

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL



**ACCIONES DE ALGUNAS ESPECIES DE LA
FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE EN EL
PROCESO DE NITRIFICACION DE
AGUAS RESIDUALES**

PRESENTA :
Q. B. P. EDUARDO LOPEZ BRAVO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN INGENIERIA AMBIENTAL**

CD. UNIVERSITARIA

JULIO DE 1996



ACCIONES DE ALGUMAS ESPECIES DE LA FAMILIA
ENTREBACTERIAE EN EL PROCESO DE NITRIFICACION
DE AGUAS RESIDUALES

DE AGUAS RESIDUALES

DE AGUAS RESIDUALES

DE AGUAS RESIDUALES



1080073218

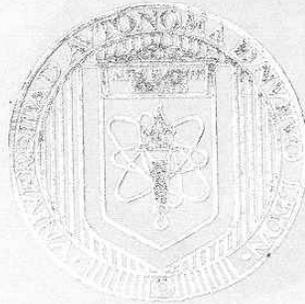
SHOW CARD



SUPER

SHOW CARD

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL



ACCIONES DE ALGUNAS ESPECIES DE LA
FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE EN EL
PROCESO DE NITRIFICACION DE
AGUAS RESIDUALES

PRESENTA:

Q. E. P. EDUARDO LOPEZ BRAVO

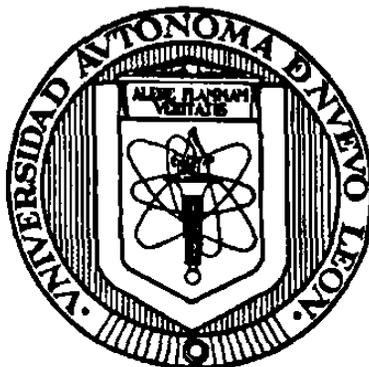
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN INGENIERIA AMBIENTAL

CD. UNIVERSITARIA

JULIO DE 1996

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL



**ACCIONES DE ALGUNAS ESPECIES DE LA FAMILIA
ENTEROBACTERIACEAE EN EL PROCESO DE
NITRIFICACION DE AGUAS RESIDUALES**

Por

Q.B.P. EDUARDO LOPEZ BRAVO

**Como requisito para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Ingeniería Ambiental**

Julio, 1996



(73218)



11A A1

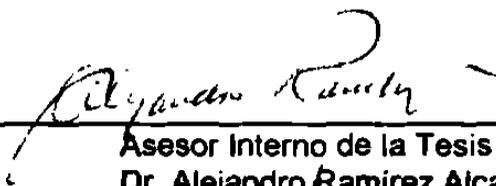


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



Acciones de Algunas Especies de la Familia
Enterobacteriaceae en el Proceso de
Nitrificación de Aguas Residuales

Aprobación de la Tesis:


Asesor Interno de la Tesis
Dr. Alejandro Ramirez Alcazar


Asesor Externo de la Tesis
Q.I. Ma. Hilda Garza Fernández


Secretario de Estudios de Postgrado
Ing. Oscar M. Robles Sánchez



SECRETARIA DE ESTUDIOS
DE POSTGRADO



FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL, U.A.N.L.
SECRETARIA DE POSTGRADO



COMPROBANTE DE CORRECCION.

Tealista : EDUARDO LOPEZ BRAVO

Tema de la tesis : ACCIONES DE ALGUNAS ESPECIES DE LA
FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE EN EL PROCESO
DE NITRIFICACION DE AGUAS RESIDUALES.

Este documento certifica la corrección DEFINITIVA

del trabajo de tesis arriba indentificado, en los aspectos : ortográfico,
metodológico y estilístico.

Recomendaciones adicionales:

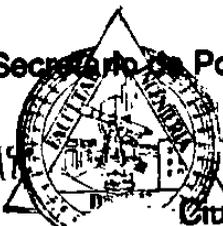
NINGUNA

Nombre y firma de quien corrigió :


ARG. RAMON LONGORIA RAMIREZ

El Secretario de Postgrado :


Ing. Oscar M. Robles Sánchez.



Ciudad Universitaria, a 24 de Juni de 1996.

SECRETARIA DE ESTUDIOS
DE POSTGRADO

Handwritten notes:
cib
Feb. 24 1996

Monterrey, N.L. a 19 de junio de 1996

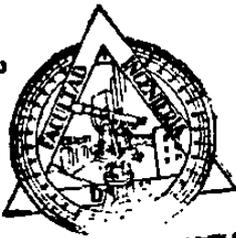
ING. OSCAR MANUEL ROBLES SANCHEZ
SECRETARIO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

Estimado Ing. Robles.

