agua y el control de agentes que pueden causar efectos nocivos en la salud, entre los que podemos mencionar:

- a) agentes biológicos como helmintos, protozoarios, bacterias, rickettsias, virus, etcétera.
- b) Agentes químicos tóxicos, carcinogénicos o mutagénicos.
- c) Agentes físicos, como radiación, vibraciones, polvo y otros irritantes.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Procesos biológicos.

Los procesos biológicos se pueden dividir en dos grupos: los aerobios y los anaerobios. Una diferencia esencial entre estos dos tipos de tratamiento es el aceptor final de electrones, y de ello se derivan las diferencias más importantes que influyen significativamente sobre el costo y en consideraciones de tipo técnico.

Se ha observado que el proceso anaerobio metanogénico tiene una baja tasa de síntesis bacteriana (baja producción de lodos de desecho), ya que el 90% de la energía se utiliza en la producción de metano mientras que el 10% restante lo utilizan para la síntesis celular (Noyola, 1990). Por el contrario, en el tratamiento aerobio el 65% de la energía puede ser utilizada para la síntesis celular, por lo que la generación de biomasa puede ser mayor, cuyo tratamiento y disposición incrementa la dificultad técnica y el costo total del tratamiento.

El proceso anaerobio es un productor de energía que puede ser económicamente revalorizado en algunos casos, mientras que el aerobio puede ser un consumidor de ésta, en forma de agitación y oxigenación.

Existe un proceso biológico anaerobio denominado anóxico. Un proceso anóxico es aquel en el no existe oxígeno molecular disuelto y puede haber nitrógeno oxidado en forma de nitrato y/o nitrito. En este caso, el nitrógeno oxidado fungirá como aceptor de electrones, lo que provoca la reducción del nitrógeno a la forma gaseosa (N_2) proceso denominado desnitrificación. De igual forma que el medio anaerobio, el anóxico puede poseer tasas bajas de producción de lodo de desecho.

1.2 Digestión anaerobia.

En México debido a la naciente práctica del tratamiento de aguas residuales, existen grandes posibilidades de introducir la digestión anaerobia como el principal componente en los procesos biológicos. Sin embargo, esto requiere la comprensión de todos los aspectos técnicos, económicos y financieros que limitan su desarrollo. De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua (1995) se generaron

aguas residuales municipales e industriales a caudales de 232 y 168 m³/s, respectivamente, pero solamente 20 y 12% de estos volúmenes fueron tratados y, a menudo, con muy baja eficiencia. En los últimos años la digestión anaerobia ha crecido, pero no a la velocidad necesaria, por lo que las mayores inversiones siguen realizándose con tecnologías aerobias y físico-químicas convencionales. En 1998 se contaban en el país con 85 plantas de tratamiento anaerobio de aguas residuales que trataban un caudal de 216,295 m³/d con un volumen instalado de 228,551m³ (Monroy y col., 1998). Una estimación para el 2002 por la CNA menciona que de un caudal de 203 m³/s de aguas residuales municipales generadas, sólo el 27.6% (56.1 m³/s) recibió tratamiento.

La digestión anaerobia es una vía de manejo de residuos orgánicos, líquidos o semisólidos, que presenta varias ventajas sobre otros procesos más convencionales. Ciertas características de la digestión anaerobia la hacen particularmente atractiva en el contexto actual, donde el uso eficiente de recursos y la necesidad de integrar mejor los flujos de materia y energía, son elementos importantes del llamado desarrollo sustentable, pero algunos no eliminan nitrógeno, otro de los contaminantes importantes en el agua. El nitrógeno llega en forma de amonio, nitrato, nitrito creando problemas de toxicidad para los organismos acuáticos, además de la eutroficación de mantos acuíferos (Cervantes-Carrillo y col, 2000).

1.3 Ciclo del nitrógeno.

De acuerdo con lo que se ilustra en la Figura 1, el nitrógeno se transforma dentro de un ciclo de especies inorgánicas y orgánicas.

La mineralización de las proteínas provenientes de tejido muerto de origen animal y vegetal, puede iniciarse bajo condiciones aerobias por acción de microorganismos, produciendo nitrógeno amoniacal, que posteriormente se oxida a nitrito y a nitrato. El nitrato liberado al ambiente, junto con el amonio producto de la fijación de nitrógeno gaseoso de la atmósfera, es empleado por las plantas en la producción de tejido vegetal y contiene nitrógeno orgánico. Por otra parte, los animales consumen microorganismos y tejido vegetal de las plantas produciendo proteína animal, para completar de esta forma el ciclo. Aunque el grupo de

microorganismos que pueden fijar amonio a partir de nitrógeno atmosférico es reducido, su trabajo es de gran importancia, especialmente en zonas donde existen limitaciones de nitrógeno (Madigan, 1999).

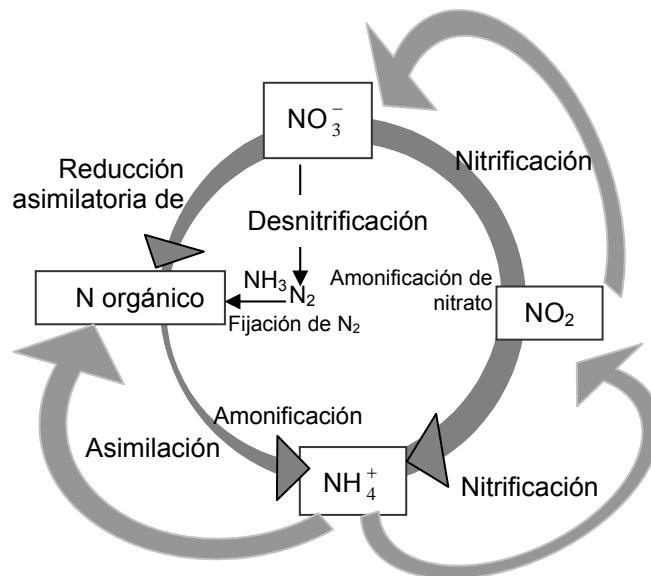


Figura 1 Ciclo del Nitrógeno (Zumft, 1997)

El nitrógeno presente en aguas residuales se encuentra principalmente en forma de proteína y urea, pero debido a la rápida acción de los microorganismos, ambas formas cambian a nitrógeno amoniacal. Debido a que el nitrógeno en forma de nitrato puede ser empleado en la síntesis de proteínas por parte de algas y otras plantas, se crea la necesidad de removerlo o de reducir su concentración para prevenir la eutroficación. Por ejemplo, si se desea emplear agua residual tratada para ser mezclada y almacenada en embalses junto con agua destinada al abastecimiento por ejemplo, es necesario remover el nitrato para limitar el crecimiento de algas.

El ciclo del nitrógeno es importante, ya que éste puede mantener una eficiente recirculación del nitrógeno en la naturaleza, transformándolo a nitrógeno atmosférico por medio de la nitrificación y desnitrificación, y nuevamente fijado por algunos microorganismos.

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. Los cultivos nitrificantes generalmente tienden a formar estructuras denominadas flóculos, cuya estabilidad parece depender de la formación de sustancias exopoliméricas (urbain y col, 1993). El proceso respiratorio nitrificante se lleva a cabo en dos etapas: 1) oxidación de amonio a nitrito y 2) oxidación de nitrito a nitrato (Tijhuis y col., 1995).

1.4 Desnitrificación.

La desnitrificación es un proceso respiratorio anaerobio del tipo anóxico donde el nitrato es reducido a compuestos de nitrógeno gaseoso como son el NO, N₂O o el N₂.

Los géneros desnitrificantes más citados incluyen, *Alcalígenes*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus* y *Thiosphaera*, entre otros. Dado el carácter respiratorio del proceso, es necesaria la presencia de un sustrato oxidable que suministre energía, por lo que la desnitrificación puede ser un proceso organótrofo o litótrofo. La desnitrificación organótrofa requiere de la presencia de materia orgánica como fuente de electrones. El origen de la materia orgánica puede ser diverso, e incluye desde compuestos polares (alcoholes y azúcares, ácidos orgánicos de bajo peso molecular) hasta algunos compuestos aromáticos de baja solubilidad en el agua como el tolueno (Tiedje, 1988; Schocher y col, 1991; Evans y col, 1988; Alvarez y col, 1999; Matějů y col, 1992).

1.4.1 Bioquímica de la desnitrificación.

La desnitrificación es una serie de cuatro reacciones catalizadas cada una por diferentes enzimas. En la Figura 2 se muestra la serie de reacciones propuesta, así como las enzimas que catalizan cada una de ellas (Knowles, 1982).

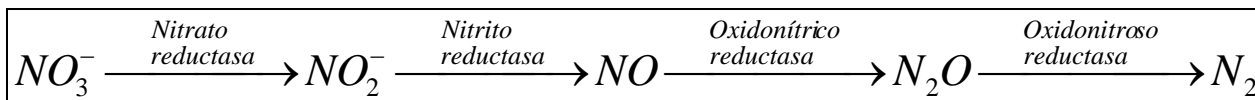


Figura 2 Secuencia enzimática de la desnitrificación

La enzima responsable del primer paso en la reducción del nitrato, la nitrato reductasa, es una enzima que contienen molibdeno. En general, las nitrato reductasas asimilatorias son proteínas solubles que son inhibidas por amoníaco, mientras que las nitrato reductasas desasimilatorias son proteínas localizadas en el espacio periplásmico cuya síntesis se reprime por O_2 , y que, por tanto, sólo se sintetizan en condiciones anóxicas (Berks y col, 1995). La nitrito reductasa es la enzima del siguiente paso y se han identificado dos tipos, una contiene cobre, mientras que la otra contiene el hemo cd_1 . La que contiene cobre es un homotrímero con dos átomos de cobre por monómero, mientras que la que contiene el hemo cd_1 es un homodímero con un hemo c y un hemo d_1 por cada monómero (Jetten y col, 1997). La tercera reacción está catalizada por la óxido nítrico reductasa. 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 (Carr y Ferguson, 1990). La última etapa de la desnitrificación es la reducción de N_2O a N_2 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. Esta enzima es inhibida por la presencia de oxígeno (Ferguson, 1994). 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 (Cervantes y col, 1998).

1.4.2 Factores que afectan a la desnitrificación.

La literatura nos da evidencia de que existen factores que afectan al proceso desnitrificante como son la relación carbono/nitrógeno (C/N), temperatura, pH, iones metálicos, intermediarios de la desnitrificación, tipo de sustrato, entre otros.

Uno de los problemas que pueden presentarse en un lodo anaerobio, es que, además de que pueda ocurrir la desnitrificación, dependiendo de las condiciones ambientales, es posible que se lleve a cabo una desasimilación reductiva del nitrato a amonio (DRNA) (Tiedje, 1988; Matějů y col., 1992). La DRNA es realizada por una nitrato reductasa no asociada a la membrana. La presencia de la DRNA en un proceso de eliminación de nitrógeno de aguas residuales, impide la reducción del nitrato a N_2 . 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 puede favorecerse la desnitrificación, y en estas condiciones se obtiene mayor formación de N_2 . En cambio, generalmente se observa que a valores altos de C/N predomina la RDNA, ya que al limitarse los aceptores de electrones (el nitrato) se favorece la vía que permite un mayor grado de reducción (del propio nitrato). 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. Esta variabilidad de resultados podría deberse al tipo de microorganismos presentes en los lodos evaluados o a las diferencias en las condiciones de cultivo practicadas (Cervantes y col., 2000).

1.5 Reactor de lote secuencial (SBR).

Los sistemas biológicos utilizados para llevar a cabo la desnitrificación pueden ser principalmente de dos tipos: los que tienen a los microorganismos en suspensión y los que los tienen adheridos a un soporte (formando biopelículas).

Los procesos de llenado y descarga por periodos, similares a los de reactores SBR, no son un desarrollo reciente como se cree comúnmente. Entre 1914 y 1920 varios sistemas de llenado y descarga se encontraban en operación. El interés en los SBR se retomó a finales de la década de 1950 e inicios de la década de 1960 con el desarrollo de nuevos equipos y tecnologías. Este sistema ha sido utilizado desde los años setenta debido a su diseño y su inherente flexibilidad por trabajar en etapas y así conformar un ciclo de trabajo, permitiendo diferentes modos de operación (Irvine y col, 1997). Los sistemas SBR pueden ser utilizados para caudales iguales o menores que 5 millones de galones por día (mgd).

Un ciclo involucra cuatro fases operaciones como se observa en la Figura 3: llenado, reacción biológica, sedimentación y drenado (Lloyd, 1997).

Este sistema consiste en un simple tanque y es utilizado debido a su fácil operación y automatización en una escala de laboratorio (Münch y col., 1996). Es simple de operar porque el efluente se puede controlar fácilmente manipulando los tiempos de reacción y de sedimentación (Alemayehu y col., 2001), así también como manipular la relación de los tiempos de llenado con los tiempos de reacción (Lee y Jong, 1999). Además, los ciclos del sistema pueden ser fácilmente modificados para remoción de nutrientes, si esto fuera requerido en el futuro. Esto hace que los sistemas SBR sean extremadamente flexibles para adaptarse a los cambios en las normas regulatorias de parámetros del efluente en la eliminación de nutrientes (EPA, 1999). Los sistemas SBR son también muy efectivos en términos de costo cuando se requieren tratamientos adicionales al biológico, tales como la filtración.

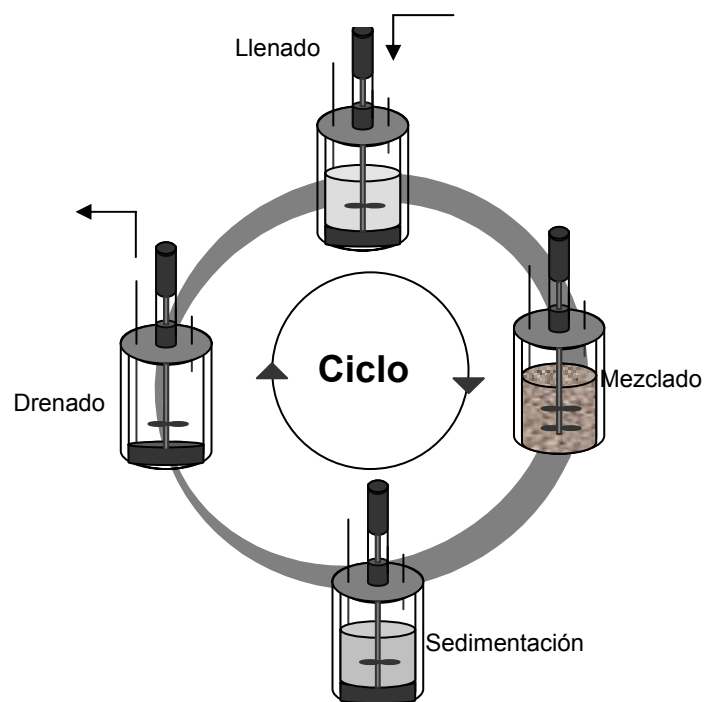


Figura 3 Ciclo de operación de un SBR

La etapa de sedimentación en el SBR ocurre normalmente durante condiciones de reposo en el reactor SBR. En algunos casos una agitación moderada durante las fases iniciales de la sedimentación, puede producir un efluente mejor clarificado y lodo sedimentado de mayor concentración (Irvine y col, 1997). Los elementos centrales de un sistema SBR son la unidad de control y los interruptores y válvulas automáticas que regulan la secuencia y duración de las diferentes etapas que conforman los ciclos. El tanque del SBR se construye normalmente de acero o de concreto. Para aplicaciones industriales los tanques más comunes son los de acero con revestimiento para control de corrosión, mientras que los de concreto son los más comunes para el tratamiento de aguas domésticas municipales.

1.5.1 Desempeño del SBR.

Las estrategias innovadoras, como los procesos discontinuos se han explorado para aumentar las eficiencias de eliminación de contaminantes en las aguas residuales (Buitrón y col, 2001). La tecnología del SBR ha sido evaluada en términos de su potencial por la eliminación simultánea de carbono, nitrógeno y fósforo (Obaja y col., 2003; Murat y col, 2002). Diversas son las características asociadas a este tipo de reactor, una de ellas es que los procesos biológicos tienden a una etapa de adaptación, ya que se ha observado que los tiempos de reacción disminuyen conforme transcurre el número de ciclos, lo que sugiere que las velocidades específicas de consumo y producción aumentan al incrementarse el número de ciclos, hasta llegar a un punto en el cual no sufren cambios significativos, es decir, se puede llegar a un estado estacionario (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). Buitrón y col (2001) en un SBR, utilizando lodos activados, observaron que el tiempo de reacción, una vez adaptado el cultivo, se redujo de 40 h a 50 min. De igual forma Martins y col. (2003) observaron que en un sistema SBR las velocidades específicas de consumo de acetato, pueden aumentar hasta 2 veces con respecto a su valor inicial.

Otra cualidad asociada a este tipo de sistemas es, que parece ser una buena herramienta para evaluar la estructura del lodo (sedimentación),

puntualmente, en la etapa de sedimentación del ciclo, ya que una forma de predecir el comportamiento del lodo puede ser a través del IVL (índice volumétrico del lodo). Al respecto, se ha sugerido que valores entre 80-100 mL/gSSV (Dangcong y col. 1999), el lodo puede presentar una adecuada sedimentabilidad. Buitrón y col. (2001) mencionan que en un SBR, durante la fase de adaptación del proceso respiratorio, el IVL disminuyó de 500 a 200 mL/g donde el tóxico a eliminar fué el 4-clorofenol y se tuvo buena sedimentabilidad con 200 mL/g.

1.5.2 Eliminación de compuestos nitrogenados en el SBR.

Se han realizado estudios eliminando compuestos carbonados, nitrogenados (Garrido y col, 2001; Lee y Jong, 1999) y fosforados (Nava-Ramírez y González-Martínez, 2000) en los cuales se han encontrado eficiencias de eliminación de nitrógeno mayores que 95%, y 97% para el fósforo, trabajando con condiciones iniciales de 909 mg N-NH₄⁺/L y 88.7 mg/L de P-PO₄³⁻ con una duración de 8 h por ciclo obteniendo un rendimiento nitrificante (Y_{NO3}) de 0.73 (Obaja y col, 2003). Por otro lado Merzouki y col. (2001) observaron que una eliminación de 120 mgN-NO₃⁻/L favorece la eliminación de fósforo (99%) bajo condiciones desnitrificantes pero no reportan la formación de N₂.

En un SBR se han observado que las eficiencias de eliminación de nitrógeno puede ir del 60 al 99%, dependiendo de las condiciones ambientales presentes en el reactor (Garrido y col., 2001).

Por otro lado, se ha estudiado la eliminación de fuentes carbonadas como el polihidroxibutirato (PHB) mediante la nitrificación y desnitrificación simultáneas, alcanzándose eficiencias de eliminación de PHB del 61% y eficiencias de eliminación de compuestos nitrogenados del 78% (Third y col, 2003). Es importante observar que en diversos estudios que se realizan no mencionan si hubo formación de N₂ para así, sugerir que se llevó a cabo un proceso desnitrificante, por lo que es necesario realizar estudios donde se de evidencia de que efectivamente la desnitrificación se llevó a cabo.

1.6 Tolueno.

El tolueno es un compuesto aromático no polar y por esta razón es poco soluble en agua, pero soluble en solventes como éter, acetona, etanol, cloroformo, ácido acético glacial, disulfuro de carbono y aceites (Budavari y col, 1989). Algunas propiedades fisicoquímicas del tolueno se muestran en la Tabla 1. Es utilizado en combustibles para automóviles, como disolvente de pinturas, etil celulosa, poliestireno, polialcohol vinílico, etc. También se utiliza como materia prima en la elaboración de una gran variedad de productos como benceno, ácido benzoico, fenol, benzaldehido, explosivos (TNT), etc. Puede ser producido, por reformación catalítica de las fracciones de petróleo ricas en naftenos, aunque también se produce en forma natural en el petróleo crudo (ATSDR, 2000).

El tolueno puede entrar al agua superficial y al agua subterránea debido a derrames de solventes y productos de petróleo, como también por fugas de tanques subterráneos en gasolineras. Cuando se usan productos que contienen tolueno y se desechan en vertederos o en sitios para residuos, el tolueno puede entrar al suelo o al agua (ATSDR, 2000).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del tolueno

Propiedad fisicoquímica	
Punto de ebullición (°C)	111
Punto de fusión (°C)	-95
Densidad a 25 °C (g/mL)	0.87
Solubilidad en agua a 20°C (mg/L)	510
Presión de vapor a 30 °C (mm de Hg)	37.7
Índice de refracción a 20 °C	1.4967
Temperatura de autoignición (°C)	530- 600
Coeficiente de partición octanol-agua a 20°C	2.69
Temperatura crítica (°C)	318.64
Presión crítica (atm)	40.55
Calor de vaporización a 25 °C (Kcal/mol)	9.08
Tensión superficial a 25°C (mN/m)	27.92
Calor de combustión a 25 °C y presión constante (Kcal/mol)	934.5

(Budavari y col, 1989)

1.6.1 Efectos del tolueno en la salud.

El tolueno puede afectar al sistema nervioso. Niveles bajos o moderados pueden producir cansancio, confusión, debilidad, pérdida de la memoria, náusea, pérdida del apetito, pérdida de la audición y la vista. La inhalación de niveles altos de tolueno por un período breve puede hacer sentir mareos o somnolencia. También puede causar pérdida del conocimiento, y aún la muerte (Frazer y col, 1995). La EPA (Environmental Protection Agency) en Estados Unidos de América ha determinado que el tolueno no puede clasificarse en base a carcinogenicidad.

Es probable que los efectos sobre la salud de niños expuestos al tolueno sean los mismos que los observados en adultos. Algunos estudios en animales sugieren que los bebés y niños de corta edad pueden ser más susceptibles que los adultos. En Estados Unidos de América, la EPA ha establecido un límite de 1 mg/L para tolueno en el agua potable. La Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido un límite de 200 partes de tolueno por millón de partes de aire en el área de trabajo. Se ha observado que una concentración de 150 μ mol de tolueno puede ocasionar alteraciones en la estructura celular, de la misma forma puede causar rompimiento de proteínas y RNA, así como daño de la membrana citoplasmática (Sikkema y col, 1995).

1.6.2 Eliminación y mineralización del tolueno.

Se ha visto que el tolueno se puede consumir en cultivo en lote bajo diversas condiciones: metanogénicas, sulfato reductoras, aerobias y desnitrificantes (Evans y col, 1991). En condiciones aerobias se han propuesto diversas rutas para eliminar el tolueno, en el cual intervienen enzimas como la monooxigenasa y dioxigenasa, las cuales incorporan oxígeno al anillo aromático confiriendo de esta forma susceptibilidad para una posterior oxidación. Se han identificado cinco rutas de oxidación del tolueno, las cuales se encuentran reunidas en el trabajo de Gülensoy y Alvarez (1999) (Figura 4). Los intermediarios que se generan en estas vías por ejemplo, el catecol y el protocatecate son transformados a intermediarios de algunas rutas oxidativas, como por ejemplo el ácido cítrico o de la β -oxidación, como el fumarato, piruvato o acetato. Estos son asimilados por la célula o oxidados hasta CO₂ (Parés y Juárez, 1997).

Otra ruta bajo condiciones anaerobias propuesta por Biegert y col (1995), se involucra la formación de bencilsuccinato por la adición de fumarato (Figura 5). Por otro lado, bajo condiciones anaerobias se ha estudiado una vía para la eliminación del tolueno, en el cual el benzoato es un intermediario central en la eliminación de diversos compuestos aromáticos (Lovley y Lonergan, 1990). Recientemente se ha propuesto una condensación oxidativa del tolueno a acetyl-CoA y fenilpropionil-CoA como reacción inicial en una bacteria desnitrificante T1. Por otro lado se ha propuesto que en bacterias desnitrificantes, la hidroxilación del grupo metilo del tolueno produce benzoato vía bencilalcohol y benzaldehído (Kuhn y col, 1988).

Altenschmidt y Fuchs. (1991) evidenciaron la formación de un alcohol aromático y un aldehído en un estudio por inhibición, en un cultivo de bacterias desnitrificantes *Pseudomonas*. Ambos cultivos, a los que denominaron cultivo T y cultivo K172 crecieron anaeróticamente con tolueno, benzaldehído y benzoato, pero sólo el cultivo K172 creció con bencil-alcohol, el cual puede ser considerado como prerequisite para la activación del consumo del tolueno vía oxidación del grupo metilo.

Se han realizado trabajos para elucidar las vías de eliminación del tolueno en cultivos axénicos, entre los cuales se han estudiado el comportamiento de cuatro cepas desnitrificantes como *Thauera aromatica* (Evans y col, 1991), *Azoarcus tolulyticus* (Schocher y col, 1991), *Desulfobacula toluolica* (Fries y col, 1994) y *Geobacter metallireducens* (Lovley y Lonergan, 1990). En diversos trabajos sólo se menciona la eliminación biológica del tolueno pero no se evidencia si se presentó una mineralización, o una asimilación del tolueno. Al respecto Evans y col. (1991) mencionan que una concentración de 28 mg/L fue consumido en 7 días, por un cultivo desnitrificante, el cual sólo el 57% fue dirigido a la formación de CO₂ y el resto fue asimilado.

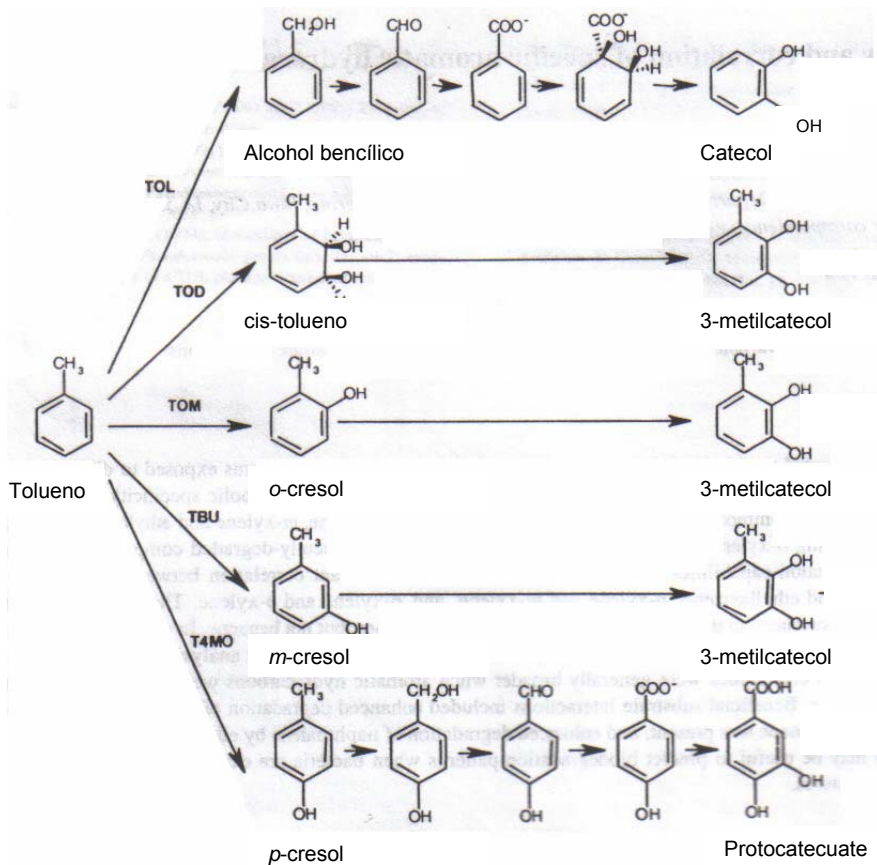


Figura 4. Diversas vías de eliminación del tolueno bajo condiciones aerobias. La vía TOL es llevada a cabo por *Pseudomonas putida* mt-2, en la vía TOD participa *P. putida* F1, la vía TOM es llevada a cabo por *Burkholderia cepacia* G4, la vía TBU por *B. pickettii* PK01, la vía T4MO por *P. mendocina* KR1.

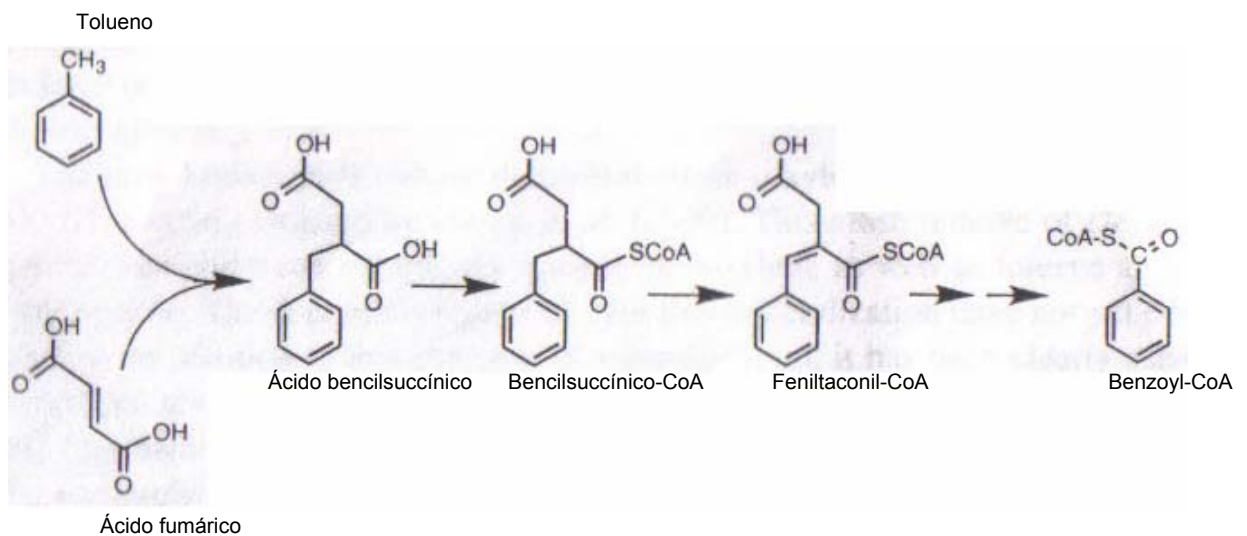


Figura 5 Vía para la eliminación del tolueno (Biegert y col, 1995)

Por otro lado Peña-Calva y col. (2004) evidenciaron la mineralización del tolueno en cultivo en lote, empleando una concentración inicial de 70 mgC-tolueno/L con un consorcio desnitrificante obteniendo una eficiencia de consumo de tolueno del 100%, un rendimiento de formación de HCO_3^- de 0.8, y una velocidad específica de eliminación de C-tolueno de 0.025 mg C-tolueno/mg SSV^od. Se ha estudiado también la eliminación del tolueno en reactores SBR mediante la desnitrificación con una concentración inicial de 5 mg tolueno/L obteniéndose una velocidad volumétrica de eliminación de tolueno de 0.833 mg tolueno/Lh con ciclos de 24 horas, obteniéndose una eficiencia de eliminación de tolueno cercana al 100%, pero no se reporta la formación de N_2 (Ma y Love, 2001). Por otro lado en cultivo en continuo, Martínez y col. (2003) en un reactor UASB eliminaron compuestos nitrogenados y carbonados mediante la desnitrificación en el cual, ensayan velocidades de carga de tolueno entre 25 y 125 mg C/Ld alcanzando eficiencias de consumo de carbono y nitrógeno mayores que 87% con rendimientos de nitrógeno superiores a 0.87.

1.7 Composición de lodos.

Los lodos están usualmente formados por dos fracciones: a) una microflora heterogénea que forma el consorcio y b) una mezcla compleja de SEP (sustancias exopoliméricas) constituida de carbohidratos, lípidos, proteínas, entre otros. Se puede denominar consorcio a un sistema de miembros en el cual los microorganismos viven en forma de agregados, biopelículas, flóculos o gránulos. Varios tipos de conglomerados microbianos han sido descritos como gránulos, y flóculos. Algunas veces no es clara la diferencia en los diferentes conglomerados. Después de la sedimentación, los conglomerados presentan una apariencia bien definida, donde se pueden observar gránulos, flóculos, etc (Schmidt y Ahring, 1996). Los gránulos son agregados microbianos que pueden presentar las siguientes características físicas: tamaño, densidad, flotabilidad y tensión superficial. Se ha considerado que un factor que puede afectar al gránulo como disgregación o cambio de volumen de éste, son las condiciones ambientales como el tipo de sustrato, condiciones operacionales del reactor entre otras (Puñal y Chamy, 2003). La estructura de un flóculo está conformada por numerosas

partículas y agregados microbianos embebidos en exopolímeros que forman al flóculo. El gránulo, por otro lado, podría considerarse como un arreglo de niveles. En un nivel se sugiere la presencia de microcolonias, las cuales están unidas con exopolímeros que forman otro nivel del gránulo (Dangcong y col, 1999). En algunos trabajos se ha propuesto que el contenido de SEP en gránulos es mayor (1-1.6 mg/g SSV) que en los flóculos (0.3 mg/g SSV). También se ha observado que el contenido de SEP en lodos anaerobios es menor que en lodos aerobios. Para esto hay una posible explicación, ya algunos microorganismos no poseen peptidoglicano como en las Archaea o en Eukaria, un componente esencial de un lípido que sirve como acarreador en el transporte a través de las bacterias. Se ha asociado este acarreador con la síntesis de SEP y de esta forma la concentración de SEP se ve limitada en lodos anaerobios (Morgan y col, 1990).

1.7.1 Estabilidad de los lodos.

Se han presentado problemas de operación en diversos tipos de reactores, uno de ellos puede ser el SBR en el cual se ha sugerido la falta de sedimentabilidad del lodo, disminución de la velocidad de sedimentación y acumulación de biomasa. Diversas causas han sido propuestas para tratar de explicar la falta de sedimentabilidad, pero aún ahora en nuestros días su origen es desconocido. Entre las causas propuestas reportadas en la literatura están el tipo de microorganismos, crecimiento excesivo microbiano y cambios en la actividad microbiana debido a cambios en el influente (concentración o tipo de sustrato entre otros) y la presencia de sustancias exopoliméricas (SEP) (Urbain y col, 1993).

La falta de sedimentabilidad está estrechamente relacionada con el flotamiento de lodo. Una hipótesis sugiere que es debido a la proliferación de bacterias filamentosas (Li y col, 2002). Hay evidencias que sugieren que la concentración de SEP, propiedades superficiales, distribución y tamaño del flóculo así como su densidad, son algunos factores asociados con las propiedades estructurales (sedimentabilidad) del lodo (Jin y col, 2003). y otro tipo de problema, es que presentan pobres propiedades de sedimentación. En muchos casos se

desea la formación de flóculos grandes y densos para tener una buena sedimentación y llegar a la formación de gránulos (Morgan y col. 1990).

Algunas variables que afectan las propiedades del lodo se pueden clasificar de acuerdo a Jin y col., (2003):

- 1) Condiciones del proceso.
- 2) Constituyentes químicos en los lodos.
- 3) Consorcio microbiano y su actividad.
- 4) Capacidad floculante y propiedades de la superficie del flóculo.
- 5) Estructura del flóculo.

1.8 Sustancias exopoliméricas (SEP).

Las SEP son importantes en procesos biológicos de tratamientos de aguas residuales ya que median la unión del biofilm, flóculos y de los gránulos (Shin y col., 2001) como se ilustra en la Fig 6 (Schmidt y Ahring, 1996).

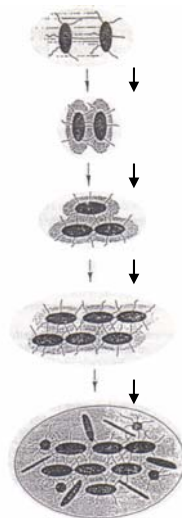


Fig 6 Asociación reversible de bacterias que se adhieren mediante polímeros extracelulares (Schmidt y Ahring, 1996).

Se ha sugerido que las SEP pueden tener diversos orígenes, el primero resulta del metabolismo de los microorganismos, el segundo proviene de la lisis celular y el tercero menciona que puede provenir de los influentes (Urbain y col, 1993).

1.8.1 Composición de las SEP.

Las SEP agrupan diferentes macromoléculas como polisacáridos (en los polisacáridos se han encontrado grupos α -manosil terminales, azúcares D-glucosa y N-acetil glucosamina) (Bura y col., 1998), proteínas, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y húmicos. Además de los biopolímeros en la matriz de las SEP se han encontrado restos celulares, arcillas, iones y sales minerales (Janh y Nielsen, 1998; Wingender y Flemming, 1999).

Se ha observado que los polisacáridos tienen un papel importante sobre la arquitectura del gránulo y su estabilidad por mediar la interacción célula-célula, ya que se ha sugerido que las células formen una estructura tridimensional, con la cual puedan interaccionar otras células y nutrientes (Liu y col, 2004). En diferentes tipos de lodos, se ha sugerido que la concentración de proteína exopolimérica (PE) es mayor, en comparación con los carbohidratos exopoliméricos (CE), entre los que podemos mencionar a los lodos nitrificantes (Frølund y col, 1996), lodos desnitrificantes (Choi y col, 2001) y metanogénicos (Puñal y Chamy, 2003).

En la Tabla 2 se destaca que los datos de SEP presentados, tienen intervalos de variación muy grandes, situación atribuible a diversos factores como el método de extracción, origen del lodo, cambios en las condiciones operacionales como la velocidad de carga (Cuervo-López y col., 1999), tipo de sustrato, así como limitaciones de oxígeno, temperatura, (Krishna y col, 1999), tipos de microorganismos presentes en el agregado microbiano y se ha sugerido también a la concentración de SSV presentes en los reactores.

Se ha evidenciado que los microorganismos pueden adherirse hidrofólicamente o hidrofílicamente a la superficie mediante diversos componentes de SEP ya que se ha enfatizado la importancia de fuerzas responsables en la adhesión, entre las cuales se puede mencionar: interacciones electrostáticas, puentes de hidrógenos y fuerzas de dispersión de London (Flemming y Wingender, 2001). Con base en estas evidencias, las tres fuerzas mencionadas contribuyen a la estabilidad del floculo, gránulos y biofilms. El resultado de esta estructura es una red tridimensional de SEP donde la composición, estructura y propiedades pueden

variar dinámicamente, dependiendo de la respuesta de los microorganismos presentes, debido a los cambios en las condiciones ambientales.

Tabla 2 Composición de las SEP

Compuesto	Contenido en SEP
Polisacáridos	40-95%
Proteínas	1-60%
Ácidos nucleicos	1-10%
Lípidos	1-40%

(Fleminger y Wingender 2001)

Se ha evidenciado que un factor ambiental que puede influenciar en la producción y la composición de SEP son las regulaciones vía metabolismo que son activadas para la síntesis de SEP en respuesta a los cambios en las condiciones de cultivo. También, se ha propuesto que la composición de las SEP puede depender del tipo de microorganismos. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* es una cepa modelo en donde se ha estudiado la composición de las SEP, donde el 45% de SEP son proteínas (Flemming y Wingender, 2001). Sin embargo el tipo y la concentración posiblemente están relacionados con las condiciones de cultivo como pueden ser temperatura, velocidad de carga de sustrato, tipo de sustrato, etc (Nichols y col, 2004; Tay y col, 2001; Qin y col, 2004; Liu y col, 2004).

La C/N es importante para determinar los carbohidratos y proteínas contenidos en ellas. De esta forma la relación C/N influencia la cantidad y la composición de polímeros extracelulares, ya que se ha observado que cuando aumenta la relación C/N, se favorece la síntesis de exopolímeros (Fuller y Scow, 1997). Se ha evidenciado que a bajas relaciones C/N (5), los polímeros extraídos contienen una alta concentración de proteínas y un bajo contenido de carbohidratos. Mientras que a una relación C/N de 17.5 y 40, los carbohidratos exopoliméricos incrementan y las proteínas exopoliméricas disminuyen, en un reactor semi-continuo (Durmaz y Sanin, 2001). No obstante, el comportamiento de las SEP puede ser muy variado, ya que se ha observado que la conducta de la

PE puede presentar una mayor variación en comparación a los CE (Cuervo-López, 2003; Martínez y col, 2000). Martínez, y col, (2003) en un proceso nitrificante con una C/N de 1.5 sugieren, que el comportamiento en la concentración de las PE presentaron una variación del 93%.