Por medio de la presente solicito la tramitación correspondiente, para sustentar mi examen de grado, ya que he concluido con la elaboración de mi tesis, la cual lleva por nombre: "Acciones de Algunas Especies de la Familia Enterobacteriaceae en el Proceso de Nitrificación de Aguas Residuales".

La aprobación de la tesis en cuanto a la parte teórica fue de mi asesor interno el Dr. Alejandro Ramírez Alcazar y de mi asesor externo la Q.I. Ma. Hilda Garza Fernández y en cuanto a la parte de estilo y ortografía fue del Arq. Ramón Longoria.

Atentamente,



SECRETARIA DE ESTUDIOS
DE POSTGRADO


Q.B.P. EDUARDO LÓPEZ BRAVO

Monterrey, N.L. a 19 de junio de 1996

ING. OSCAR MANUEL ROBLES SANCHEZ
SECRETARIO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

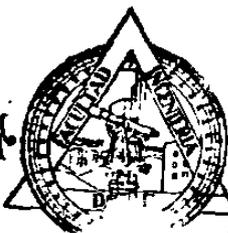
Estimado Ing. Robles.

Por este conducto me permito comunicar a usted, que el Sr. Q.B.P. Eduardo López Bravo, pasante de la Maestría en Ciencias con Especialidad en Ingeniería Ambiental, ha concluido con su tesis titulada "Acciones de Algunas Especies de la Familia Enterobacteriaceae en el Proceso de Nitrificación de Aguas Residuales", por lo que no hay ningún inconveniente para atender a su solicitud de Exámen de Grado con los requisitos que exige el reglamento de exámenes profesionales de nuestra Institución, he de agradecerle pasar las instrucciones necesarias para que le de trámite correspondiente en ese departamento a su digno cargo.

Sin más por el momento quedo de Usted agradeciendo de antemano la atención.

Atentamente,

OK
Vale
27/6/96




Dr. ALEJANDRO RAMIREZ ALCAZAR

SECRETARIA DE ESTUDIOS
DE POSTGRADO

Monterrey, N.L. a 19 de junio de 1996

**ING. OSCAR MANUEL ROBLES SANCHEZ
SECRETARIO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE INGENIERIA CIVIL
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

Estimado Ing. Robles.

Por este conducto me permito comunicar a usted, que el Sr. Q.B.P. Eduardo López Bravo, pasante de la Maestría en Ciencias con Especialidad en Ingeniería Ambiental, ha concluido con su tesis titulada "Acciones de Algunas Especies de la Familia Enterobacteriaceae en el Proceso de Nitrificación de Aguas Residuales", por lo que no hay ningún inconveniente para atender a su solicitud de Exámen de Grado con los requisitos que exige el reglamento de exámenes profesionales de nuestra Institución, he de agradecerle pasar las instrucciones necesarias para que le de trámite correspondiente en ese departamento a su digno cargo.

Sin más por el momento quedo de Usted agradeciendo de antemano la atención.

Atentamente,



**SECRETARIA DE ESTUDIOS
DE POSTGRADO**



Q. I. Ma. HILDA GARZA FERNANDEZ

A TI SEÑOR

Gracias Señor por hacer de mí lo que soy, por tantas cosas buenas que me has dado, por darme la dicha de una familia unida y de conocer a una hermosa mujer como Teresita.

Gracias te doy Señor porque siempre has estado a mi lado, por guiarme hacia la luz de la verdad, por permitirme culminar una etapa más caminando bajo tu santa protección.

Gracias Dios mío porque me has dado todo sin merecerlo, por eso te pido que nunca me desampares y que me ilumines siempre para hacer el bien a los demás, y para salir adelante sin apartarme nunca de la verdad

¡GRACIAS SEÑOR!

A mis padres:

**Sr. Miguel López Márquez
y
Sra. Ma. Teresa Bravo de López**

Por ser quienes me han dado todo lo que un hijo puede pedir, velando siempre por mí y alentándome en todo momento. Ustedes han sido para mí el mejor ejemplo de que la única forma de ser una persona respetable es caminando siempre por el camino recto, siendo bueno con mis semejantes como ustedes lo han sido conmigo, siendo honesto y sobretodo firme en mis decisiones, todo esto con amor y respeto a Dios.

-Papá y Mamá que Dios los bendiga siempre y tengan la seguridad que llevaré muy en alto su nombre y los valores que he aprendido de ustedes.

Dios fue muy grande conmigo al darme la dicha de tenerlos a ustedes, pues no existen mejores padres en este mundo.