1.8.2 Efecto de los nutrientes sobre las SEP.

El aumento en la síntesis de SEP también ha sido asociada con diversos factores, como el exceso de nutrientes, o deficiencia de ellos (Puñal y col, 2003). Se ha observado que la fuente de carbono tiene un efecto sobre la síntesis de exopolímeros, ya que Cuervo-López y col (1999) evidenciaron la presencia de una mayor concentración de SEP en presencia de lactato en comparación con glucosa y acetato en sistemas desnitrificantes. También se ha evidenciado que *Acinetobacter* sp. cultivado en sacarosa, lactosa y maltosa produce menor cantidad de SEP que cuando se cultiva en glucosa, fructosa, manosa o arabinosa (Pirog y col, 2002). Mientras que en procesos nitrificantes donde la fuente de carbono es bicarbonato, la concentración de PE puede ser mayor (82 mgPE/L) en comparación a los CE (26 mgCE/L) (Martínez y col, 2004).

Como se puede observar la literatura menciona diversas fuentes de carbono, las cuales influyen sobre el aumento o disminución en la síntesis de SEP, pero no se encuentra bien documentado sobre fuentes de energía no polares, como hidrocarburos aromáticos (tolueno), por lo que faltan estudios que nos den evidencias sobre el efecto sobre las SEP.

1.8.3 Efecto de las SEP sobre la sedimentabilidad de los lodos.

La falta de sedimentabilidad e inestabilidad de lodos granulares y no granulares es uno de los principales problemas en tratamiento de aguas residuales. Diversas causas han sido propuestas pero aún ahora en nuestros días el origen de estos problemas no está bien entendido (Goodwin y Forster., 1985). Evidencias muestran la presencia de inestabilidad estructural (falta de sedimentabilidad) del lodo cuando aumenta la concentración de SEP (Goodwin y Forster 1985; Urbain y col. 1993; Schmidt y Ahring, 1994; Cuervo-López y col. 1999).

Sin embargo hay evidencias en cuanto a los cambios de concentración de los componentes de las SEP, ya que en lodos granulares nitrificantes se ha evidenciado que la concentración de proteína fué mayor que los carbohidratos, sugiriendo que las proteínas exopoliméricas parecen afectar la sedimentabilidad y estabilidad de los lodos (Martínez. y col., 2004).

Diversos autores han relacionado la sedimentabilidad de la estructura del lodo con la relación PE/CE. En lodos desnitrificantes, los cambios de sedimentabilidad y estabilidad, parecen estar relacionadas con el contenido de SEP que puede ser expresados en la relación PE/CE (relación proteína exopolimérica / carbohidrato exopolimérico). Cuervo-López y col. (1999) evidenciaron una concordancia entre el aumento de la relación P/C y el efecto de inestabilidad del lodo desnitrificante en un reactor, ya que conforme aumenta la relación PE/CE se presenta la flotación de lodos. Se ha sugerido que el intervalo característico de la relación PE/CE se puede encontrar entre 3 y 5 en lodos anaerobios (Morgan y col 1990).

Otra forma de predecir el comportamiento del lodo es mediante el índice volumétrico del lodo (IVL), ya que se ha sugerido que valores mayores que 150 ó 200 mL/g se puede presentar la falta de sedimentabilidad (Dangcong y col, 1999). Diversos autores han asociado el comportamiento del IVL con las SEP. Hay evidencias de que cuando aumenta el IVL la concentración de PE aumenta considerablemente y puede presentarse el aumento del IVL, tanto en lodos nitrificantes (Martínez y col, 2004), lodos anaerobios (Jin y col, 2003; Hoa y col, 2003) y sistemas aerobios (Tay y col, 2001). Se ha sugerido una asociación, entre el comportamiento entre el IVL y la PE, ya que Martínez y col, (2000) mostraron evidencias en las cuales el IVL puede presentar un comportamiento de onda, de igual forma las PE pueden presentar este comportamiento con un máximo y mínimo (de 5 a 45 mg PE/L).

1.9 REFERENCIAS

- Alemayehu M., Kumar, P. and Kumar A.** (2001). Use of sequencing batch reactor for biological denitrification of high nitrate-containing water. *Journal of environmental engineering.*, **127**(3): 273-278.
- Alvarez, P. J.J., y Gülensoy, N.** (1999). Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbons biodegradation capabilities. *Biodegradation*. **10**: 331-340.
- Altenschmidt, U. y Fuchs, G.** (1991). Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Arch. Microbiol.* **156**: 152-158.
- Berks, B. D., Richardson, C., Robinson, A., Reilly, A. Willis y S. Ferguson.** (1995). The *napEDABC* gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. *Biochem. J.* **309**: 983-992.
- Biegert, T. Fuchs, G.** (1995). Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and cells extracts of a denitrifying *Thauera* sp. *Arch. Microbiol.* **63**: 407-417.
- Budavari, S., Maryadele, J.O. Neil., Ann Smith, Heckelman, P.E.** (1989). The Merck index an encyclopedian of chemicals, drugs and biological. 11ava edición. Merck & Co. Inc. USA.
- Buitron, G., Soto, G. y Moreno, J.** (2001). Strategies to enhance the biodegradation of toxic compounds using discontinuous processes. *Wat. Sci. Technol.* **14**: 227-236.
- Bura, R., Cheung, M., Liao B., Finlayson, J., Lee, B. C., Droppo, I. G., Leppard G.G. and Liss S.N.,** (1998) Composition of extracellular polymeric substances in the activate sludge floc matrix. *Wat. Sci. Tech.* **37**(4-5): 325-333.
- Carr, G. y Ferguson, S.** (1990). The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. J.* **269**: 423-429.
- Cervantes, F., O. Monroy y J. Gómez.** (1998). Accumulation of intermediates in a denitrifying process at different copper and high nitrate concentrations. *Biotechnol. Lett.* **20**: 959-961.
- Cervantes C.F., Pérez, J. y Gómez J.** (2000). Avances en la eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología.*, **42**: 73-82.
- Comisión Nacional del Agua (CNA). Estadísticas del agua en México. 2004.

Cuervo López F M.(2003). Estudio biológico-fisicoquímico de un lodo desnitrificante alimentado con diferentes fuentes de electrones. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

Cuervo-López F M., Margínez F. Gutiérrez-Rojas M. Noyola R. A. And Gomez J. (1999). Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in UASB reactors. *Wat. Sci. Tech.* **40**: 123-130.

Choi E., Yun Z., Park Y., Lee H., Jeong H., Kim K., Lee H., Rho K and Gil K. (2001) Extracellular polymeric substances in relation to nutrient removal from a sequencing batch biofilm reactor. *Wat. Sci. Technol.* **43**(6): 185-192.

Dangcong, P., Bernet, N., Delgenes, J-P y Moletta, R. (1999). Aerobic granular sludge-a case report. *Wat. Res.* **3**: 890-893.

Durmaz, B., y Sanin, F.D. (2001). Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge. *Wat. Sci. and Technol.* **44**(10): 221-229.

EPA. Folleto informativo de tecnologías de aguas residuales. Reactores secuenciales por tandas, Septiembre, 1999.

Evans, W. C., y Fuchs, G. (1988). Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 1139-1145.

Evans, P. J., Mang, D. T., and Young., L. Y. (1991). Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by Denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2), 450-454.

Evans, P. J., Mang, D. T., Kim. K. S., y Young, L. (1991). Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(4): 1139-1145.

Ferguson, S. (1994). Denitrification and its control. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**: 89-110.

Flemming, H.C. and Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part I: Structural and ecological aspects. *Wat. Sci. Tech.* **43**(6): 1-8.

Frazer, A.C., Coschigano, P. W., y Young, L.Y. (1995). Toluene metabolism under anaerobic conditions: a review. *Anaerobe.* **1**: 293-303.

Fries, M. R., Zhou, J., Chee-Sanford, J., Tiedje, J.M. (1994). Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(8): 2802-2810.

Frølund B., Palmgren R., Keiding K and Nielsen P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat. Res* **30**(8): 1749-1758.

Fuller, M.E., y Scow. K.W. (1997). Lack of capsular exopolymer effects on the biodegradation of organic compounds by *Pseudomonas* sp. Strains JS1 y JS150. *Microbial ecology.* **34**: 248-253.

Garrido J.M., Omil F., Arrojo B., Méndez R. And Lema J.M. (2001). Carbon and nitrogen removal from a wastewater of an industrial dairy laboratory with a coupled anaerobic filter-sequencing batch reactor system. *Wat. Sci. Tech.*,**43**(3): 249-256.

Goodwing, J.A.S. and Forster, C.F. (1985). A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlemente characteristics. *Water Res.* **19**: 527-533.

Gülensoy, N., y Alvarez, P.J.J. (1999). Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. *Biodegradation.* **10**: 331-340.

Hoa P.T., Nair L., Visvanathan C. (2003). The effect of nutrients on extracellular polymeric substance production and its influence on sludge properties. *Water S A.* **29**(4); 437-442.

Irvine, R.L., Wilderer, P.A y Flemming, H-C. (1997) Controlled unsteady state processes and technologies – an overview. *Wat. Sci. Tech.* **1**: 1-10.

Jahn, A., Nielsen, P.H. (1998). Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Wat. Sci. Tech.* **37**:17-24.

Jetten, M., S. Logerman, G. Muyzer, L. Robertson, S de Vries, M van Loosdrecht y Kuenen. (1997) Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antoine van Leeuwenhoek.* **71**: 75.93.

Jin B., Wilén B. M., Lant P. (2003). A comprehensive insight into floc characteristics and their impact on compressibility and settleability of activated sludge. *Chemical Engineering Journal.* **95**; 221-234.

Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**: 43-70.

Krishna, Ch., y Van Loosdrecht, M.C.M., (1999). Effect of temperature on storage polymers and settleability of activated sludge. *Wat. Res.* **33**(10): 2374-2382.

Kuhn, E. P., Zeyer, J.E., Eicher, P., y Schwarzenbach, R. P. (1988). Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(2): 490-496.

Lee D., Jong M.P.(1999). Neural network modeling for on-line estimation of nutrient dynamics in a sequentially-operated batch reactor. *Journal of Biotechnol.*, **75**: 29-239.

Li, X.G., Cao, H.B., Wu, J.C., Zhong, F.L. y Yu, K.T. (2002). Enhanced extraction of extracellular polymeric substances from biofilms by alternating current. *Biotechnology Letters*, **24**: 619-62.

Liu, Y-Q., Liu, Y., Tay, J-H. (2004). The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **65**: 143-148.

Lovley, D. R., Lonergan, D.J. (1990). Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(6): 1858-1864.

Lloyd, H. Ketchum, Jr. (1997). Design and physical features of sequencing batch reactors. *Wat. Sci. Tech.*, **35**(1): 11-18.

Ma, G., and Love, N.G. (2001). BTX biodegradation in activated sludge under multiple redox conditions. *J. Env. Eng.* **127**(6); 509-516.

Madigan, M.T, Martinko, J.M. y Parker, J. (1999). Brock. Biología de los microorganismos. 8^{ava} ed. revisada. Prentice-Hall Iberia. España pp. 1064.

Martínez, F., Favela-Torres, E., Gomez, J., (2000). Oscillation of exopolymeric composition and sludge volume index in nitrifying flocs. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **87**: (177-187).

Martínez F.O., Lema J., Méndez R., Cuervo-López and Gómez J. (2004). Role of exopolimeric protein on the settleability of nitrifying sludges. *Bioresourse Technology*.

Martins, A. M., Heijnen, J.J. y van Loosdrecht, M.C. (2003). Bulking sludge in biological nutrient removal systems. *Biotechnology and bioengineering.* **86**(2): 125-135.

Matějů, V., Čížinká, S, Krejčí, J. and Janoch, T. (1992). Biological Water denitrification. A review, *Enzyme Microbe. Technol.* **14**: 170-183.

Merzouki, M., Bernet, N., Delgenès, J-P., Moletta, R., y Benlemlih, M. (2001). Biological denitrifying phosphorus removal in SBR: effect of added

nitrate concentration and sludge retention time. *Wat. Sci. Technol.* **43**(3): 19-94.

Monroy, O., Fama, G, Meraz, M., Montoya, L. Y Macarie H. (1998). Digestión anaerobia en México: estado de la tecnología. *Ingeniería de ciencias ambientales.* **39**: 12-22.

Moreno-Andrade, I., y Buitrón, G. (2004). Evolución de la actividad de los microorganismos en los procesos de aclimatación y desaclimatación al 4-clorofenol. XIV Congreso Nacional de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales AC, Mazatlán, Sinaloa.

Morgan, J.W., Forster, C.F., y Evison, L. (1990). A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Wat. Res.* **24**(6): 743-750.

Münch E.V., Lant P and Keller J. (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors., *Wat. Res.*, **30**(2): 227-284.

Murat, S., Genceli, E. A., Taşh, R., Artan, N. y Orhon, D. (2002). Sequencing batch reactor treatment of tannery wastewater for carbon and nitrogen removal. *Wat. Sci. Technol.* **46**(9): 219-227.

Nava-Ramírez, C., y González-Martínez, S. (2000). Phosphorus uptake kinetics in a biofilm sequencing batch reactor. *Bioprocess Engineering.* **23**: 143-147.

Nichols CAM., Garon, S., Bowman, J.P., Raguenes, G., Guezennec, J. (2004). Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J Appl Microbiol.* **96**: 1057-1066.

Noyola A. (1990). Tratamiento anaerobio de aguas residuales: una experiencia de adaptación de tecnología en México “*Memorias de la serie de conferencias sobre tratamiento anaerobio de aguas residuales en América Latina*”, Instituto de Ingeniería, UNAM, pp.337-358.

Obaja D., Macé S., Costa J., Mata-Alvarez. (2003). Nitrification, denitrification and biological phosphorus removal in piggery wastewater using a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, **87**: 103-111.

Parés y Juárez. Bioquímica de los microorganismos. Edit. Reverté. 1997.

Peña-Calva, A., Olmos-Dichara, A., Viniegra-González, G., Cuervo-López, F.M. y Gómez, J. (2004). Denitrification in presence of benzene, toluene, and *m*-xylene. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **119**: 195-208.

Pirog, T.P., Kovalenko, M.A y Kuz'minskaya, Y.V. (2002). Exopolysaccharide production and peculiarities of C₆- Metabolism in *Acinetobacter* sp. Grown on carbohydrate substrates. *Microbiology*, **71**(2): 182-188.

Puñal, A. y Chamy, R. (2003). Dynamics of granules physical properties in UASB and EGSB reactors for the treatment of medium and low concentrated wastewaters. *Wat. Sci. and Technol.* **48**(6): 41-49.

Qin, L., Liu, Q. S., Yang, S.F., Tay, J.H., y Liu, Y. (2004). Stressful conditions-induced production of extracellular polysaccharides in aerobic granulation process. *Civil Eng Res.* **17**: 49-51.

Reseña Toxicológica del Tolueno. 2000. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.

Schmidt, J.E., Ahring, B.K. (1994). Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 229-246.

Schmidt, J.E., Ahring, B.K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) Reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 229-246.

Schocher, R. J., Seyfried, B., y Zeyer, J. (1991). Anaerobic degradation of toluene by pure cultures of denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **157**(1): 7-12.

Shin H.S., Kang S.T., Nam S.Y. (2001). Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. *Wat. Sci. and Tech.* **43** (6): 193-196.

Sikkema J., Bont J.A.M and Poolma B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, **59**(2): 201-222.

Tay, J-H., Liu, Q-S., y Liu, Y. (2001). The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology*, **33**: 222-226.

Third, K.A., Burnett, N., y Cord-Ruwisch, R. (2003). Simultaneous nitrification and denitrification using stored substrate (PHB) as the electron donor in a SBR. *Biotechnology and bioengineering*, **83**(6): 706-720.

Tiedje J. M. (1988). in Zehnder A. J. B. ed. Biology of anaerobic microorganisms, chap. 4th. Wiley, NY.

Tijhuis, L., H. D. Huisman, M. van Loosdrecht y J. Heijnen. (1995). Formation of nitrifying biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 585-595.

Urbain, V., Block, J. C and Manem, J. (1993). Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. *Wat. Res.* **27**: 829-838.

Wingender, J. y Flemming, H.C. (1999) Autoaggregation in flocs and biofilms: In: *Biotechnology*. **8**. J. Winter (ed.) 63-86.

Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification, *Microbiology and molecular biology reviews*. **61**(4): 533-616.



Capítulo 2
OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Estudiar la fisiología del proceso respiratorio desnitrificante con acetato y tolueno como fuente de energía en un SBR y los cambios de sedimentabilidad del lodo a través de las sustancias exopoliméricas.

2.2 Objetivos particulares

- Evaluar el proceso respiratorio en el lodo desnitrificante alimentado con acetato y tolueno.
- Evaluar los cambios de sedimentabilidad del lodo en presencia de acetato y tolueno.
- Evaluar el efecto de la concentración de los SSV sobre el proceso respiratorio así como en la sedimentabilidad del lodo alimentado con tolueno.



Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estabilización del reactor UASB continuo desnitrificante en estado estacionario.

3.1.1 Obtención de inóculo en el reactor UASB

Con el propósito de obtener un cultivo desnitrificante, fisiológica y metabólicamente estable, se utilizó un reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB: upflow anaerobic sludge blanket), de un volumen de 1.45L alimentado en continuo (Figura 7). El reactor se mantuvo a una temperatura de 30°C. En el reactor, se inoculó, obteniéndose una concentración final de 4.3 gSSV/l.

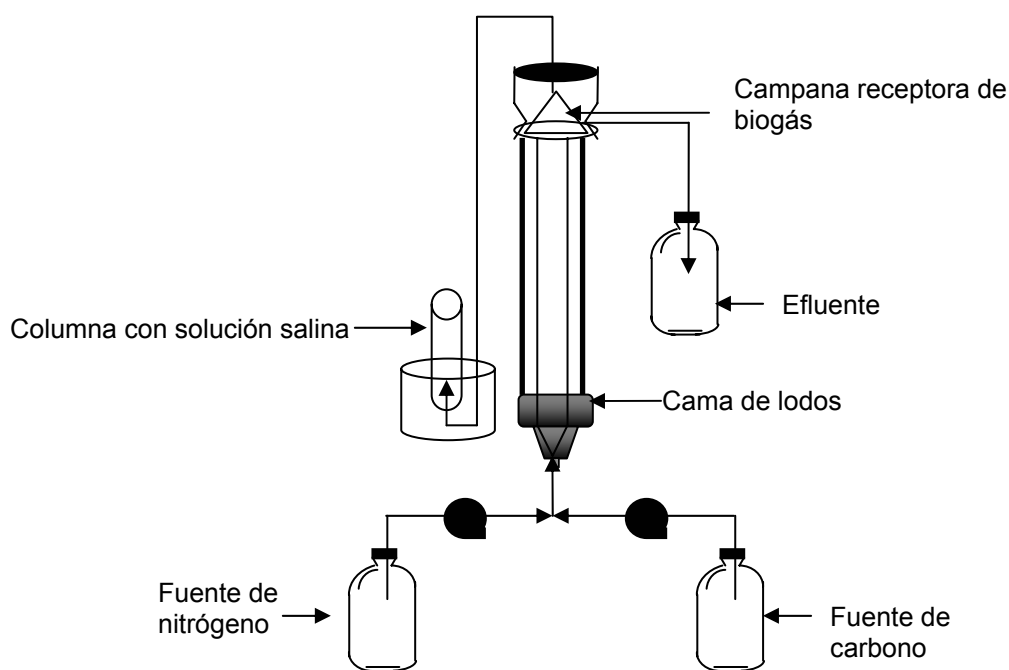


Figura 7. Reactor UASB de laboratorio

3.1.2 Condiciones desnitrificantes en el reactor UASB

El reactor se mantuvo alimentado con el medio mencionado en la Tabla 3, y con las siguientes condiciones operacionales durante 50 días: 2 días de tiempo de residencia hidráulico (TRH) y una relación C/N de 1.4. La velocidad de carga

de nitrógeno fue de 142.85 mg de N-NO₃⁻/Ld y de carbono de 200 mg de C-CH₃COO⁻/Ld. El flujo de alimentación de cada uno de los medios fue de 0.362 L/d.