!LOS QUIERO MUCHO!

A mis Hermanos

Virginia
Fabiola
Claudia
Liliana

Esperanza
Miguel
Juan José
Pedro luis

Por todo su cariño y apoyo y por tantos momentos felices que hemos compartido, tenerlos a ustedes es una bendición de Dios.

Amis Cuñados:

Antonio
Hector
Ma. Luisa

José de Jesús
Gerardo
Bianei

Por aumentar la alegría de esta gran familia con su presencia

A los más pequeños

Nauhman Antonio
Juan Jesús Alberto
Santiago de Jesús
Hector
Ma. Luisa

Juan Miguel
Oscar Cristian
Francisco Antonio
Karla Esperanza
Claudia Teresa

Quienes sin lugar a dudas son la verdadera alegría de nuestra familia y el motor que nos impulsa a ser mejores cada día.

Al ser mas maravilloso que he conocido:

L.Q.I. Ma. Teresa Correa Lettieri

A tí que has sido mi alegría de vivir, a tí que me has impulsado siempre a ser mejor sólo con tu presencia, a tí que siempre tienes una palabra de ternura para consolarme y para motivarme, a tí que con tu forma de ser me has motivado para ser cada día mejor, porque te amo desde que te conocí, porque eres la mejor mujer de este mundo, tú que eres mi sueño dorado y que me haces comprender el lado hermoso de las cosas, pues el simple hecho de sentir tu presencia hace que mi ser cambie y todo se vea de manera distinta, siendo en ese momento, cuando tú estás cerca en, que todo se ve hermoso, porque transmites tu belleza a cuanto te rodea.

Cuando pienso en tí, amada mía, sé que no existen imposibles, que por conseguir tu amor soy capaz de todo, que no hay obstáculos que no logre salvar por tí, que no existe el cansancio ni la soledad, más bien, por el contrario, cuando pienso en tí soy más fuerte, más hábil y tengo más energía para hacer las cosas, pues no existe en mí un mejor aliciente que una mirada de tus lindos ojos o una sonrisa de tu boquita hermosa, lo cual es una bendición de Dios.

Este trabajo va dedicado a tí con todo mi amor, pero también quiero decirte que mi vida entera la dedico a tí desde siempre...

¡PORQUE TE AMO!

A mi abuelita:

Sra. Soledad Sánchez de Bravo por confiar siempre en mí y por ser un gran ejemplo de esfuerzo y dedicación para con su familia, que Dios la bendiga siempre abuelita, la quiero mucho.

A la memoria de mi abuelita Ma. del Refugio Márquez de López (q.e.p.d.), a quien no tuve la dicha de conocer pero sé que fuiste una gran mujer y que desde el cielo siempre has cuidado de nosotros.

En mis oraciones los llevo presentes, pero también en mi memoria, que Dios los bendiga por haber sido tan buenos.

A la memoria de mis abuelos:

Santiago López (q.e.p.d.) y Pedro Bravo (q.e.p.d.) de quienes sólo recibí el buen ejemplo y trato siempre de seguir sus pasos.

A la memoria de mi querido amigo Dr. Marcelino Gamiño Sánchez (q.e.p.d.) ya que fuiste un gran ejemplo de trabajo y entrega, pero sobre todo de amistad desinteresada, yo sé que Dios necesitaba un médico en el cielo y por eso te mandó llamar, para que desde allá arriba vieras por tu familia y tus amigos que aquí en la tierra siempre te recordamos con cariño.

Amigo, siempre estás presente en mis oraciones.

A mi gran amigo Agustín Enríquez Ruteaga y a su apreciable familia por ser un gran hermano en las buenas y en las malas, siempre motivándome a ser mejor.

A la familia Correa Lettieri:

Dr. Rogelio Correa Garza
y
Sra. Ma. Teresa Lettieri de Correa

Por su sincera amistad y su inigualable apoyo tanto en mi vida profesional como en mi vida personal, que Dios los bendiga por ser tan buenos y también por ser un gran ejemplo de amor, unidad, esfuerzo y superación.

Al Dr. José Blas Correa Lettieri por ser un gran amigo dispuesto a brindar todo sin esperar nada a cambio.

A la familia Lettieri Hernández por haberme brindado su cariño y amistad de una forma tan sincera y sencilla que no sé como agradecerles todo lo que han hecho por mí, que Dios los bendiga.

A la familia Márquez Aguilar:

Sr. Daniel Márquez
y
Sra. Dolores Aguilar de Márquez

Por ser mi segunda familia, que Dios los colme de bendiciones, gracias por ser tan buenos.

A la familia Romo Muñoz:

Sr. Ignacio Romo Márquez
y
Sra. Julia Muñoz de Romo

Gracias por todo su apoyo y comprensión.

A la maestra Q. L. Ma. Hilda Garza de Salgado quien ha estado siempre dispuesta a ayudarme, y que con sus sabios consejos me ha encaminado a ser mejor cada día, pues con el ejemplo me ha hecho comprender que el éxito sólo se logra a base de esfuerzo y dedicación, que Dios la bendiga maestra porque es usted un gran ejemplo de honestidad y superación.

Al Ing. Ricardo Salgado Gutiérrez por brindarme siempre sus sabios consejos, pero sobre todo por su amistad y porque siempre está dispuesto a escuchar y ayudar a quienes nos acercamos a usted en busca de orientación, que Dios lo bendiga.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Ramírez Alcazar por el interés mostrado durante el desarrollo del presente estudio y sobre todo porque con amabilidad y paciencia compartió un poco de su valioso tiempo, ya que cuando fue necesario un consejo, siempre estuvo dispuesto a atenderme y orientarme.

Un agradecimiento muy especial, acompañado de todo mi respeto y admiración para la Lic. Raquel Serrato González quien ha sido una pieza fundamental para la realización del presente estudio, pues sin su extraordinaria ayuda y su inigualable capacidad para ayudar a sus semejantes no hubiera sido posible llevar a cabo un trabajo como este.

Al Biól. Manuel Torres y Biól. Lourdes Barajas del Departamento de Ecología Pesquera de la F.C.B./ U.A.N.L., por permitirme un espacio para la instalación de los reactores y por sus sabios consejos y recomendaciones, encaminados siempre a mejorar este estudio.

Al Biól. Feliciano Segovia y Q.B.P. Lucio Galaviz por su amistad y por el interés mostrado durante el presente estudio.

Al Q.B.P. Juan Manuel Arredondo Cantú, por sus acertados comentarios y por haber sido uno de los principales colaboradores en la revisión de este trabajo.

Al Biól. M.C. Fernando Jimenez Guzmán por sus inapreciables observaciones y consejos.

A todos los maestros de la Maestría en Ing. Ambiental, especialmente a: Dr. Alejandro Ramírez, Dr. Febronio Chavarría, Ing. Oziel Chapa, Ing. Horacio González Santos, Ing. Benjamin Limón, Q.I. Martha Herrejón, Lic. Ricardo Pedraza, Ing. Benito Muñoz, Ing. Oscar Robles por darme la mejor formación académica en un área tan extensa como lo es la Ingeniería Ambiental.

Al Lic. Roberto Mercado por su apoyo profesional en la realización de esta tesis.

A doña Leo y doña Marina, siempre dispuestas a ayudar.

A Fina y Anita, secretarias de la División de Estudios de Post-grado de la F.I.C./U.A.N.L. , gracias por sus atenciones durante mi estancia en esta institución.

Mi reconocimiento al Laboratorio de Parasitología de la F.C.B./U.A.N.L. por haberme facilitado el equipo, material y reactivos necesarios para la elaboración de esta tesis.

Un especial agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por todo el apoyo que me brindó para la realización de esta maestría.

A todas aquellas personas que directa e indirectamente colaboraron en la realización de esta tesis.

INDICE

RESUMEN	iii
1.- INTRODUCCION	1
1.1 Características de las Enterobacterias	3
1.2 Ciclo del Nitrógeno	4
1.3 Nitrificación	6
1.4 Metabolismo del Nitrógeno	8
1.5 Fuentes de Nitrógeno	10
1.6 Fijación de Nitrógeno	13
2.- OBJETIVO	15
3.- HIPOTESIS	15
4.- ORIGINALIDAD	16
5.- IMPORTANCIA	17
6.- MATERIAL Y METODOS	18
6.1 Equipo Utilizado	18
6.2 Fuente de Agua Residual	20
6.3 Conservación de la Muestra	20
6.4 Montaje de Reactores	21
6.5 Parámetros Físicoquímicos	21
6.5.1 Métodos Analíticos Utilizados	22
6.6 Aislamiento e Identificación de Bacterias	23
6.6.1 Colecta de Muestras	23
6.6.2 Aislamiento de Colonias Bacterianas	23
6.6.3 Identificación de Bacterias Aisladas	23
6.7 Comportamiento de las Bacterias Aisladas sobre Diferentes Fuentes de Nitrógeno	24