Se midieron las especies nitrogenadas y carbonadas en el influente y en el efluente (NO₃⁻, NO₂⁻, HCO₃⁻, CH₃COO⁻). Las variables de respuesta del reactor UASB que se evaluaron fueron velocidades de carga y descarga de las fuentes de carbono (Q_C) y nitrógeno (Q_N). Se calculó la velocidad de producción de gas (N₂, CH₄, N₂O, CO₂) y de formación de biomasa (BM). Se calcularon los rendimientos de producción de nitrógeno molecular (Y_{N₂}), de carbono inorgánico (Y_{HCO₃}) y de formación de biomasa (Y_{BM}) así como las eficiencias de consumo de nitrato (E_{NO₃}) y acetato (E_{acetato}).

Se consideró el estado estacionario cuando las velocidades de producción de N₂ y las velocidades de consumo de nitrato se mantuvieron constantes. Los materiales contenidos en el reactor se evaluaron en el estado estacionario mediante balances de nitrógeno y carbono. El balance de nitrógeno se muestra de la siguiente forma:

$$(dN/dt)_{\text{reactor}} = ((N\text{-NO}_3^- \text{ entrada} - (N\text{-NO}_3^- \text{ salida} + N\text{-NO}_2^- \text{ salida} + N\text{-biomasa salida})) - QN_2)/\text{TRH} = 0$$

donde:

TRH: tiempo de retención hidráulica,

Q: producción volumétrica de gas (mg N/Ld)

El balance de carbono esta representado por:

$$(dC/dt)_{\text{reactor}} = ((C_{\text{entrada}} - (C_{\text{salida}} + C\text{-HCO}_3^- + C\text{-biomasa})) - QCO_2)/\text{TRH} = 0$$

donde:

TRH: tiempo de retención hidráulica,

Q: producción volumétrica de gas (mg C/Ld)

3.1.3 Medición del gas producido

El gas producido en el UASB se recolectó y se midió en una columna (Fig 7) por desplazamiento con una solución salina saturada (300 g NaCl/L) ajustada a un pH menor que 5 para disminuir la solubilidad de los gases. Posteriormente se tomó 0.1mL de muestra gaseosa de la columna con una jeringa de 1mL. Se midió diariamente el volumen del efluente dividido entre el tiempo transcurrido.

3.2 Reactor de lote secuenciado (SBR)

El efecto del tipo de fuente de energía sobre el proceso respiratorio desnitrificante, así como en la sedimentabilidad del lodo se evaluó en un reactor SBR. El trabajo experimental se llevó a cabo en dos etapas. Para el análisis tanto de la fisiología del proceso desnitrificante, como la sedimentabilidad del lodo éste se llevó a cabo en el reactor de lote secuenciado (SBR) de 2L a 30°C y se efectuó en dos etapas. La primera consistió en la alimentación con acetato como fuente de energía (experimental). La segunda etapa consistió en la alimentación con tolueno, ensayando diferentes concentraciones de SSV siendo el nitrato el aceptor de electrones y la fuente nitrogenada, en ambas etapas.

3.2.1 Condiciones de operación en el SBR

Se utilizó un SBR con un volumen nominal de 1.9L y un volumen de operación de 1.7L.

El control del ciclo se realizó con tres temporizadores para regular el tiempo de alimentación, reacción y drenado. Durante el tiempo de reacción se mantuvo una agitación constante a 175 rpm y una temperatura de 30°C.

El medio mineral del cultivo se suministró en forma separada (Medio A y B) para evitar precipitados y tener una mayor disponibilidad de las sales en el cultivo y reducir la contaminación en los recipientes de alimentación. La composición del medio se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición del medio desnitrificante para el reactor SBR.

Medio A	g/L	Medio B	g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.6	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.06
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.12	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4		
KH ₂ PO ₄	2		

La concentración de carbono y nitrógeno en el medio fue de 70 mg C /L (C-acetato o C-tolueno según la etapa de alimentación) y 50 mg N-NO₃/L, respectivamente, obteniendo una relación C/N de 1.4. En cada fase de

alimentación la fuente de carbono y de nitrógeno, se suministró al inicio de cada ciclo, una vez que finalizaba la etapa de llenado del reactor y antes de empezar la etapa de reacción. El pH inicial fué ajustado a 7.0 con una solución de NaOH 10N. El esquema del sistema SBR se muestra en la Fig. 8.

3.2.2 Condiciones de operación del SBR alimentado con acetato como fuente de electrones.

Durante la etapa de alimentación con acetato, como fuente de electrones, el ciclo inició con 8 horas distribuido de la siguiente forma: llenado: 0.5 h, reacción: 6.5 h, sedimentado: 0.75 h y finalmente drenado: 0.25 h.

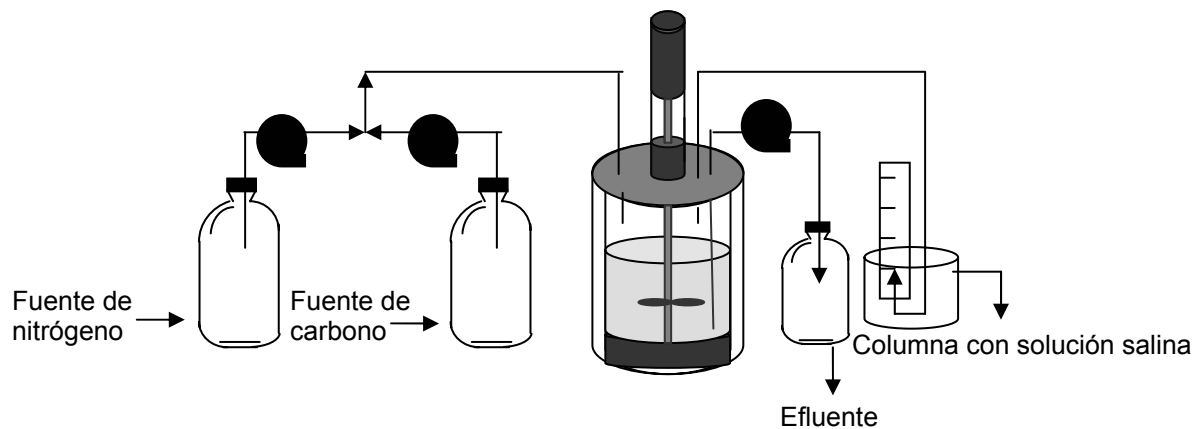


Figura 8. Reactor SBR de laboratorio

3.2.3 Condiciones de operación del SBR con tolueno como fuente de electrones

En la segunda etapa de alimentación con tolueno se inició el ciclo de trabajo con 72 horas distribuido de la siguiente manera: llenado: 0.25 h, reacción: 70.5 h, sedimentado: 1.0 h y finalmente drenado: 0.25 h. Durante el tiempo de reacción se mantuvo una agitación constante a 175 rpm y una temperatura de 30°C.

3.2.4 Evaluación del proceso respiratorio en el cultivo en el SBR

El comportamiento del cultivo fué evaluado mediante eficiencias de consumo (E , mg de sustrato consumido/mg de sustrato alimentado), rendimiento (Y , mg de

producto/mg de sustrato consumido, considerado como la eficiencia de la vía metabólica desnitrificante), velocidad específica de consumo de sustrato (q_s , mg de sustrato consumido/ [mg de VSS L*d]), y velocidad específica de producción (q_p , mg de producto/ [mg de VSS L*d]). La velocidad específica de consumo de sustrato fué calculada usando la ecuación $q_s = dS/dt \times 1/X$, donde; S es la concentración de sustrato (mg/L), t es el tiempo (d), y X es la concentración de biomasa (mg de SSV/L).

3.2.5 Ensayos abióticos en el SBR

Para determinar las pérdidas por volatilización del tolueno y la adsorción del tolueno en el lodo se realizaron dos tipos de pruebas abióticas. La primera se realizó en el SBR en el cual se probó que no existieran fugas por parte del tolueno en el sistema, el cual contenía 1.5 L sólo de medio mineral con 70 ppm de C-tolueno/L. A través del tiempo se midió la concentración de tolueno presente, en la fase líquida como en el espacio de cabeza.

Por otro lado se realizó una prueba abiótica para medir cuanto tolueno se quedaba adsorbido en el lodo, con la finalidad de detectar la capacidad de retención de tolueno en el lodo. Para la realización de esta prueba se utilizó una serie de botellas de 60 mL con 7mL de lodo esterilizado 30 min a una presión de 15 lb/in² previamente lavado dos veces con solución fisiológica (9g NaCl/L) y dos posteriores lavados con agua destilada. Una vez listo, el lodo se colocó en botellas serológicas de 60 mL y se añadieron 48 mL de medio mineral (Tabla 3) y 70 ppm de C-tolueno/L. A través del tiempo se midió el tolueno en el espacio de cabeza y en la fase líquida por cromatografía de gases.

3.2.6 Evaluación de la sedimentabilidad del lodo

La sedimentabilidad del lodo se evaluó por medio de la cuantificación de las sustancias exopoliméricas, como las proteínas exopoliméricas (PE) y carbohidratos exopoliméricos (CE), medición del índice volumétrico del lodo y velocidades de sedimentación al final de cada ciclo.

3.3 Métodos de análisis

A continuación se describen los fundamentos de los métodos y técnicas de análisis de los compuestos nitrogenados, carbonados, exopoliméricos y de biomasa.

3.3.1 Compuestos nitrogenados

Con respecto a la cuantificación de compuestos nitrogenados, se realizaron las curvas para la medición de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y nitrógeno molecular (N_2).

3.3.1.1 Cuantificación de (NO_3^-), nitrito (NO_2^-).

El método utilizado fue la electroforesis capilar de iones, el cual se basa en la migración electroforética de iones al aplicar un voltaje a través de un capilar, causando de esta manera una migración diferencial de los componentes de la muestra cargada eléctricamente hacia el electrodo positivo. Dependiendo de la polaridad de la energía suministrada y la composición del electrolito, el ión separado pasa a través de un detector. Se empleó un analizador capilar de iones (CIA, Prince Technologies CE 221, versión de software 1.1), a una temperatura de 28°C. El capilar fue una columna de sílice fundida, de 80 cm de largo y 75 μm de diámetro interno, con una corriente de 10 μA y un voltaje de 20 kV. La absorbancia se midió en la región ultravioleta a una longitud de onda de 214 nm (Bischoff, modelo Lambda 1010). La adquisición de datos fue mediante el software Empower 1154 versión 5 (Waters).

Como electrolito se utilizó una solución de Na_2SO_4 0.01M de la cual se tomaron 10 mL y 3 mL de OFM Anion-BT (Waters), aforando a 100 mL con agua desionizada. El electrolito se filtró con una membrana de 0.45 μm (Gómez y col, 1996).

Para el análisis de la muestra problema, se centrifugaron 10 mL de muestra a 12000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se filtró con una membrana de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm . El análisis de las muestras se realizó por duplicado y las curvas de calibración se realizaron al menos por triplicado. Un ejemplo de curva de nitrato y nitrito se muestra en la Fig 9.

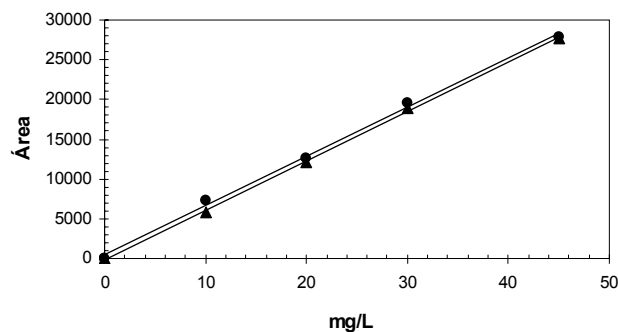


Figura 9. Ejemplo de una curva de calibración para la determinación de nitrato. $r^2:0.9977$, - línea de ajuste, valor experimental (●) y curva de calibración para la determinación de nitrito. $r^2:0.9972$, - línea de ajuste, ▲ valor experimental.

3.3.1.2 Cuantificación de los gases: N_2 , N_2O , CH_4 y CO_2 .

Los gases se midieron en un cromatógrafo de gases Varian 3350, con un detector de conductividad térmica. La adquisición de datos se realizó con un software Empower 1154 versión 5 (Waters). La fase móvil fue helio a un flujo de 16 ml/min. Se utilizó una columna de acero de 1.2 m de largo y 1/8'' de diámetro, empacada con Poropak Q de malla 80-100. Las condiciones de operación fueron: columna 35°C; inyector 100°C, detector 110°C; filamentos 135°C y un volumen de inyección de 0.1 mL de muestra.

Para la medición de los gases en continuo en el reactor UASB se basó en la ley de los gases ideales, ya que 1 mol de gas a 1 atm y 273°K ocupa 22.4L. El volumen estándar que ocupa 1 mol de gas bajo condiciones experimentales se calculó con la siguiente relación, considerando que la presión atmosférica de la ciudad de México es de 0.8 atm.

$$V_{\text{Nitrógeno}} = (T_{\text{st}} \cdot P_r \cdot F_g \cdot f) / (T_r \cdot P_{\text{st}}) \quad [=] \quad \text{L/d}$$

Donde:

$V_{\text{Nitrógeno}}$: Velocidad de producción de nitrógeno bajo condiciones estándar.

F_g : Flujo del gas medido por desplazamiento de solución salina en una columna (L/d).

T_{st} : Temperatura estándar (298.15°K)

P_r : Presión atmosférica a la que opera el reactor (0.8 atm).

f : fracción del nitrógeno contenido en el flujo de gas medido por cromatografía de gases.

T_r : Temperatura a la que opera el reactor (303.15 °K)

P_{st} : Presión estándar (1 atm)

Posteriormente se calculó la velocidad volumétrica de producción de nitrógeno atmosférico (mg N/Ld).

$$Q_{N_2} = (V_{\text{Nitrógeno}} \cdot P_{st} \cdot PM_{N_2}) / (R \cdot T_{st} \cdot V_r) \quad [=] \quad (\text{mg} \cdot \text{L})/\text{d}$$

Donde:

R: Constante de los gases ideales (0.082 L atm / mol °K)

V_r: Volumen de operación del reactor

PM_{N₂}: Peso molecular N₂ (mg/mol)

Para la cuantificación del N₂ en el cultivo en lote se construyó una curva estándar basada en la ecuación de los gases ideales: $n = PV/RT$, donde

T: temperatura

P: presión atmosférica

R: constante de los gases ideales

V: volumen del gas inyectado

n: número de moles, (w/PM), w: peso (g), PM: peso molecular (g/mol)

Se utilizó una serie de botellas de 60 mL que contenían 55 mL de medio mineral y un volumen de fase gaseosa conocida. Se emplearon diferentes concentraciones de N₂ (3, 17, 34, 85 y 119 ppm en el espacio de cabeza). Posteriormente se realizó la inyección en el cromatógrafo de gases en las mismas condiciones descritas anteriormente. Finalmente se construye una curva estándar donde el área es proporcional a la concentración de N₂ presente.

3.3.2 Compuestos carbonados

3.3.2.1 Cuantificación de carbono total y carbono inorgánico

Se empleó un analizador de carbono orgánico total modelo TOC-5000 de Shimadzu TM. La muestra para analizar el carbono total (CT) es acarreada por un flujo de aire extrapuro de 150 ml/min, a una cámara de combustión a 680°C donde es oxidada a CO₂ posteriormente llevado a un recipiente de reacción de carbono inorgánico. Finalmente es enfriado, secado, pasado por un depurador de halógenos y analizado mediante un detector de infrarrojo. El carbono inorgánico (CI) es detectado cuando pasa al recipiente de reacción de CI donde solamente el CI es oxidado a CO₂ y detectado por el analizador.

Para analizar la muestra problema se centrifugaron 10 mL a 12000 rpm, posteriormente se filtró el sobrenadante con una membrana de nylon con un tamaño de poro de 0.45 μm .

En la Figura 10 se muestra la curva de calibración para diferentes concentraciones de carbono total, preparados con una solución estándar de pftalato ácido de potasio de concentración a 1000 mg C/L (Cuervo-López y col, 1999).

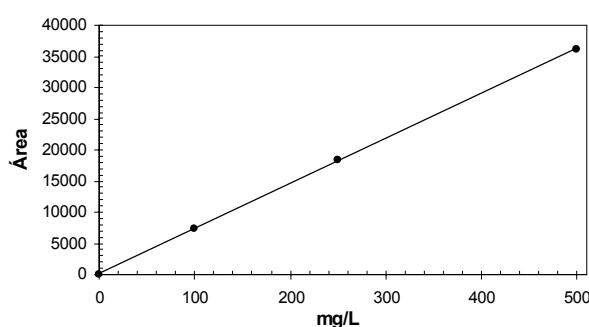


Figura 10. Ejemplo de una curva de calibración para la determinación de carbono total. $r^2:0.997$, - línea de ajuste, ● valor experimental.

En la Figura 11 se muestra la curva de calibración para diferentes concentraciones de carbono inorgánico, preparados con una solución estándar de bicarbonato de sodio y carbonato de sodio, equivalente a 1000 mg C/L.

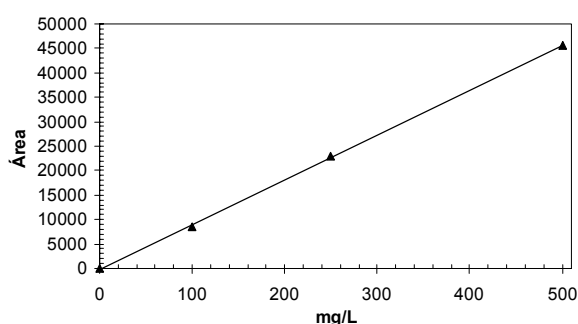


Figura 11. Curva de calibración para la determinación de carbono inorgánico. $r^2:0.996$, - línea de ajuste, ▲ valor experimental.

3.3.2.2 Cuantificación de acetato

Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian Star 3400, con detector de ionización de flama (FID). La columna es de acero inoxidable de 1.2 m de longitud y 1/8" de diámetro interno, empacada con Porapaq Q malla 80-100. Como gas acarreador

se utilizó nitrógeno molecular, la temperatura del detector fue de 270°C y del inyector 250°C.

Para analizar la muestra problema se filtraron 5 mL con una membrana de nylon con un tamaño de poro de 0.45 µm, de este filtrado se tomaron 950 µL y se colocaron en un tubo eppendorf añadiendo a la muestra 50 µL de HCl al 50%. Para corroborar la reproducibilidad del método, se emplearon diferentes estándares de acetato (30, 90, 150, 210 y 270 ppm) repitiéndose al menos tres veces la medición. Las soluciones fueron preparadas a partir de una solución patrón 5mM de acetato. Se construyó una gráfica del valor del área bajo la curva con respecto a la concentración C-acetato, encontrándose que la respuesta del método fue lineal (Figura 12). La medida tuvo una reproducibilidad mayor que 95%

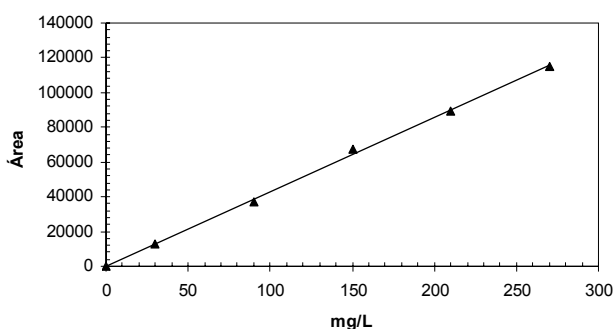


Figura 12. Curva de calibración para la determinación de acetato. $r^2:0.9987$, - línea de ajuste, ▲ valor experimental.

3.3.2.3 Cuantificación de tolueno

Se empleó un cromatógrafo de gases Varian Star 3400, con detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar de 30 m de longitud y 0.53 mm de diámetro interno. La fase estacionaria que se empleó fue carbowax/BTR (Quadrex, Woodbrige, CT). La temperatura de la columna, detector e inyector fue de 60, 235 y 250°C, respectivamente. Como gas acarreador se utilizó N₂ con un flujo de 4 mL/ min.

Para la medición de tolueno en la fase líquida, las muestras se filtraron con una membrana de nylon de 45 µm de tamaño de poro. Se inyectó 0.2 µL de muestra con una jeringa Hamilton. La medición de tolueno en la fase gas, se determinó tomando una muestra de gas en el espacio de cabeza.

En la Figura 13 se muestra una curva estándar con diferentes concentraciones de tolueno en la fase líquida. Se observó un comportamiento lineal hasta una concentración de 500 mg/L de tolueno.

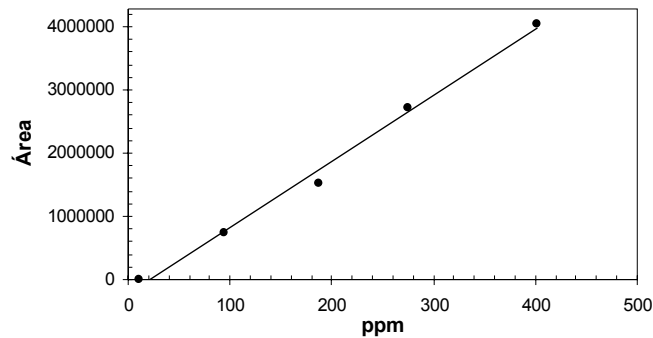


Figura 13. Curva de calibración para la determinación de tolueno. $r^2:0.9901$, - línea de ajuste, ● valor experimental.

3.3.3 Cuantificación de biomasa: sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Los SSV se determinaron por gravimetría, de acuerdo al método recomendado por Standard Methods (1995).

Los crisoles se pusieron a peso constante, posteriormente un volumen de 10 mL de muestra se depositó en el crisol y se evaporó el líquido en una parrilla a baja temperatura, antes de alcanzar la evaporación total. Los crisoles se transfirieron a una estufa a 105° C por una hora, y una vez transcurrido el tiempo se colocaron en un desecador por 15 min. De aquí se pesaron y se obtuvo el contenido de sólidos suspendidos totales. A continuación, la muestra se transfirió a una mufla a 550°C durante 30 min y se obtuvieron los sólidos suspendidos fijos.

La concentración de sólidos totales, se calculó de la siguiente forma:

$$\left[\frac{gSST}{L} \right] = \left[\frac{B - A}{V} \right]$$

Donde

A: peso del crisol (g)

B: peso del crisol + residuo (g)

V: volumen de muestra (L)

Los sólidos suspendidos fijos (SSF).

$$\left[\frac{gSSF}{L} \right] = \left[\frac{C - A}{V} \right]$$

Donde

A: peso del crisol (g)

C: peso del crisol + residuo (g)

V: volumen de muestra (L)

Y por diferencia se obtienen los sólidos suspendidos volátiles.

$$\left[\frac{gSSV}{L} \right] = SST - SSF$$

3.3.4 Sustancias exopoliméricas (SEP)

3.3.4.1 Extracción de las sustancias exopoliméricas

Para la extracción de las SEP se utilizó el método descrito por Martínez y col, 2003. Se tomaron 15 mL de muestra del licor mezclado del reactor (líquido y lodo) y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos, separando el sobrenadante del sedimento, el cual se filtró por medio de una membrana de celulosa regenerada de 0.45 µm de tamaño de poro. Al filtrado se le determinó proteína (Lowry y col, 1951) y carbohidratos (Dubois y col, 1956). Al sedimento se le agregó 15 mL de EDTA 0.1M, se agitó con ayuda de un vortex durante 10 minutos, se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante, se tomaron 2 mL para la determinación de carbohidratos. El sobrenadante restante, se colocó en bolsas de diálisis de 10 kDa (Spectra) de tamaño de corte para separar el EDTA y eliminar interferencias y poder cuantificar proteína. La diálisis se llevó a cabo con agua desionizada y en refrigeración durante tres días, recambiando el agua desionizada diariamente. Terminada la diálisis, se determina proteína (Martínez y col, 2003).

3.3.4.2 Cuantificación de carbohidratos

Se empleó el método colorimétrico propuesto por Dubois (1956). Se preparó una solución estándar de 100 mg de glucosa por litro, y de ésta se hicieron diluciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L. La muestra se trató de la misma forma que los estándares. Un mL de muestra se depositó en un tubo de ensaye y se le agregó 1 mL de solución de fenol al 5%. Posteriormente se agregaron 5 mL de una mezcla de ácido sulfúrico concentrado con sulfato de hidracina 0.5%, se dejó enfriar y se leyó a 490 nm. Las determinaciones se efectuaron por triplicado. Una de las curvas de calibración se observa en la Figura 14.

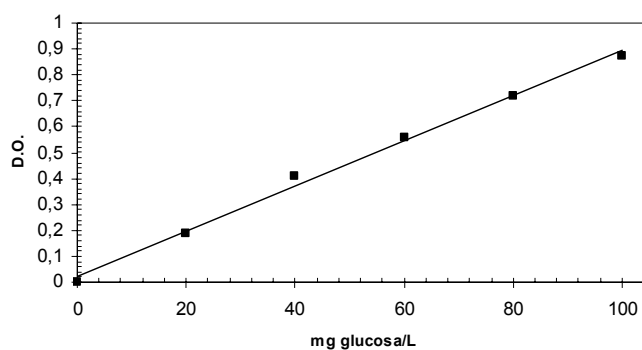


Figura 14. Curva de calibración para la cuantificación de carbohidratos. $r^2:0.9952$, - línea de ajuste, ■ valor experimental.

3.3.4.3 Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método colorimétrico de Lowry (1951). Como referencia se utilizó una curva de calibración de 0 a 300 mg de albúmina/L (Sigma).

Para el análisis de la muestra se tomó un mL de muestra de lodos, perfectamente homogeneizado, se le agregó 0.1 mL de NaOH 10 N, se calentó durante 30 minutos a baño María a 90°C. Posteriormente se agregaron 5 mL de una solución de Na₂CO₃ 0.19M en NaOH 0.1N. CuSO₄ al 1% y tartrato de sodio y potasio al 2%. Se dejó reposar durante 20 minutos en la oscuridad y, por último se le adicionó 1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. La muestra se leyó a 750 nm. Un ejemplo de una curva de calibración se muestra en la Figura 15.

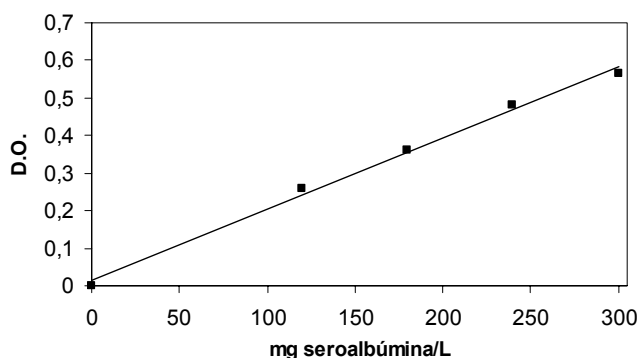


Figura 15. Curva de calibración para proteínas. $r^2:0.9963$, - línea de ajuste, ■ valor experimental.

La reproducibilidad de los métodos de medición se corrobora en la Tabla 4. Se realizaron 4 repeticiones de curvas independientes en cada método de análisis. Se muestra un resumen de los coeficientes de variación para la pendiente, la ordenada al origen y r^2 .

Tabla 4. Coeficientes de variación de los métodos de análisis

Compuesto	Método de análisis	Pendiente	Ordenada	r ²
		C.V %	Origen C.V %	C.V %
Nitrato	Electroforesis capilar	3.9	4.0	0.8
Nitrito	Electroforesis capilar	1.7	4.4	0.1
N ₂	Cromatografía de gases	4.2	4.6	3.1
CT	Analizador de Carbono	1.1	4.7	0.1
Cl	Analizador de Carbono	1.0	1.5	0.1
Acetato	Cromatografía de gases	3.3	4.7	0.1
Tolueno	Cromatografía de gases	3.7	4.4	4.8
Carbohidratos	Espectrofotometría	4.7	2.6	1.0
Proteínas	Espectrofotometría	3.8	4.2	0.5

3.3.5 Índice volumétrico del lodo (IVL)

Para medir el IVL se utilizó el método recomendado por AHPA (1995) con dos modificaciones al método reportado. En primer lugar se usó un cono Imhoff y, en segundo, se determinó el IVL_{0.1}, que se refiere al valor del IVL calculado a partir de una muestra de 100 mL en lugar del calculado a partir de una muestra de 1L (Cuervo-López, 2003). De esta forma una muestra del licor mezclado (100 mL) fue vertida en un cono Imhoff, después de 30 minutos se leyó el volumen que ocuparon los lodos.

Para calcular el IVL se utilizó la siguiente ecuación:

$$IVL_{0.1} \text{ (mL/g)} = VS_{30} / VM \text{ SST, donde:}$$

IVL_{0.1}: índice volumétrico de lodos medido en 0.1 L de muestra (mL/g)

VS₃₀: volumen de lodos sedimentado en 30 minutos (mL)

VM: volumen de muestra (L)

SST: sólidos suspendidos totales (g/L)

3.3.6 Velocidades de sedimentación

Se midieron las velocidades de sedimentación por el método recomendado por APHA (1995). Se tomaron 100 mL del licor mezclado del reactor y se colocaron en una probeta de 100 mL graduada en centímetros. Cada 10 segundos se midió la cama de lodo a través de la probeta, hasta que ya no hubiera un descenso.

Se construyó una gráfica de centímetros cúbicos contra el tiempo en el cual va descendiendo la cama de lodos. Y se calculó la pendiente en la parte exponencial de la curva.

$$V_s = \left[\frac{b}{a} \right] [0.6]$$

Donde:

V_s (m/h): velocidades de sedimentación

b : pendiente de la parte exponencial de la curva.

a : área de la probeta (área: $\pi \cdot r^2$) y

0.6 es un factor de conversión $\left[\frac{60 \text{ min/h}}{100 \text{ cm/m}} \right]$

3.4 REFERENCIAS

APHA. (1995), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19 th ed., American Public Health Association, Washington, DC.

Cuervo-López, F. M., Martínez, F., Gutiérrez-Rojas, M., Noyola R.A., and Gómez, J. (1999), Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Water Sci. Technol.* 40, 123-130.

Cuervo López F M. (2003). Estudio biológico-fisicoquímico de un lodo desnitrificante alimentado con diferentes fuentes de electrones. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.

Gómez, J., Méndez, R., and Lema, J. (1996). The effect of antibiotics on nitrification process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**, 869-876.

Lowry, O. H., Rosen Brough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Martínez, F. (2003). Sedimentabilidad de un lodo nitrificante en dos tipos de reactores y en presencia de material orgánica. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.



Capítulo 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fuente de lodo desnitrificante: Reactor UASB

En el reactor UASB la velocidad de producción de N_2 fue $134 \pm 4.460 \text{ mg } N_2/(L \cdot d)$ y después de 15 días de alimentación (Figura 16). El lodo (fuente de inóculo), en consecuencia alcanzó el régimen estacionario. En estas condiciones, la eficiencia de consumo de acetato (E_A) fue de $97 \pm 8\%$ y una eficiencia de consumo de nitrato (E_N) de $97 \pm 2\%$. Los valores de los rendimientos de formación de nitrógeno molecular y bicarbonato (Y_{N_2} y Y_{HCO_3}) fueron 0.95 ± 0.04 y 0.94 ± 0.02 , respectivamente. No fueron detectados intermediarios de la desnitrificación como NO_2^- y N_2O .

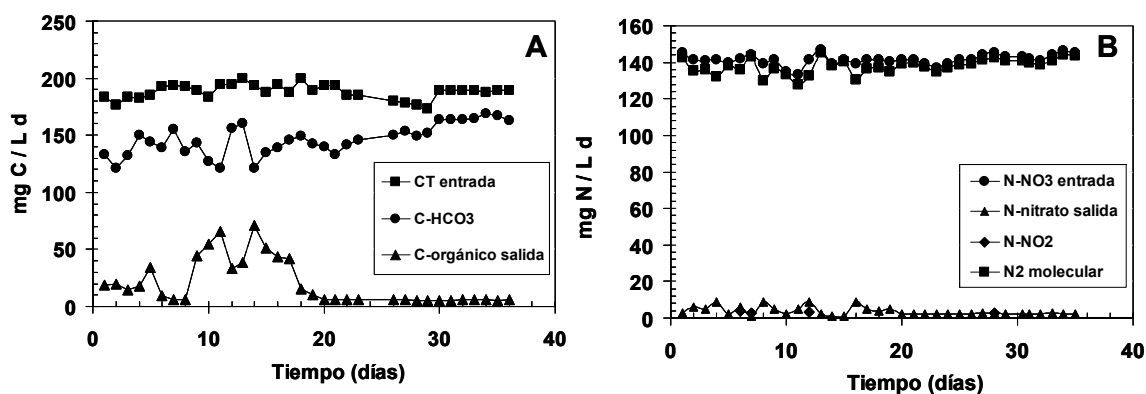


Figura 16. Perfil de las velocidades de carga y descarga de los compuestos carbonados (A) y nitrogenados (B) en el reactor continuo desnitrificante (UASB).

El lodo mineralizó el carbono de acetato mediante la desnitrificación como lo indican los valores altos de Y_{N_2} y Y_{HCO_3} en el proceso respiratorio. La concentración de biomasa inicial fue de $3.4 \pm 0.2 \text{ g SSV/L}$ y la final, después de 35 días, fue similar. Este comportamiento podría estar vinculado con la relación C/N la cual fue de 1.4, cercana a la estequiométrica (1.1), por lo que el consorcio estuvo limitado por la fuente de carbono para llevar a cabo la síntesis de biomasa. Este resultado, junto con los previamente descritos, evidenciaron, que el lodo utilizado como inóculo desnitrificante fue netamente desasimilativo. Estas observaciones coinciden con Cuervo-López y col. (1999) y Akunna y col. (1993), quienes reportaron un crecimiento no significativo y un alto rendimiento desnitrificante a relaciones C/N cercanas a las estequiométricas.

4.2 Ensayos abióticos

En el reactor SBR se observó que el $58 \pm 3\%$ de tolueno se mantuvo en la fase líquida en el reactor a lo largo del tiempo (2 d) y el resto en el espacio de cabeza del reactor SBR. Los ensayos de adsorción indican que cerca del 6% permaneció en el lodo, es decir, la adsorción fue despreciable y el resto se mantuvo en el espacio de cabeza ($38 \pm 4\%$). En consecuencia las pérdidas por adsorción no fueron significativas. Peña-Calva y col (2004) observaron que en pruebas de adsorción de benceno, tolueno y xileno (BTX), el 1.2% se queda adsorbido en el lodo, por lo que de igual forma fué despreciable la concentración de BTX contenidos en el lodo.

4.3 Análisis del proceso respiratorio en el SBR

4.3.1 SBR con acetato inoculado con 2 g SSV/l

Las velocidades específicas de consumo (q_s C-acetato y q_s N-NO₃), así como las velocidades de producción (q_p N₂ y q_p HCO₃⁻) fueron aumentando a través de los ciclos (Figura 16). Durante los primeros 12 ciclos no hubo un cambio significativo entre las velocidades, tanto de consumo como de producción, pero presentaron un aumento significativo ($\alpha = 0.05$) hasta el ciclo 24. A partir de este ciclo y hasta el 180, las velocidades ya no difirieron significativamente ($\alpha = 0.05$).

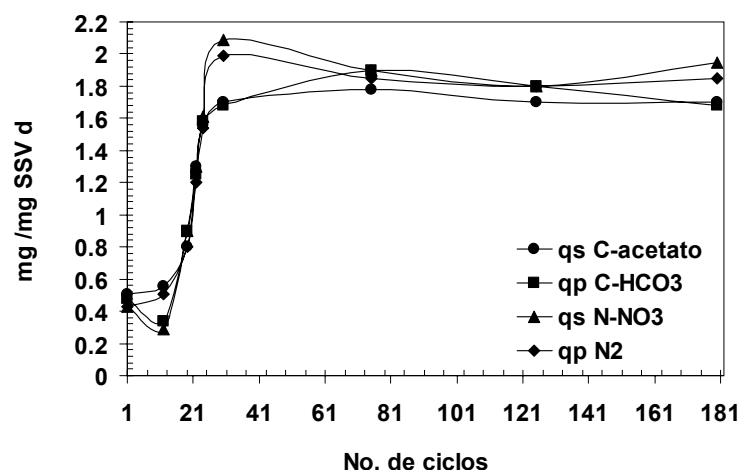


Figura 17. Perfil de velocidades específicas de consumo ((▲) q_s de N-NO₃, (●) q_s de C-acetato) en el SBR bajo condiciones desnitrificantes y de producción ((■) q_p de C-HCO₃ y (◆) q_p de N₂). Las concentraciones iniciales fueron 70 mg C-acetato y 50 mg N-NO₃.

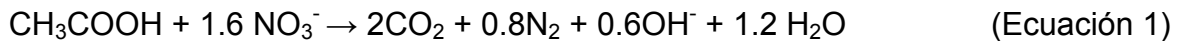
La mayor velocidad específica de consumo de acetato obtenida fue de 2.1 mg C-acetato/ mg SSV•d, siendo 6 veces mayor a las encontradas en estudios en cultivo en lote realizados por Peña-Calva y col. (2004), en la cual experimentan una concentración cercana de C-acetato (90mg C-acetato/l). Por otro lado, la mayor velocidad específica de consumo de nitrato, obtenida a partir del ciclo 30 fue de 1.9 mgN-NO₃⁻/ mg SSV•d. Comparando con la literatura, Vives. (2005) experimentó una concentración inicial de 74.34 mgN-NO₃⁻/L y 60 mg-C/L (mezcla de acetato, propionato y etanol), con una concentración de 2.2 g SSV/L en un sistema SBR y obtuvieron una velocidad específica de consumo de nitrato de 0.214 mgN-NO₃⁻/ mg SSV•d. Comparando la anterior velocidad se encontró que es 9 veces mayor la velocidad obtenida en este trabajo.

La duración inicial del ciclo fue de 8 horas, y se disminuyó a 2 horas a partir del ciclo 15 debido a que el consumo de acetato y nitrato se redujo a 0.8 horas, debido a que en el SBR los procesos van adaptándose hasta llegar a un estado estacionario, donde las velocidades específicas de consumo y producción no sufren un cambio significativo. Buitrón y col (2004) en un SBR, utilizando lodos activados, observaron que el tiempo de reacción, una vez adaptado el cultivo, se redujo de 40 h a 50 min. De igual forma Martins y col. (2003) observaron que en un sistema SBR las velocidades específicas de consumo de acetato, aumentaron 2 veces con respecto a su valor inicial.

Las eficiencias de eliminación de acetato y nitrato se mantuvieron alrededor del 100%. En los rendimientos de Y_{HCO_3} y Y_{N_2} se obtuvieron valores cercanos a 1. El proceso respiratorio se mantuvo netamente desasimilativo, ya que la formación de biomasa no presentó un cambio significativo. Vives. (2005) con una concentración inicial de 74.34 mgN-NO₃⁻/L experimentaron una eficiencia de eliminación de nitrato de 81% en un SBR, aunque no mencionan la formación de productos de la desnitrificación.

Los resultados encontrados muestran la importancia de establecer un medio químicamente balanceado, ya que ayudó a mantener una adecuada actividad del consorcio desnitrificante para establecer un proceso netamente respiratorio. El manejo de la relación C/N de 1.4 cercana a la estequiométrica (Ecuación 1),

orientó el proceso respiratorio hacia una desasimilación, sin la acumulación de intermediarios nitrogenados. Oh y Silversten (1999), en un SBR, empleando acetato como fuente de electrones en un proceso desnitrificante, a diferentes relaciones C:N, encontraron que a una relación C:N de 1:1 hubo acumulación de nitrito (30%), mientras que a relaciones C:N de 2:1 y 3:1 no observaron este comportamiento.