6.7.1	Composición Química de los Medios de Cultivo <i>Empleados para Evaluar la Posible Oxidación de NO₂ y NH₃</i>	25
6.7.2	Bacterias Utilizadas	25
6.7.3	Preparación del Inóculo	26
6.7.4	Comportamiento de las Bacterias en los Medios de Cultivo Utilizados	26
6.7.4.1	Determinación Cualitativa de N-NH ₃	27
6.7.4.2	Determinación Cualitativa de N-NO ₂	27
6.7.4.3	Determinación Cualitativa de N-NO ₃	27
6.7.4.4	<i>Determinación Cuantitativa de los Diferentes Compuestos de Nitrógeno</i>	28
6.7.4.5	Cuenta de Bacterias en los Cultivos Realizados con Medios A y B	28
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
8.	CONCLUSIONES	35
9.	REFERENCIAS	38
10.	ANEXOS	42
10.1	Diagrama de Flujo	43
10.2	Plano Ubicación del Colector No. 4.	45
10.3	Figuras	47
10.4	Gráficas	52
10.5.a	Reactivos para Pruebas Cualitativas	57
10.5.b	Prueba Estadística de Cuentas Viables en Placa	58

RESUMEN

En el presente estudio se realizó el aislamiento e identificación de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae presentes en agua residual mixta. además, se evaluó su capacidad para oxidar el amonio y el nitrito hasta nitrato. Se empleó agua residual municipal, la cual fue tratada a escala de laboratorio en un reactor de lodos activados de flujo continuo, completamente mezclado, con retorno de biomasa y capacidad de 19 litros ($\theta_h = 0.69$ días) denominado reactor biológico (RB); a partir de éste, el agua pasó a dos reactores biológicos de nitrificación (R1 y R2) de flujo continuo, completamente mezclado y sin retorno de biomasa, el primero (R1) con capacidad de 10 litros y $\theta_h = 1.16$ días y el segundo (R2) con capacidad de 20 litros y $\theta_h = 4.63$ días.

En el reactor biológico se aislaron e identificaron *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter agglomerans*, mientras que en los reactores biológicos de nitrificación sólo se detectaron *E. coli* y *E. agglomerans* en el R1 y solamente *E. coli* en el R2. Las bacterias aisladas de los diferentes reactores sirvieron para inocular posteriormente medios de cultivo sintéticos con concentraciones conocidas de NO_2 (medio "A") y de NH_3 (medio "B"). Después de 15 días de incubación a 28 ± 2 °C, se realizaron cuentas bacterianas en ambos medios, utilizando el método de cuenta viable por difusión en placa cuya confiabilidad se determinó por estadísticas descriptivas y se observó que en el medio "A" la población bacteriana fue menor que en el medio "B"; sin embargo, la oxidación detectada de nitrito (NO_2) a nitrato (NO_3) y de amoníaco (NH_3) a nitrato (NO_3) fue mínima en ambos medios. Lo anterior permite concluir que bajo las condiciones establecidas en este estudio el proceso de nitrificación en aguas residuales no puede realizarse en forma importante sólo con la acción de enterobacterias.

Las especies de microorganismos se vieron directamente afectadas por el tiempo de retención hidráulico de los diferentes reactores, ya que a medida que éste aumentó, el número de especies presentes disminuyó. Los valores de pH permanecieron constantes durante todo el estudio, oscilando entre 7.0 y 7.5 unidades por lo que no fue posible evaluar el efecto de este parámetro sobre los microorganismos estudiados.

1. INTRODUCCION

El crecimiento de los organismos nitrificantes (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter*) ocurre en los procesos aeróbicos de tratamiento biológico, que pueden ser de aereación extendida con biomasa suspendida o bien en percoladores biológicos con biomasa fija, al mismo tiempo que se desarrollan otros tipos de crecimiento biológico, los cuales pueden en un momento dado competir con las bacterias nitrificantes por el amonio disponible en el medio.

En estos sistemas de tratamiento existe suficiente materia orgánica en el agua residual para facilitar el crecimiento de los organismos heterótrofos, que bajo estas condiciones pueden superar a la tasa de crecimiento de las nitrobacterias y tener un efecto sobre el proceso de nitrificación.

Al estudiar la nitrificación biológica, se considera que los procesos quimioautotróficos hasta ahora descritos, por lo general tienen la mayor importancia. No obstante, cierto número de organismos heterótrofos producen nitritos o nitratos ya sea de compuestos orgánicos o inorgánicos, utilizando mecanismos que no son necesariamente oxidantes y que no constituyen la sola fuente de energía para los organismos. En una reseña completa de las transformaciones microbianas del nitrógeno inorgánico, Painter (1977), cita ejemplos de nitrificación heterotrófica. Se ha demostrado que la nitrificación heterotrófica tiene lugar naturalmente en los suelos, en el tratamiento de aguas negras y en las corrientes de aguas naturales.