4.3.2 SBR con tolueno con 2 g SSV/L.

Evaluando el proceso respiratorio se encontró que la eficiencia de eliminación de tolueno se mantuvo alrededor del $62.8 \pm 2.6\%$, y la de nitrato fue de $97.1 \pm 3\%$. El balance de materiales se presenta en la Tabla 5.

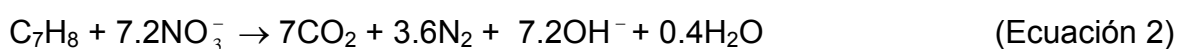
Tabla 5. Balance de materiales en el proceso desnitrificante en presencia de acetato y tolueno como donadores de electrones

Fuente de energía	C-Entrada = C-Salida (mg/L)			N-Entrada = N-Salida (mg/L)		
	C-Orgánico	= C-Inorgánico	+ C-Orgánico	N-NO ₃ ⁻	= N-NO ₃ ⁻	+ N ₂
Acetato	72 ± 2.1	68 ± 4.4	3.7 ± 0.8	50 ± 3.7	3,2 ± 0.3	44.1 ± 2.6
Tolueno	69.5 ± 1.5	45 ± 3	24 ± 2	51.5 ± 3	1.5 ± 0.5	49 ± 3.1

Los valores de Y_{N_2} durante los 20 ciclos ensayados se acercaron a 1. Con respecto al Y_{HCO_3} se obtuvieron rendimientos de 0.97 ± 0.009 . El tolueno no tuvo efecto en las eficiencias de consumo, ni en los rendimientos (Y_{N_2} y Y_{HCO_3}). No se presentaron intermediarios de la desnitrificación durante el estudio cinético, lo que coincide con los rendimientos cercanos a 1. Por lo anterior, puede decirse que el tolueno a esta concentración no tuvo efecto sobre el metabolismo del proceso respiratorio.

La C/N empleada en este trabajo fue de 1.4, y la relación estequiométrica para el tolueno es de 0.83 (ecuación 2). Aunque la relación C/N trabajada fue mayor a la estequiométrica, la conducta del proceso respiratorio desnitrificante fue desasimilativa, ya que la formación de biomasa no presentó un cambio significativo. Una tendencia desasimilativa parecida encontró Altenschmidt y Fuchs (1991), en estudios en lote, empleando la cepa desnitrificante

Pseudomonas sp. en los cuales cerca del 77% del tolueno consumido fue oxidado a CO₂ y el 85% de nitrógeno de nitrato se redujo a nitrógeno molecular. En contraste, Evans y col. (1992) obtuvieron una oxidación de tolueno del 51%, del cual se asimiló cerca del 29% y el 22% corresponde a la formación de intermediarios, como ácido bencilsuccínico y ácido bencilfumárico en la oxidación anaerobia del tolueno. También Evans y col. (1991) mencionan que una concentración de 28 mg tolueno/L fue consumida en 7 días, por un cultivo desnitrificante, el cual sólo el 57% fue dirigido a la formación de CO₂ y el resto fue asimilado.



El estudio de la eliminación de hidrocarburos aromáticos en sistemas semicontinuos es escasa. Al respecto Ma y Love. (1992) en un SBR de 2 L, eliminaron una concentración inicial de 5 mg tolueno/L en ciclos de 24 horas, obteniendo un consumo del 100% de tolueno (en 10 horas) y también del nitrato, sin embargo no mencionan si el tolueno fue mineralizado o bien si hubo formación de nitrógeno molecular (N₂).

En el presente trabajo a través de los ciclos, las velocidades específicas de consumo (q_s C-tolueno y q_s N-NO₃), así como las de producción (q_p N₂ y q_p HCO₃⁻) fueron aumentando. Entre los primeros 20 ciclos se observó un cambio significativo (α = 0.05) (Figura 17).

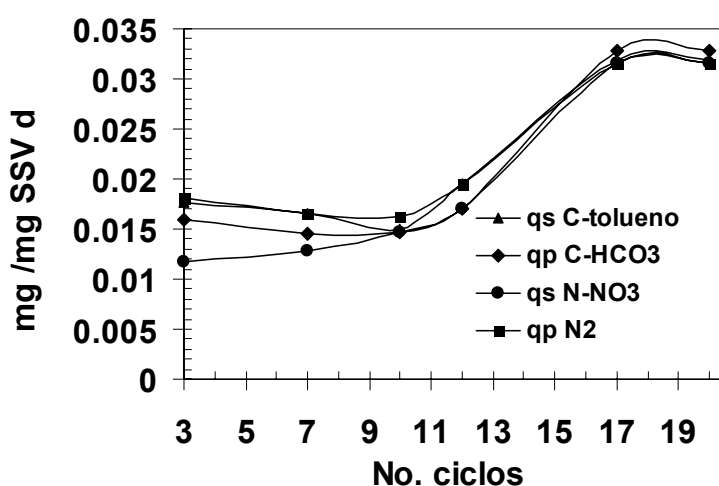


Figura 18. Perfil de las velocidades específicas de consumo, (▲) q_s de C-tolueno, (●) q_s de N-NO₃, (■) y de producción q_p de N₂ y (◆) q_p de C-HCO₃ en el reactor inoculado con 2 g SSV/l.

La máxima velocidad alcanzada en el SBR fue 0.032 ± 0.006 mg C-tolueno/mg SSV^od. Esta velocidad es 22% mayor que la observada en cultivo en lote por Peña-Calva y col. (2004) con una concentración inicial de 70 mg C-tolueno/L, igual a la ensayada en este trabajo. Debido al aumento en las velocidades específicas, a partir del ciclo 10, la duración de los ciclos disminuyó de 72 horas a 41 horas. El comportamiento observado coincide con Moreno-Andrade y Buitrón. (2004) quienes mencionan que las velocidades específicas durante la fase de adaptación, experimentan un aumento en el sistema SBR. La literatura menciona diversas propuestas que pueden explicar el aumento en las velocidades específicas. Una de ellas menciona que puede ser debido al cambio y selección de las poblaciones presentes en el consorcio microbiano; otra apunta sobre el material enzimático, que se adapta debido a los mecanismos de reparación propios de los microorganismos (Ramos y col, 1997; Ramos y col, 2002). Como ya se ha señalado en otras ocasiones, el tolueno es un solvente tóxico, que daña de forma drástica la estructura y función de la membrana (Sikkema y col, 1995). También se ha observado un efecto sobre la pérdida de fuerza proto motriz y daños en macromoléculas como RNA, entre otras. Por tal motivo se ha sugerido, que los microorganismos pueden desarrollar diversos mecanismos de tolerancia, como *Pseudomonas putida* S2, que ha desarrollado un sistema de bombeo de solventes, que le permite mantener al tolueno y otros solventes orgánicos fuera del interior celular (Iken y de Bont, 1996). Otro mecanismo de defensa fue observado por Kobayashi y col. (2000) en *Pseudomonas putida* IH 2000, donde se encontró que la membrana externa de esta cepa secreta vesículas, compuesta principalmente de fosfolípidos y lipopolisacáridos, donde se adhiere el tolueno. De esta manera pudiera ser que una vez que se activan los mecanismos de respuesta, se pueden adaptar los microorganismos y el material enzimático, y de esta forma aumentar las velocidades específicas de consumo de tolueno.

Con respecto a la velocidad volumétrica, Ma y Love. (2001) obtuvieron una velocidad volumétrica de eliminación de tolueno de 20 mg tolueno/Ld en un SBR de 2 litros, con ciclos de 24 horas y una concentración de 5 mg tolueno/L. Si se

compara esta velocidad de eliminación de tolueno se observa que es 60% mayor en el presente trabajo (34 mg tolueno/Ld).

En la alimentación con tolueno al igual que con acetato, podemos observar que a partir del ciclo 12 las velocidades específicas de consumo y de producción empezaron a experimentar un aumento. A partir del ciclo 24 con acetato las velocidades comenzaron a presentar un comportamiento constante, pero con tolueno fue a partir del ciclo 17. No obstante, las velocidades de consumo y de formación de productos fueron 97% menores, que las velocidades con acetato. Estas diferencias en velocidades también fueron observadas por Peña-Calva y col, (2004). Cabe mencionar que uno de los factores que influye tanto en el consumo como en las velocidades de eliminación de los compuestos carbonados es su naturaleza química. En este caso el acetato pudo ser más fácil de oxidar que el tolueno, debido probablemente a la presencia del anillo aromático lo cual hace que el tolueno sea menos polar y de esta forma pueda disminuir la disponibilidad en el medio, el efecto tóxico sobre los microorganismos, así también como la forma bioquímica para mineralizarlo.

Los estudios mostraron que el consorcio desnitrificante pudo consumir sustratos orgánicos que van desde fácilmente oxidables, como el acetato, hasta compuestos como el tolueno. Sin embargo, recientes estudios han puesto interés en observar el efecto que ejerce la fuente de energía sobre las enzimas desnitrificantes, ya que otro factor frecuentemente mencionado en la literatura es el efecto que ejerce la fuente de electrones sobre las enzimas desnitrificantes. Diversos estudios han mostrado cierta competencia sobre las enzimas nitrato y nitrito reductasas por los electrones generados por la fuente de energía. Una explicación que se sugiere es la presencia de oxígeno en el medio, cabe recordar que el oxígeno es un inhibidor de las enzimas nitrato y nitrito reductasas. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden evidenciar que no hubo competencia de las enzimas nitrito y nitrato reductasas debido a que no se presentaron intermediarios. También se encontró que el producto principal del proceso respiratorio fue nitrógeno molecular, indicando una correcta actividad de las enzimas desnitrificantes.

4.3.3 Efecto de la concentración de SSV sobre el proceso respiratorio con tolueno.

De acuerdo a las condiciones presentes en sistemas SBR, es posible observar un aumento de la concentración de los SSV, lo que puede afectar la sedimentabilidad del lodo y la calidad del efluente (Dapena-Mora y col, 2004). Para observar el efecto de la concentración de SSV se inocularon dos reactores SBR, uno con 4.13 y otro con 7.74 g SSV/L, a los que se denominaron SSV-4 y SSV-8. Se encontró que la eficiencia de eliminación de tolueno se mantuvo alrededor del 64% en ambos reactores y para el nitrato cercana al 100%. En la Tabla 6 se muestran las eficiencias de consumo y rendimientos de formación de productos en la fase alimentada con tolueno a diferentes concentraciones de SSV. En cualquier caso, las diferencias no fueron significativas.

Tabla 6. Eficiencias de consumo de sustrato (E) y rendimientos de formación de productos ($Y_{P/S}$) en el proceso desnitrificante usando diferentes concentraciones de SSV en los 15 ciclos evaluados.

g SSV/l	E (%) ^a		$Y_{P/S}$ ^b	
	C	N	N ₂	HCO ₃
2	62.8 ± 2.6	97.1 ± 3.0	0.98 ± 0.09	0.97 ± 0.08
4.13	69.3 ± 2.2	92.3 ± 2.6	0.99 ± 0.08	0.96 ± 0.03
7.74	67.4 ± 3.1	93.3 ± 2.9	0.96 ± 0.02	0.97 ± 0.03

^aE: (mg sustrato_{consumido}/mg sustrato_{alimentado}) x 100.

^b $Y_{P/S}$: (mg producto/mg sustrato_{consumido}).

El proceso respiratorio fue netamente desasimilativo. Los cambios en la concentración de biomasa no fueron importantes sobre el perfil respiratorio. Con respecto al tiempo de reacción del ciclo, este sufrió una reducción de 72 a 41 horas en el SSV-2, SSV-4 y SSV-8.

A través de los ciclos se realizaron cinéticas de consumo (NO₃⁻ y acetato) y producción (N₂ y HCO₃⁻) (Figura 18). En ambos reactores se observó que entre los ciclos 1 y 4 no existe un cambio significativo entre las velocidades específicas tanto de consumo como de producción, pero sufrieron un aumento significativo ($\alpha = 0.05$) del ciclo 5 hasta el 11, después, las velocidades permanecieron constantes.

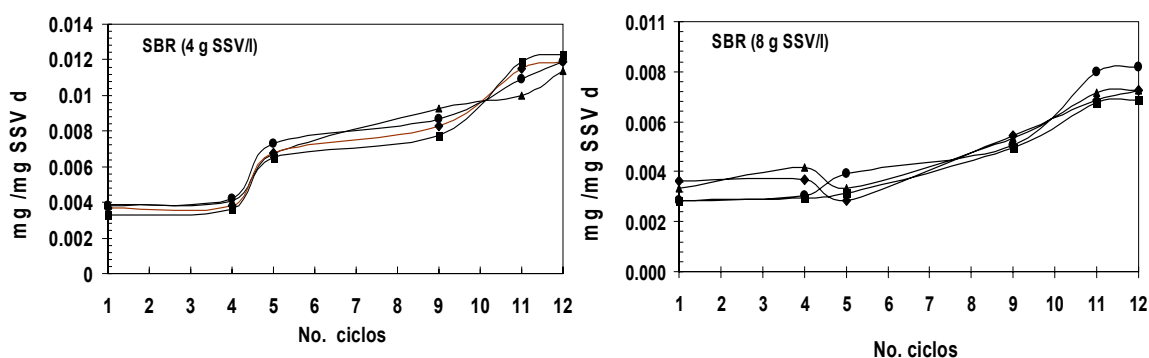


Figura 19. Perfil de las velocidades específicas de consumo, (\blacktriangle) q_s de C-tolueno, (\bullet) q_p de $N-NO_3$, (\blacksquare) y de producción, q_p de N_2 y (\blacklozenge) q_p de C- HCO_3 en el SBR inoculado con 4 gSSV/l y 8 gSSV/l. Las concentraciones iniciales fueron 70 mg C-tolueno y 50 mg $N-NO_3$ en los tres casos.

Con respecto a las velocidades volumétricas de consumo y producción, éstas fueron 74% mayores en el SSV-4, en comparación con las del reactor inoculado con 2 g SSV/L (Tabla 7). En el SSV-8 se presentaron problemas de operación, por lo que los resultados fueron muy irregulares.

Tabla 7. Velocidades volumétricas de consumo de tolueno y nitrato.

g SSV/L	(mg sustrato/[L \cdot h])	
	Tolueno	Nitrato
2	1.39 ± 0.09	1.11 ± 0.13
4	1.90 ± 0.07	2.06 ± 0.09
8	1.75 ± 0.06	1.97 ± 0.08

En general, para ambas concentraciones de SSV, se esperaba este comportamiento, ya que cuando la concentración de SSV aumenta, las velocidades volumétricas también pueden experimentar un incremento. En este tipo de sistemas parece recomendable no utilizar una concentración mayor que 6 g SSV/L, ya que puede repercutir sobre la sedimentabilidad del lodo y operación del sistema. En el SSV-8 los problemas de operación estuvieron presentes desde el inicio y el cálculo de las velocidades fue erróneo, por lo que coinciden estos resultados con la literatura, al sugerir un inóculo menor que 6 g SSV/L (EPA. 1999), aunque no se mencionan las causas que originan dichos problemas de operación.

4.4 Evaluación de la sedimentabilidad del lodo desnitrificante en el SBR

Cuando el lodo se alimentó con acetato siempre se obtuvo una buena sedimentabilidad, razón por la cual se utilizó como sistema de referencia para comparar el efecto del tolueno sobre la sedimentabilidad del lodo.

Durante la fase experimental con el SBR se estudiaron tres variables de respuesta: a) el índice volumétrico del lodo (IVL), b) las velocidades de sedimentación (V_s) y c) el comportamiento de los exopolímeros (proteína exopolimérica, PE y carbohidratos exopoliméricos, CE).

4.4.1 Ensayos con acetato y tolueno

4.4.1.1 Comportamiento del IVL

El IVL ha sido empleado para caracterizar las propiedades sedimentables del lodo (Jin y col, 2003). La literatura menciona que cuando el IVL se encuentra entre 80-100 mL/g se tienen adecuadas características sedimentables (Dangcong y col. 1999). En el presente trabajo se encontraron valores de IVL menores que 60 mL/g, con acetato (58 ± 1 mL/g) y con tolueno (40 ± 10 mL/g), aunque con tolueno en los primeros tres ciclos el IVL aumentó de 30 hasta 85.17 mL/g, después disminuyó a 16 mL/g en el ciclo 12. A partir de este ciclo y hasta el 30 se mantuvo en 49 ± 5 mL/g. Debido a lo anterior, se podría decir que el lodo presentó una adecuada sedimentación, y que en este caso, el IVL fue una buena herramienta para poder predecir la sedimentabilidad del lodo. Buitrón y col. (2001) mencionan que durante la fase de adaptación en un proceso respiratorio aireado, el IVL disminuyó de 500 a 200 mL/g en un sistema SBR donde el tóxico a eliminar fue el 4-clorofenol, presentando una buena sedimentación.

Se ha sugerido en la literatura, que el tipo de fuente de electrones juega un papel importante en la sedimentabilidad del lodo, y que utilizando acetato hay menos probabilidad de que el lodo presente problemas de sedimentación (Cuervo-López y col, 1999). Al respecto, Martins y col (2003) mencionan que utilizando acetato a una concentración de 525 mg/L, la sedimentabilidad del lodo no se vio afectada.

4.4.1.2 Comportamiento de las PE y CE

Comparando las concentraciones de las sustancias exopoliméricas (SEP), la PE del lodo fue 1.75 veces mayor con tolueno que con acetato (26.53 ± 10.27 mg PE/L). En cuanto a los CE, la concentración con tolueno fue 3.4 veces mayor que con acetato (6.33 ± 2 mg CE/L). Con lo anterior, es posible decir que el tolueno tuvo un efecto sobre la PE y CE al aumentar de manera considerable la concentración de exopolímeros. La concentración de PE siempre fue mayor que los CE. La literatura evidencia una mayor concentración de PE (46-52%) en lodos nitrificantes (Frølund y col, 1996), lodos desnitrificantes (Choi y col, 2001) y metanogénicos (Puñal y Chamy, 2003). En contraste, también se ha sugerido que la concentración de CE puede ser mayor (16 al 94%) que las PE (2-15%) en condiciones aerobias utilizando glucosa y nitrato como sustratos (Liao y col, 2001; Hoa y col 2003). Se ha sugerido que el aumento en la producción de SEP puede ser inducida por condiciones extremas en el cultivo, las cuales pueden estimular a los microorganismos para sintetizar una mayor concentración de SEP (Nichols y col, 2004; Qin y col, 2004). Se han propuesto diversos factores que puedan promover estas condiciones, entre las que podemos mencionar, temperatura del cultivo, pH, tipo de sustrato (Liu y col, 2004). Evidencias experimentales bajo condiciones aerobias proponen que éstas condiciones extremas parecen estar vinculadas a las condiciones operacionales, en términos de cambios de sustrato que estimulan a los microorganismos para producir una mayor concentración de SEP (Tay y col, 2001). Con base en lo anterior, el cambio de fuente de electrones (acetato a tolueno) pudo ocasionar cambios en la concentración de exopolímeros. La variación en la conducta de las SEP no es la misma en PE y CE, ya que en las PE (79%) la variación fue mayor, en comparación con los CE (55%). Al respecto Martínez. (2003) observaron un comportamiento similar, donde la variación en la concentración de PE es mayor, comparada con los CE. Las PE presentaron un comportamiento de onda (Fig 19), una conducta parecida fue observada por Martínez, (2003) en lodos nitrificantes y en lodos desnitrificantes (Cuervo-López y col. 2003). Aún ahora no está bien entendido este comportamiento. Una posible explicación podría ser, que el recambio de las PE es más rápido que el de los CE en la matriz de las SEP (Flemming y Wingender, 2001).

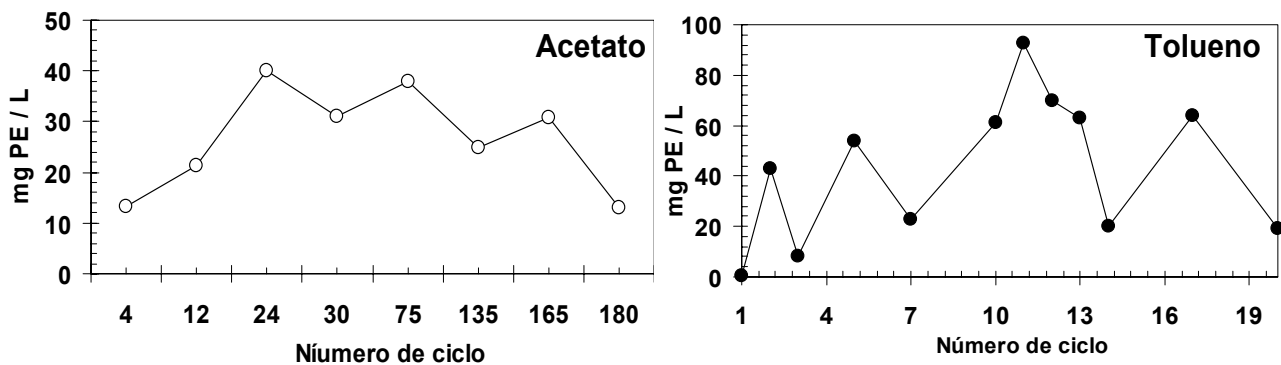


Figura 20. Perfil de la PE en presencia de acetato (●) y tolueno (o) en el SBR.

4.4.1.3 Relación PE/CE

La relación PE/CE, para acetato se mantuvo entre 2.7 y 5.7, mientras que para tolueno se presentó en promedio de 2.28 ± 1.17 . Morgan y col. (1990) evidenciaron que un intervalo característico de un lodo anaerobio va entre 3 y 5, mientras que Goodwin y Forster (1985) mencionan una relación PE/CE entre 0.2 y 5, también en lodos anaerobios. Los valores obtenidos en este trabajo corroboran las relaciones obtenidas por el lodo desnitrificante de acuerdo a lo mencionado por la literatura para un lodo anaerobio. En cuanto a la relación entre PE/CE y la sedimentabilidad, hay evidencias que mencionan que a relaciones mayores que 2 se pueden presentar problemas de sedimentación en un proceso desnitrificante (Cuervo-López y col, 1999). Como se puede observar las relaciones PE/CE son mayores que 2 en ambos casos (acetato y tolueno) pero cabe recordar que en la PE/CE también influyen las concentraciones de SEP, y estas concentraciones no fueron lo suficientemente altas como para causar falta de sedimentabilidad, como lo ha sugerido Cuervo-López y col (1999), donde mencionan que a concentraciones mayores que 100 mg PE/L se puede presentar la falta de sedimentabilidad del lodo.

4.4.1.4 Relación entre las variables de respuesta

Se realizó un análisis estadístico de correlación entre las PE, CE, IVL y la relación PE/CE. En primera instancia se observó que las PE se relacionan mejor con el IVL, aunque la correlación que existe es baja en la alimentación con

acetato (0.41), al igual que en la alimentación con tolueno (0.087), que difiere de lo encontrado por Martínez (2003) y Jin y col (2003). Al respecto, Bura y col (1998) reportan correlaciones mayores que 0.7 con el IVL.

4.4.2 Efecto de la concentración de los SSV sobre la sedimentabilidad

En el reactor inoculado con 4 g SSV/L se obtuvo una buena sedimentabilidad del lodo, mientras que en el SBR inoculado con 8 g SSV/L la falta de sedimentación se hizo evidente desde el inicio y durante los 20 ciclos ensayados. Esto indica que el incremento de la concentración de SSV a 8 g SSV/L originó la pérdida de sedimentabilidad del lodo.

4.4.2.1 IVL y Vs

También se ha sugerido que el IVL es una variable de respuesta confiable para predecir las propiedades sedimentables del lodo, pero no necesariamente significa que cuando aumenta el IVL por encima de 100 mL/g, las propiedades sedimentables del lodo sean pobres, o bien, que cuando sean menores que 100 mL/g la sedimentabilidad sea buena (Martins y col, 2003). Debido a lo anterior es importante distinguir que en ciertos sistemas puede ser una herramienta confiable y útil, pero en algunos no. En este caso el IVL presentó valores de 14 ± 3 y 13 ± 8 mL/g para el SSV-4 y el SSV-8 respectivamente. Con estos valores se podría pensar que la sedimentabilidad fue buena. No obstante, en el SSV-8 siempre se presentó la falta de sedimentación del lodo, ya que cuando el reactor estaba en la etapa de sedimentación, físicamente se observaba una sola fase, es decir, no se distinguía la separación entre el lodo y el influente a drenar (Figura 20). Cuando en el SBR la falta de sedimentación es evidente y se usan tiempos cortos de sedimentación, se puede promover el lavado del lodo (McSwain y col. 2005). Debido a lo anterior y al observar la nula sedimentabilidad y lavado del lodo, se aumentó el tiempo de sedimentación en el reactor inoculado con 8 g SSV/L de 0.5 h a 1 h. Aún así, no hubo sedimentación del lodo.

El IVL, en este caso, no fue una buena variable de respuesta para predecir el comportamiento del lodo. Los valores de IVL obtenidos se pueden atribuir, al efecto desnaturalizante del tolueno sobre las proteínas insolubles presentes en la

membrana de los microorganismos haciendo que la sedimentación no sea la adecuada.

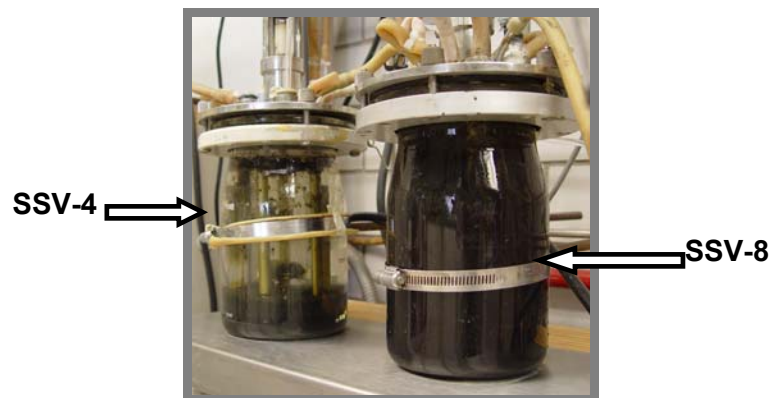


Figura 21. Reactor SBR inoculado con 4 gSSV/l y SBR inoculado con 8 gSSV/l.

Otra variable que nos ayuda a predecir el comportamiento del lodo, es la velocidad de sedimentación del lodo. Al respecto, en el SSV-4 y en el SSV-8 se observó, que al transcurrir los ciclos las V_s aumentaron, puntualmente a partir del ciclo 4. Las velocidades de sedimentación fueron 51 y 85% menores al reactor inoculado con 2 g SSV/l (6.4 ± 2.3 m/h) para el SSV-4 y SSV-8 respectivamente. En el SSV-8 fueron menores que 2 m/h (0.9 ± 0.3 m/h), por lo que se podría decir que la sedimentación del lodo fue nula. Moreno-Andrade y Buitrón (2004), mencionan que en un proceso aerobio eliminando 4-clorofenol obtienen velocidades de sedimentación de 6 m/h, sugiriendo una buena sedimentación. En este caso la V_s fue una herramienta útil, para pronosticar el comportamiento del lodo.

4.4.2.2 Comportamiento de las PE y CE

En la Figura 21 se muestran los perfiles de las PE ensayadas a las diferentes concentraciones de SSV, con respecto al número de ciclos. Se cuantificó una concentración media de 80.20 ± 26.32 y 95 ± 42.97 mg PE/L para el SSV-4 y SSV-8, respectivamente. La variación fue en promedio casi del 39% para ambos. Esta variación es mayor que la comparada con los CE, ya que la concentración promedio fue de 40.41 ± 11.3 y 50.32 ± 5.12 mg CE/L para los SBR inoculados con 4 y 8 g SSV/l respectivamente, con una variación promedio para ambos del 19%.

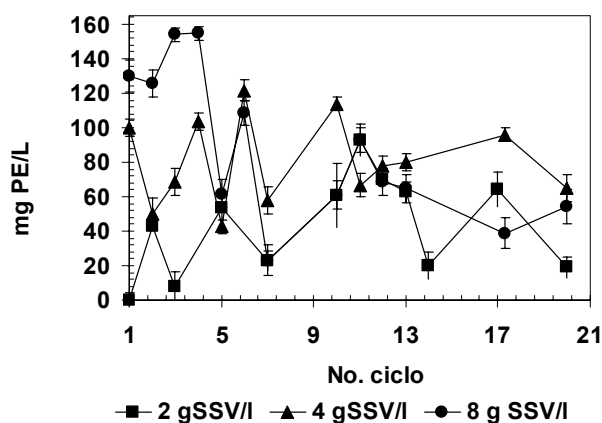


Figura 22. Comportamiento de las proteínas exopoliméricas en los SBR con diferentes concentraciones de SSV.

Comparando estas concentraciones de SEP con respecto al SBR inoculado con 2 g SSV/l podemos observar que la concentración de PE es alrededor de 1.9 y 1.6 veces mayor en el SBR-4 y SBR-8, respectivamente. En cuanto a los CE, la concentración es 1.9 y 2.3 veces mayor (Figura 22) en el SSV-4 y SSV-8 con respecto al SSV-2. Se ha sugerido que en consorcios microbianos se puede regular la producción de SEP, de acuerdo a los cambios en las condiciones presentes en el cultivo (Nichols y col, 2004). En este trabajo las alteraciones en las condiciones ambientales en el SBR, como lo fue el incremento en la concentración de biomasa, tuvo un efecto sobre la concentración de SEP. También se observó que la concentración de PE aumentaba conforme iba aumentando la concentración de SSV y este aumento en la concentración de PE estuvo asociado con la pérdida de sedimentabilidad del lodo.

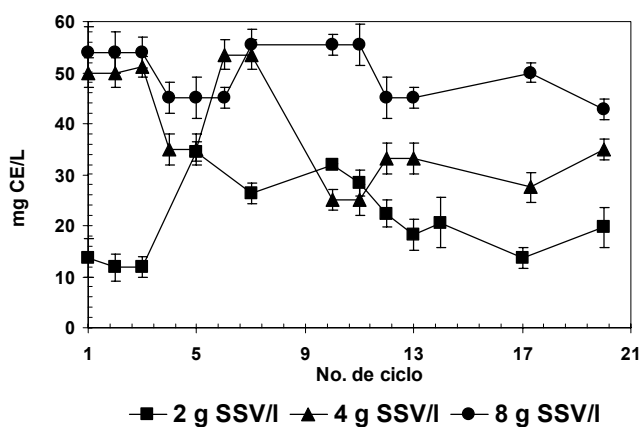


Figura 23. Comportamiento de los carbohidratos exopoliméricos en los SBR alimentados con diferentes concentraciones de SSV.

4.4.2.3 Relación PE/CE

Con respecto a la relación PE/CE se observó que éstas se mantuvieron entre 2.11 ± 1.16 , 2.49 ± 1.08 y 1.60 ± 0.61 para el SBR inoculado con 2, 4 y 8 g SSV/L respectivamente. La concentración de exopolímeros cuantificados en el reactor inoculado con 8 g SSV/L fue mayor que 100 mg PE/L (95 ± 42.97 mg PE/L) y esto influye en el valor de la relación PE/CE (1.60 ± 0.61), relación que nos puede predecir que no hay problemas de falta de sedimentabilidad. Sin embargo, la concentración fue mayor que 100 mgPE/L, y la sedimentabilidad se vio seriamente afectada, lo cual coincide con Cuervo-López y col. (1999) quienes encontraron que a concentraciones mayores que 100 mg PE/L se puede presentar la falta de sedimentación del lodo en un proceso desnitrificante.

4.4.2.4 Relación entre las variables de respuesta

Se determinó el coeficiente de correlación entre el comportamiento de las proteínas, carbohidratos, SSV, IVL y V_s utilizando tolueno como fuente de electrones. Se pudo constatar, en primera instancia, que entre las PE y CE, las PE tienen una mayor correlación con el IVL y las V_s , ya que las PE y el IVL presentaron un coeficiente de correlación de 0.773, siendo éste el valor más alto en comparación con los CE (0.544) en el reactor inoculado con 4 g SSV/L. Este resultado coincide con Jin y col. (2003) quienes observaron una mayor correlación entre las PE con el IVL y la V_s . En el SSV-8, las correlaciones que presentaron las PE tanto con el IVL y la V_s eran mínimas, por lo que se puede sugerir que para este caso, el comportamiento de la PE no se relaciona ni con el IVL ni con las V_s .

4.5 REFERENCIAS

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. *Wat. Res.* **27**: 1303-1312.

Altenschmidt, U. y Fuchs, G. (1991). Anaerobic degradation of toluene in denitrifying *Pseudomonas* sp.: indication for toluene methylhydroxylation and benzoyl-CoA as central aromatic intermediate. *Arch. Microbiol.* **156**: 152-158.

Buitrón, G., Soto, G. y Moreno, J. (2001). Strategies to enhance the biodegradation of toxic compounds using discontinuous processes. *Wat. Sci. Technol.* **14**; 227-236.

Bura R., Cheung M., Liao B., Finlayson J., Lee B. C., Droppo I. G., Leppard G.G. y Liss S.N. (1998). Composition of extracellular polymeric substances in the activate sludge floc matrix. *Wat. Sci. Tech.* **37**(4-5); 325-333.

Cuervo-López F M., Margínez F. Gutiérrez-Rojas M. Noyola R. A. y Gomez J. (1999), Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in UASB reactors. *Wat. Sci. Tech.* **40**; 123-130.

Cuervo López F M. (2003). Estudio biológico-físicoquímico de un lodo desnitrificante alimentado con diferentes fuentes de electrones. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

Choi E., Yun Z., Park Y., Lee H., Jeong H., Kim K., Lee H., Rho K y Gil K. (2001). Extracellular polymeric substances in relation to nutrient removal from a sequencing batch biofilm reactor. *Wat. Sci. Technol.* **43**(6); 185-192.

Dangcong, P., Bernet, N., Delgenes, J-P y Moletta, R. (1999). Aerobic granular sludge-a case report. *Wat. Res.* **3**; 890-893.

Dapena-Mora, A. Campos, J.L. Mosquera-Corral, A. Jetten, M.S.M. Méndez, R. (2004). Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. *Journal of Biotechnol.* **110**:159-170.

EPA. (1999). Folleto informativo de tecnología de aguas residuales. Reactores secuenciales por tandas. EPA 832-F-99-073.

Evans, P. J., Mang, D. T. y Young, L. Y. (1991). Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(2): 450-454.

Evans. P. J., Ling, W., Goldsschmidt, B., Ritter, E. R. y Young, L. Y. (1992). Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and *o*-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(2): 496-501.

Flemming, H.C. and Wingender, J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part I: Structural and ecological aspects. *Wat. Sci. Tech.* **43**(6): 1-8.

Frølund B., Palmgren R., Keiding K and Nielsen P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat. Res* **30**(8); 1749-1758.

Gómez, J., Méndez, R., and Lema, J. (1996). The effect of antibiotics on nitrification process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**; 869-876.

Goodwing, J.A.S. and Forster, C.F. (1985). A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlemente characteristics. *Water Res.* **19**; 527-533.

Hoa P.T., Nair L., Visvanathan C. (2003). The effect of nutrients on extracellular polymeric substance production and its influence on sludge properties. *Water S A.* **29**(4); 437-442.

Iken, S. y de Bont, J. A. M. (1996). Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. *J. Bacteriol.* **178**(120): 6056-6058.

Jin B., Wilén B. M., Lant P. (2003). A comprehensive insight into floc characteristics and their impact on compressibility and settleability of activated sludge. *Chemical Engineering Journal.* **95**; 221-234.

Kobayashi, H., Uematsu, K., Hirayama, H. y Horikoshi, K. (2000). Novel toluene elimination system in a toluene-tolerance microorganism. *J. Bacteriol.* **182**(22): 6451-6455.

Liao, B. Q., Allen, D.G., Droppo, I.G., Leppard, G.G. y Liss. S.N. (2001). Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Wat. Res.* **35**(2); 339-350.

Liu, Y-Q., Liu, Y., Tay, J-H. (2004). The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **65**; 143-148.

Ma, G., and Love, N.G. (2001). BTX biodegradation in activated sludge under multiple redox conditions. *J. Env. Eng.* **127**(6); 509-516.

Martínez, F. (2003). Sedimentabilidad de un lodo nitrificante en dos tipos de reactores y en presencia de material orgánica. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Martins AMP, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. 2003. Effect of feeding pattern and storage on the sludge settleability under aerobic conditions. *Water Res* **37**: 2555-2570.

McSwain, B.S., Irving, R.L., Hausner, M., y Wilderer, P.A. (2005). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and environmental microbiology*. 1051-1057.

Moreno-Andrade, I., y Buitrón, G. (2004). Evolución de la actividad de los microorganismos en los procesos de aclimatación y desaclimatación al 4-clorofoenol. XIV Congreso Nacional de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales AC, Mazatlán, Sinaloa.

Morgan, J.W., Forster, C.F., y Evison, L. (1990). A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Wat. Res.* **24**(6); 743-750.

Nichols CAM., Garon, S., Bowman, J.P., Raguenes, G., Guezennec, J. (2004). Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J Appl Microbiol.* **96**; 1057-1066.

Oh, J. y Silversten, J. (1999). Acetate limitation and nitrite accumulation during denitrification. *Journal of Environmental Engineering*. 234-242.

Peña-Calva, A., Olmos-Dichara, A., Viniegra-González, G., Cuervo-López, F.M. y Gómez, J. (2004). Denitrification in presence of benzene, toluene, and *m*-xylene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **119**: 195-208.

Puñal, A. y Chamy, R. (2003). Dynamics of granules physical properties in UASB and EGSB reactors for the treatment of médium and low concentrated wastewaters. *Wat. Sci. and Technol.* **48**(6); 41-49.

Qin, L., Liu, Q. S., Yang, S.F., Tay, J.H., y Liu, Y. (2004). Stressful conditions-induced production of extracellular polysaccharides in aerobic granulation process. *Civil Eng Res.* **17**; 49-51.

Ramos, L.J., Duque, E. Rodríguez, H.J-J., Godoy, P., Haïdor, Ali., Reyes, F., Fernández-Barrero, A. (1997). Mechanisms for solvent tolerante in bacteria. *The journal of biological chemistry*. **272**(7): 3887-3890.

Ramos, L.J., Duque, E., Gallegos, M-T., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Rojas, A., Terán, W. y Segura A. (2002). Mechanisms for solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 743-768.

Sikkema, J., De Bont, J. A. Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hidrocarbons. *Microbiology Reviews*. **59**(2): 201-222.

Tay, J-H., Liu, Q-S., y Liu, Y. (2001). The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology*, **33**; 222-226.

Vives Fàbregas Ma. Teresa (2004). SBR. Technology for wastewater treatment: suitable operational conditions for nutrient removal. Tesis de doctorado. Universidad de Girona, España.

Wilderer, P. A., Lones, W. L. y Dau, U. (1987). Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Wat. Res.* **21**(2): 239-245.



Capítulo 5
CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudió el efecto del tolueno y la concentración de SSV sobre el proceso respiratorio desnitrificante y la sedimentabilidad del lodo.

Las principales conclusiones son:

I. Proceso respiratorio

- El SBR alimentado con acetato presentó eficiencias de eliminación de C-acetato y N-nitrato alrededor del 100%. Y los rendimientos de Y_{HCO_3} y Y_{N_2} fueron cercanos a 1.
- La eficiencia en la vía desnitrificante no se vio afectada por la presencia del tolueno, los rendimientos desnitrificantes obtenidos con el tolueno fueron similares a los obtenidos con acetato.
- Las velocidades específicas de consumo de tolueno fueron 99% menores a las de acetato. A través de los ciclos las velocidades específicas de consumo aumentaron 4 veces su valor inicial con acetato (2 ± 0.1 mg sustrato/ mg SSV•d), y 1.5 veces con tolueno (0.032 ± 0.006 mg sustrato/ mg SSV•d).
- En los reactores inoculados con diferentes concentraciones de SSV, las velocidades volumétricas fueron 74% mayores en el reactor inoculado con 4 gSSV/l, en comparación al SBR inoculado con 2 g SSV/l.