A pesar de que algunos autores consideran significativa la nitrificación heterotrófica, Painter ha señalado que los organismos heterótrofos inhiben selectivamente la nitrificación autotrófica, inhiben por lo general y en su totalidad la nitrificación cuando se añaden a los suelos o lodos activados. También hay evidencia de que las bacterias nitrificantes autotróficas, no son autótrofos obligados y pueden asimilar ciertos compuestos orgánicos.

Parker y col. (1989) indicaron que el proceso de nitrificación debe efectuarse en medio acuoso continuo para impedir que las bacterias heterótrofas u otros microorganismos presentes consuman la materia orgánica y el oxígeno presente, con lo que la nitrificación puede verse interrumpida.

Grahame H. Hall (1982) al realizar un estudio sobre la tasa aparente y la tasa medible de nitrificación en un lago mesotrófico no pudo establecer una relación sinérgica entre *Nitrobacter* y bacterias heterótrofas productoras de nitrito.

Se han realizado muy escasos estudios sobre la importancia de la nitrificación autótrofa comparada con la nitrificación heterótrofa. En 1896 se tuvo el primer reporte de producción de nitrato por hongos, además de que algunos organismos heterótrofos han sido reportados como capaces de oxidar diversos compuestos nitrogenados en los medios de cultivo. Sin embargo, se ha hipotetizado sobre la nitrificación heterotrófica, debido a su importancia en algunos suelos forestales, pero se desconoce su significado ecológico. Schimel, Firestone y Killham (1984) encontraron que el potencial de la nitrificación heterótrofa en dichos suelos es mayor que la nitrificación autótrofa.

Verhagen, Duyts y Laanbroek (1992) realizaron un estudio sobre la competencia por el amonio entre bacterias nitrificantes y bacterias heterótrofas en columnas percoladoras de suelo, encontraron que las bacterias nitrificantes son menos competitivas que las heterótrofas para la asimilación del amonio, aunque sobreviven como células viables inactivas.

Uchino, Hambali y Yatazawa (1984) demostraron la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae en la corteza del árbol *Bruguiera gymnorrhiza* (L.), identificando a *Enterobacter cloaccae* y *E. aerogenes* como los principales responsables del proceso de fijación de nitrógeno.

Wright y Werner (1980) identificaron a *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae* como los principales microorganismos fijadores de nitrógeno en zacate forrajero, los cuales elevaron considerablemente la tasa de fijación de nitrógeno en un tiempo muy corto. Esto sugiere la posibilidad de que algunas especies pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae sean capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno en el agua.

1.1 Características de las Enterobacterias

Las enterobacterias comprenden un grupo relativamente heterogéneo de bacilos gram negativos, no esporulados, no móviles o móviles por flagelos peritricos, aerobios facultativos, oxidasa negativos, con requerimientos nutricionales simples y con capacidad de fermentar azúcares. Dentro de esta familia se encuentra *Escherichia coli* que es habitante casi universal de las vías intestinales de humanos y animales de sangre caliente y que es capaz de crecer en una amplia variedad de fuentes de carbono y energía, a su vez *Klebsiella* sp. se encuentra con frecuencia en agua y suelo.

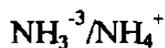
Dichas bacterias, además de competir con las nitrificantes por el amonio disponible, pueden verse afectadas por diversos factores, tales como temperatura, pH, oxígeno disuelto y por el tiempo de retención hidráulico durante el proceso de nitrificación.

Existe también una gran variedad de bacterias, entre las que se encuentran los géneros *Azotobacter*, *Clostridium* y *Disulfovibrio*, capaces de fijar el nitrógeno molecular en el agua, debido a que producen la enzima nitrogenasa.