II. Sedimentabilidad del lodo

- En comparación con el acetato y cuando se usaron 2 g SSV/l, el tolueno no ocasionó pérdida de sedimentabilidad del lodo, sin embargo, si se observó un incremento en la concentración de PE (1.75 veces) y CE (3.4 veces).
- Con 4 g SSV/l se presentó buena sedimentabilidad y el IVL fue una herramienta útil de predicción sobre el comportamiento del lodo.
- Cuando se utilizó 8 g SSV/l se observó falta de sedimentabilidad del lodo, y el IVL no fue una herramienta conveniente de predicción.
- Las concentraciones de 4 y 8 g SSV/l promovieron cambios en la concentración de los exopolímeros, ya que las concentración de PE y CE fueron dos veces mayor, en comparación al reactor inoculado con 2 g SSV/l.
- La falta de sedimentación de lodo parece estar asociada con concentraciones de PE mayores que 100 mg PE/l.



ANEXO

En esta sección se presentan los anovas, las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y análisis de correlación obtenidos en cada tratamiento.

6.1 Análisis estadísticos para la fase de alimentación con acetato y nitrato en el SBR

6.1.1 Anova para las velocidades específicas de consumo de acetato

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
Term						
A: Numero de ciclos	3	6,631006E-03	2,210335E-03	14,76	0,000249*	0,998761
S(A)	12	1,79755E-03	1,497959E-04			
Total (Adjusted)	15	8,428556E-03				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0,05

6.1.1.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de acetato

Response: Velocidad de consumo de acetato

Term A: Numero de ciclos

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=1,497959E-04

Group	Count	Mean	Different From Groups
12	4	1,653526E-02	24, 30
1	4	1,777219E-02	24, 30
24	4	5,452977E-02	12, 1
30	4	6,071811E-02	12, 1

6.1.2 Anova para las velocidades específicas de consumo de nitrato

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
Term						
A: Numero de ciclos	3	4,286483E-03	1,428828E-03	8,75	0,031288*	0,742606
S(A)	4	6,530111E-04	1,632528E-04			
Total (Adjusted)	7	4,939495E-03				
Total	8					

* Term significant at alpha = 0,05

6.1.2.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de nitrato

Response: Velocidad de consumo de nitrato

Term A: Numero de ciclos

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=4 MSE=1,632528E-04

Group	Count	Mean	Different From Groups
12	2	1,458226E-02	30
1	2	1,778861E-02	24, 30
24	2	5,638013E-02	1
30	2	6,719618E-02	12, 1

6.2 Análisis estadísticos para la fase de alimentación con tolueno y nitrato en el SBR

6.2.1 Anova para las velocidades específicas de consumo de tolueno

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
Term						
A: No_ciclo	5	8,292667E-04	1,658533E-04	49756,00	0,000000*	1,000000
S	6	2E-08	3,333333E-09			
Total (Adjusted)	11	8,292866E-04				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.2.1.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de tolueno

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: qs_tol

Term A: No_ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=3,333333E-09 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	0,01315	10, 12, 20, 17
3	2	0,0133	12, 20, 17
10	2	0,0134	1, 12, 20, 17
12	2	0,01965	1, 3, 10, 20, 17
20	2	0,03185	1, 3, 10, 12
17	2	0,03185	1, 3, 10, 12

6.2.2 Anova para las velocidades específicas de consumo de nitrato

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: No_ciclo	5	9,0532E-04	1,81064E-04	2109,28	0,000000*	1,000000
S	6	5,1505E-07	8,584167E-08			
Total (Adjusted)	11	9,058351E-04				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.2.2.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de nitrato

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: qs_NO3

Term A: No_ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=8,584167E-08 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	0,01085	10, 12, 20, 17
3	2	0,011665	10, 12, 20, 17
10	2	0,0153	1, 3, 12, 20, 17
12	2	0,0175	1, 3, 10, 20, 17
20	2	0,03165	1, 3, 10, 12
17	2	0,03165	1, 3, 10, 12

6.2.3 Anova para las velocidades específicas de producción de HCO_3^-

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: No_ciclo	5	9,59851E-04	1,919702E-04	2236,33	0,000000*	1,000000
S	6	5,1505E-07	8,584167E-08			
Total (Adjusted)	11	9,603661E-04				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.2.3.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de HCO_3^-

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: qp_HCO3

Term A: No_ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=8,584167E-08 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	0,01085	3, 10, 12, 20, 17
3	2	0,0133	1, 10, 12, 20, 17
10	2	0,015925	1, 3, 12, 20, 17
12	2	0,0175	1, 3, 10, 20, 17
20	2	0,03285	1, 3, 10, 12
17	2	0,03285	1, 3, 10, 12

6.2.4 Anova para las velocidades específicas de producción de N₂

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: No_ciclo	5	7,064767E-04	1,412953E-04	42388,60	0,000000*	1,000000
S	6	2E-08	3,333333E-09			
Total (Adjusted)	11	7,064966E-04				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.2.4.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de N₂

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: qp_N2

Term A: No_ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=3,333333E-09 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
3	2	0,0133	1, 10, 12, 20, 17
1	2	0,01385	3, 10, 12, 20, 17
10	2	0,0172	3, 1, 12, 20, 17
12	2	0,01965	3, 1, 10, 20, 17
20	2	0,03165	3, 1, 10, 12
17	2	0,03165	3, 1, 10, 12

6.3 Análisis estadísticos para la fase de alimentación con tolueno y nitrato a diferentes concentraciones de SSV en el SBR

6.3.1 Anova para las velocidades específicas de consumo de tolueno con respecto a 2, 4 y 8 g SSV/l

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	1,472133E-04	7,360666E-05	1261,83	0,000041*	1,000000
S	3	1,75E-07	5,833333E-08			
Total (Adjusted)	5	1,473883E-04				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.1.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de tolueno con respecto a 2, 4 y 8 g SSV/l

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: tol

Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=5,833333E-08 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
8	2	0,00775	4, 2
4	2	0,01165	8, 2
2	2	0,01965	8, 4

6.3.2 Anova para las velocidades específicas de consumo de nitrato con respecto a 2, 4 y 8 g SSV/l

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	8,98433E-05	4,492165E-05	1078,10	0,000052*	1,000000
S	3	1,25002E-07	4,166733E-08			
Total (Adjusted)	5	8,99683E-05				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.2.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de nitrato con respecto a 2, 4 y 8 g SSV/l

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: NO3
Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=4,166733E-08 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
8	2	0,00875	4, 2
4	2	0,0117	8, 2
2	2	0,018026	8, 4

6.3.3 Anova para las velocidades específicas de producción de HCO_3^- con respecto a 2, 4 y 8 g SSV/l

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	1,083433E-04	5,417167E-05	712,16	0,000096*	1,000000
S	3	2,282E-07	7,606667E-08			
Total (Adjusted)	5	1,085715E-04				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.3.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de producción de HCO_3^- con respecto a 2, 4 y 8 g SSV/l

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: HCO3
Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=7,606667E-08 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
8	2	0,00775	4, 2
4	2	0,0116	8, 2
2	2	0,01805	8, 4

6.3.4 Anova para las velocidades específicas de producción de N_2 con respecto a 2, 4 y 8 g SSV/l

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	2,292447E-04	1,146224E-04	809,09	0,000080*	1,000000
S	3	4,250045E-07	1,416682E-07			
Total (Adjusted)	5	2,296697E-04				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.4.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de producción de N_2 con respecto a 2, 4 y 8 g SSV/l

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: N2
Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=1,416682E-07 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
8	2	0,00755	4, 2
4	2	0,0126	8, 2
2	2	0,0224365	8, 4

6.3.5 Anova para las velocidades específicas de consumo de tolueno con 4 g SSV/I

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Ciclo	5	1,001575E-04	2,00315E-05	4807,56	0,000000*	1,000000
S	6	2,5E-08	4,166667E-09			
Total (Adjusted)	11	1,001825E-04				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.5.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de tolueno con 4 g SSV/I

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: tol_4

Term A: Ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=4,166667E-09 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	0,00385	5, 9, 11, 12
4	2	0,00405	5, 9, 11, 12
5	2	0,00665	1, 4, 9, 11, 12
9	2	0,00925	1, 4, 5, 11, 12
11	2	0,01	1, 4, 5, 9, 12
12	2	0,01135	1, 4, 5, 9, 11

6.3.6 Anova para las velocidades específicas de consumo de tolueno con 8 g SSV/I

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Ciclo	5	3,462416E-05	6,924834E-06	1661,96	0,000000*	1,000000
S	6	2,5E-08	4,166667E-09			
Total (Adjusted)	11	3,464917E-05				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.6.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de tolueno con 8 g SSV/I

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: tol_8

Term A: Ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=4,166667E-09 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	2	0,00345	4, 9, 11, 12
1	2	0,0035	4, 9, 11, 12
4	2	0,00435	5, 1, 9, 11, 12
9	2	0,00555	5, 1, 4, 11, 12
11	2	0,00745	5, 1, 4, 9
12	2	0,00755	5, 1, 4, 9

6.3.7 Anova para las velocidades específicas de consumo de nitrato con 4 g SSV/I

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Ciclo	5	1,1288E-04	2,2576E-05	4515,20	0,000000*	1,000000
S	6	3E-08	5E-09			
Total (Adjusted)	11	1,1291E-04				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.7.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de nitrato con 4 g SSV/I

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: NO3_4

Term A: Ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=5E-09 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	0,00375	4, 5, 9, 11, 12
4	2	0,00415	1, 5, 9, 11, 12
5	2	0,00725	1, 4, 9, 11, 12
9	2	0,00865	1, 4, 5, 11, 12
11	2	0,01085	1, 4, 5, 9, 12
12	2	0,01185	1, 4, 5, 9, 11

6.3.8 Anova para las velocidades específicas de consumo de nitrato con 8 g SSV/I

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Ciclo	5	6,778417E-05	1,355683E-05	154,94	0,000003*	1,000000
S	6	5,25E-07	8,75E-08			
Total (Adjusted)	11	6,830916E-05				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.8.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de consumo de nitrato con 8 g SSV/I

Response: NO3_8

Term A: Ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=8,75E-08 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	0,0025	5, 9, 11, 12
4	2	0,00315	9, 11, 12
5	2	0,00405	1, 9, 11, 12
9	2	0,00525	1, 4, 5, 11, 12
11	2	0,00835	1, 4, 5, 9
12	2	0,00855	1, 4, 5, 9

6.3.9 Anova para las velocidades específicas de producción de HCO_3^- con 4 g SSV/I

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Ciclo	5	1,289067E-04	2,578133E-05	5156,27	0,000000*	1,000000
S	6	3E-08	5E-09			
Total (Adjusted)	11	1,289367E-04				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.9.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de producción de HCO_3^- con 4 g SSV/I

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: HCO3_4

Term A: Ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=5E-09 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	0,00365	5, 9, 11, 12
4	2	0,00375	5, 9, 11, 12
5	2	0,00675	1, 4, 9, 11, 12
9	2	0,00825	1, 4, 5, 11, 12
11	2	0,01145	1, 4, 5, 9, 12
12	2	0,01185	1, 4, 5, 9, 11

6.3.10 Anova para las velocidades específicas de producción de HCO_3^- con 8 g SSV/l

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Ciclo	5	4,12975E-05	8,2595E-06	94,39	0,000013*	1,000000
S	6	5,25E-07	8,75E-08			
Total (Adjusted)	11	4,18225E-05				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.10.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de producción de HCO_3^- con 8 g SSV/l

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: HCO3_8

Term A: Ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=8,75E-08 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
5	2	0,0025	1, 4, 9, 11, 12
1	2	0,00375	5, 9, 11, 12
4	2	0,00385	5, 9, 11, 12
9	2	0,00565	5, 1, 4, 11, 12
11	2	0,00715	5, 1, 4, 9
12	2	0,00755	5, 1, 4, 9

6.3.11 Anova para las velocidades específicas de producción de N_2 con 4 g SSV/l

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Ciclo	5	1,526267E-04	3,052533E-05	6105,07	0,000000*	1,000000
S	6	3E-08	5E-09			
Total (Adjusted)	11	1,526567E-04				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.11.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de producción de N_2 con 4 g SSV/l

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: N2_4

Term A: Ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=5E-09 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	0,00325	4, 5, 9, 11, 12
4	2	0,00355	1, 5, 9, 11, 12
5	2	0,00645	1, 4, 9, 11, 12
9	2	0,00775	1, 4, 5, 11, 12
11	2	0,01185	1, 4, 5, 9, 12
12	2	0,01225	1, 4, 5, 9, 11

6.3.12 Anova para las velocidades específicas de producción de N_2 con 8 g SSV/l

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: Ciclo	5	4,278417E-05	8,556834E-06	97,79	0,000012*	1,000000
S	6	5,25E-07	8,75E-08			
Total (Adjusted)	11	4,330917E-05				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0,05

6.3.12.1 Comparación múltiple para las velocidades específicas de producción de N₂ con 8 g SSV/l

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: N2_8

Term A: Ciclo

Alpha=0,050 Error Term=S DF=6 MSE=8,75E-08 Critical Value=5,628392

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	0,0025	9, 11, 12
4	2	0,00305	9, 11, 12
5	2	0,00325	9, 11, 12
9	2	0,00515	1, 4, 5, 11, 12
11	2	0,00705	1, 4, 5, 9
12	2	0,00715	1, 4, 5, 9

6.4 Análisis estadísticos para las velocidades volumétricas en la alimentación con tolueno a diferentes concentraciones de SSV.

6.4.1 Anova para las velocidades volumétricas de consumo de acetato

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	0,5171946	0,2585973	51719461,33	0,000000*	1,000000
S	3	1,5E-08	5E-09			
Total (Adjusted)	5	0,5171946				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.4.1.1 Prueba de comparación múltiple para las velocidades volumétricas de consumo de tolueno

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: tol

Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=5E-09 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	2	1,27585	8, 4
8	2	1,75285	2, 4
4	2	1,98045	2, 8

6.4.2 Anova para las velocidades volumétricas de consumo de nitrato

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	1,103637	0,5518184	110363692,00	0,000000*	1,000000
S	3	1,5E-08	5E-09			
Total (Adjusted)	5	1,103637				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.4.2.1 Prueba de comparación múltiple para las velocidades volumétricas de consumo de nitrato

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: NO3

Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=5E-09 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	2	1,11015	8, 4
8	2	1,97045	2, 4
4	2	2,06245	2, 8

6.4.3 Anova para las velocidades volumétricas de producción de HCO_3^-

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	0,6278488	0,3139244	1846614,21	0,000000*	1,000000
S	3	5,1E-07	1,7E-07			
Total (Adjusted)	5	0,6278493				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.4.3.1 Prueba de comparación múltiple para las velocidades volumétricas de producción de HCO_3^-

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: HCO3
Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=1,7E-07 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	2	1,27585	8, 4
8	2	1,75785	2, 4
4	2	2,0615	2, 8

6.4.4 Anova para las velocidades volumétricas de producción de N_2

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	1,049709	0,5248547	104970949,33	0,000000*	1,000000
S	3	1,5E-08	5E-09			
Total (Adjusted)	5	1,04971				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.4.4.1 Prueba de comparación múltiple para las velocidades volumétricas de producción de N_2

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: N2
Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=5E-09 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	2	1,11015	8, 4
8	2	1,64555	2, 4
4	2	2,13435	2, 8

6.5 Análisis de correlación en las SEP en la fase alimentada con acetato

Correlation Section

	PE	CE	PE_CE	IVL	PE
PE	1,000000	0,697113	0,683974	-0,642097	1,000000
CE	0,697113	1,000000	-0,029612	-0,663227	0,697113
PE_CE	0,683974	-0,029612	1,000000	-0,192739	0,683974
IVL	-0,642097	-0,663227	-0,192739	1,000000	-0,642097
PE	1,000000	0,697113	0,683974	-0,642097	1,000000
CE	0,697113	1,000000	-0,029612	-0,663227	0,697113
PE_CE	0,683974	-0,029612	1,000000	-0,192739	0,683974
IVL	-0,642097	-0,663227	-0,192739	1,000000	-0,642097

6.6 Análisis de correlación en las SEP en la fase alimentada con tolueno

Correlation Section

	CE_A	PE_A	PE_CE_A	IVL_A	Vs_A
CE_A	1,000000	0,346083	0,091335	-0,159005	0,191353
PE_A	0,346083	1,000000	0,907955	-0,544510	-0,669677
PE_CE_A	0,091335	0,907955	1,000000	-0,414881	-0,659562
IVL_A	-0,159005	-0,544510	-0,414881	1,000000	0,762917
Vs_A	0,191353	-0,669677	-0,659562	0,762917	1,000000
CE_A	1,000000	0,346083	0,091335	-0,159005	0,191353
PE_A	0,346083	1,000000	0,907955	-0,544510	-0,669677
PE_CE_A	0,091335	0,907955	1,000000	-0,414881	-0,659562
IVL_A	-0,159005	-0,544510	-0,414881	1,000000	0,762917
Vs_A	0,191353	-0,669677	-0,659562	0,762917	1,000000

6.7 Análisis de las SEP, IVL, PE/CE y Vs para la alimentación con tolueno a diferentes concentraciones de SSV.

6.7.1 Anova para los CE

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	885,9446	442,9723	5968569,83	0,000000*	1,000000
S	3	2,226525E-04	7,42175E-05			
Total (Adjusted)	5	885,9448				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.7.1.1 Prueba de comparación múltiple para los CE

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: CE
Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=7,42175E-05 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	2	21,055	4, 8
4	2	40,40679	2, 8
8	2	50,31634	2, 4

6.7.2 Anova para las PE

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	2173,143	1086,572	10741688,21	0,000000*	1,000000
S	3	3,034639E-04	1,011546E-04			
Total (Adjusted)	5	2173,144				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.7.2.1 Prueba de comparación múltiple para las PE

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: PE
Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=1,011546E-04 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	2	49,30556	8, 4
8	2	80,19955	2, 4
4	2	94,98545	2, 8

6.7.3 Anova para el IVL

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	0,9162331	0,4581166	4959,24	0,000005*	1,000000
S	3	2,77129E-04	9,237635E-05			
Total (Adjusted)	5	0,9165102				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.7.3.1 Prueba de comparación múltiple para el IVL

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: PE_CE

Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=9,237635E-05 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
8	2	1,613833	4, 2
4	2	2,439033	8
2	2	2,446502	8

6.7.4 Anova para las Vs

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0,05)
A: SSV	2	963,4257	481,7129	4190724,41	0,000000*	1,000000
S	3	3,448422E-04	1,149474E-04			
Total (Adjusted)	5	963,426				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0,05

6.7.4.1 Prueba de comparación múltiple para las Vs

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: IVL

Term A: SSV

Alpha=0,050 Error Term=S DF=3 MSE=1,149474E-04 Critical Value=5,908033

Group	Count	Mean	Different From Groups
8	2	12,81603	4, 2
4	2	14,10735	8, 2
2	2	40,31906	8, 4

Iztapalapa, D.F. a 15 de Diciembre del 2005

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**ESTUDIO DEL PROCESO RESPIRATORIO Y ESTRUCTURA DE UN LODO
DESNITRIFICANTE EN PRESENCIA DE ACETATO Y TOLUENO EN UN SBR**

Que presentó

Landy Hernández Rodríguez

Comité Tutorial

Directora: Dra. Flor de María Cuervo López

Asesores: Dr. Jorge Gómez Hernández

Dr. Germán Buitrón Méndez

Jurado

Presidente: Dra. Florina Ramírez Vives

Secretario: Dra. Anne Claire Texier

Vocal: Dr. Eric Houbron

Vocal: Dr. Felipe Martínez Orta