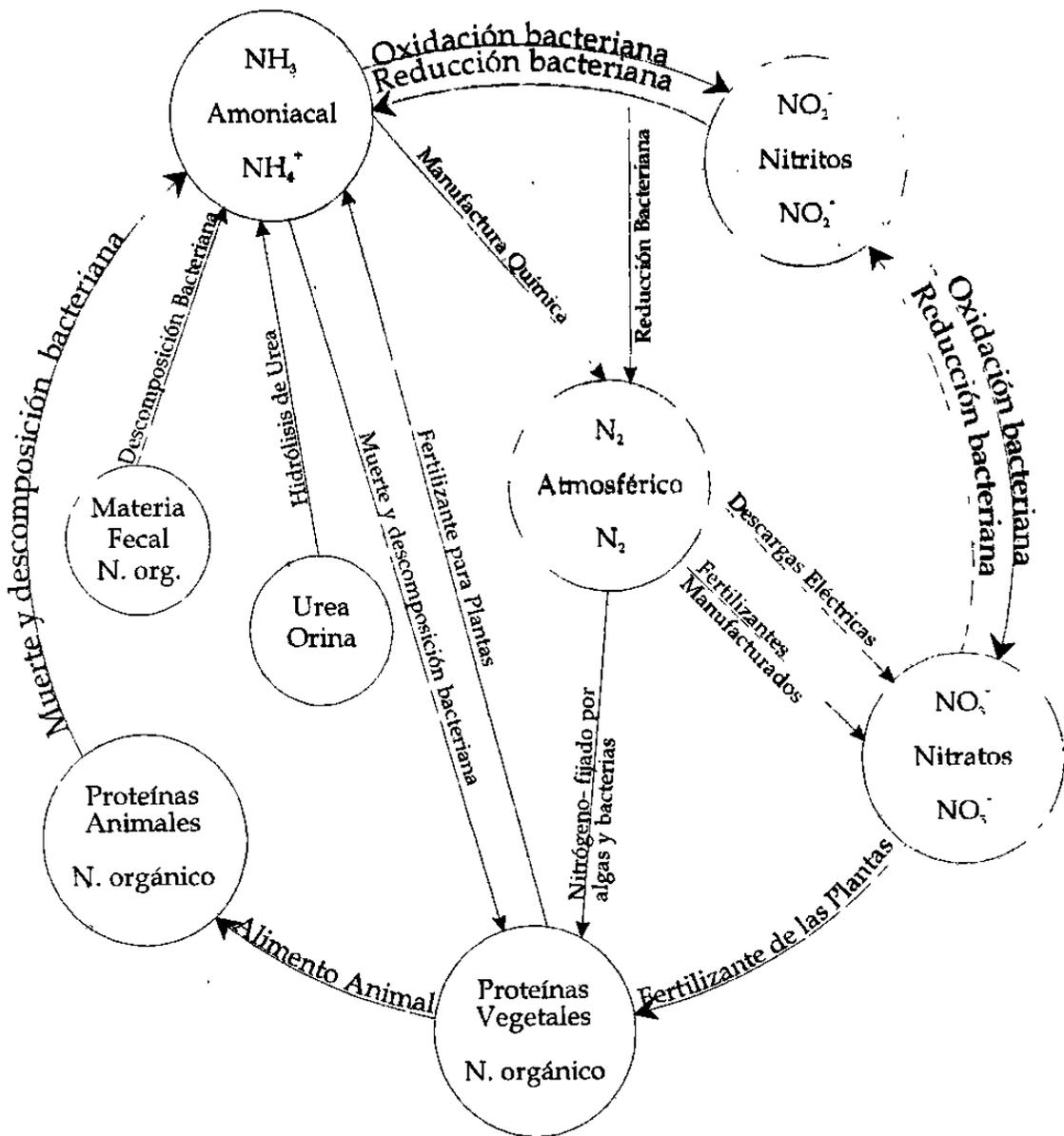
1.2 Ciclo del Nitrógeno

En el ciclo del nitrógeno las reacciones de transformación más importantes incluyen la fijación, amonificación, asimilación, nitrificación y desnitrificación. Estas reacciones pueden ser llevadas a cabo por microorganismos particulares, con ganancia neta o pérdida de energía.

Las consideraciones de energía juegan un papel importante en la determinación de las reacciones que ocurren. Los principales compuestos que aparecen en el ciclo del nitrógeno son: nitrógeno orgánico, nitrógeno gaseoso, nitrito y nitrato, cuyos estados de oxidación son los siguientes:



CICLO DEL NITRÓGENO

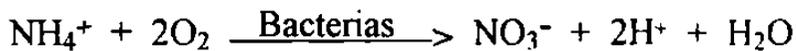


Fuente: Secretaría de Recursos Hidráulicos. Subsecretaría de Planeación. S.R.H. Manual del Curso Análisis de Aguas y Aguas de Desecho. Curso B, Vol. II, pp. 264.

1.3 Nitrificación

La nitrificación es la oxidación biológica del amoníaco, primero a nitrito y posteriormente a nitrato. Las bacterias responsables de estas reacciones son denominadas quimioautotróficas, debido a que emplean compuestos inorgánicos como fuente de energía.

La reacción global de nitrificación es:



La nitrificación suministra la fuente de energía para las bacterias nitrificantes y se consume una cantidad mucho mayor de amoníaco en este proceso para el crecimiento de las bacterias nitrificantes, que por la incorporación al nitrógeno orgánico en la biomasa resultante. Hall y Murphy (1980) encontraron que el número de nitrificantes presentes en lodos activados en el laboratorio aumenta según se reduce la tasa DBO_5/TKN .

Un diverso grupo de bacilos, cocos, vibrios y espirilos tienen en común la capacidad para utilizar al amonio o nitrito como fuente de energía y al CO_2 como fuente de carbono.

Existen algunos microorganismos gram negativos capaces de efectuar la fijación de nitrógeno a partir de NH_4Cl , Fritzsche y Niemann (1990) describen que *Klebsiella pneumoniae* es capaz de llevar a cabo este proceso.

R.C. Charley, D. G. Hooper y A.G. Mc Lee (1980) han demostrado que concentraciones de N-NO_2 , superiores a 20.0 mg/l pueden inhibir el proceso de nitrificación.

Dos reacciones no biológicas son aplicables a la nitrificación biológica. La reacción de "VAN SLYKE" es el nombre que a veces se aplica a la descomposición del nitrito de amonio.



Esta reacción ha sido investigada a fondo, en 1960 Smith y Clark realizaron una completa investigación de este efecto y presentaron un resumen de los resultados obtenidos también por otros investigadores. La conclusión general fue que la reacción de VAN SLYKE procede a tasas significativas sólo en condiciones ácidas, a valores de pH por debajo de cinco unidades.

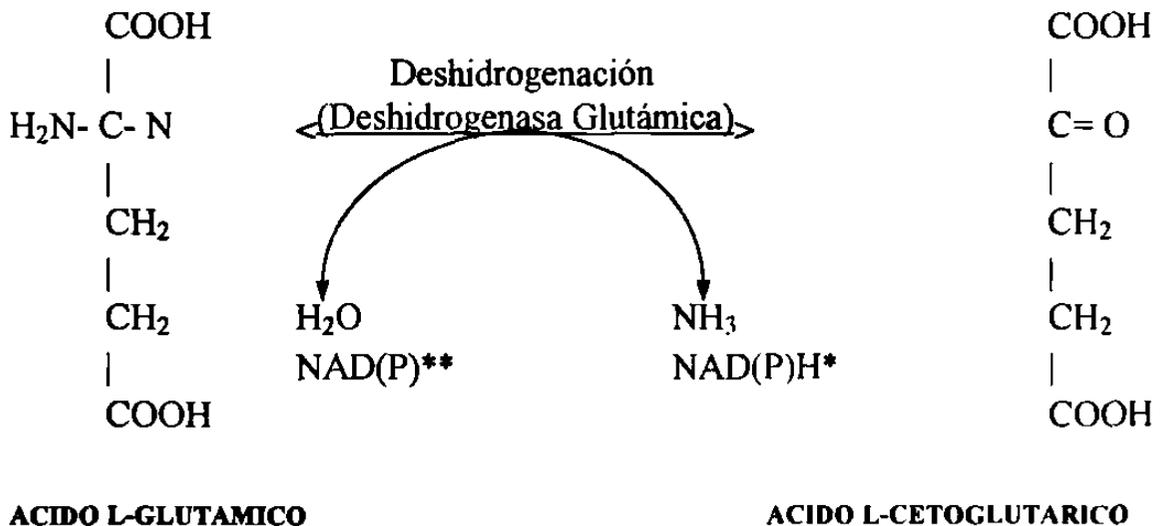
También Smith y Clark llegaron a la conclusión de que en condiciones ácidas, y con suficiente disponibilidad de oxígeno, una cantidad significativa de nitritos se oxidan a nitratos por un mecanismo químico.

1.4 Metabolismo del Nitrógeno

El nitrógeno es necesario para la biosíntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas y los microorganismos pueden obtenerlo a partir de compuestos orgánicos o inorgánicos. Las fuentes de nitrógeno inorgánico más frecuentes son nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+); otras fuentes inorgánicas empleadas por algunos microorganismos incluyen también al cianuro (CN^-), cianato (OCN^-), tiocianato (SCN^-), cianamida (NCN^{2-}), nitrito (NO_2^-) e hidroxilamina (NH_2OH). El nitrógeno gas también es empleado por algunas bacterias.

La asimilación del amoniaco en aminoácidos por los microorganismos requiere gasto de energía, muchas bacterias tienen dos vías para la asimilación del amoniaco y su funcionamiento depende de la concentración externa de este compuesto.

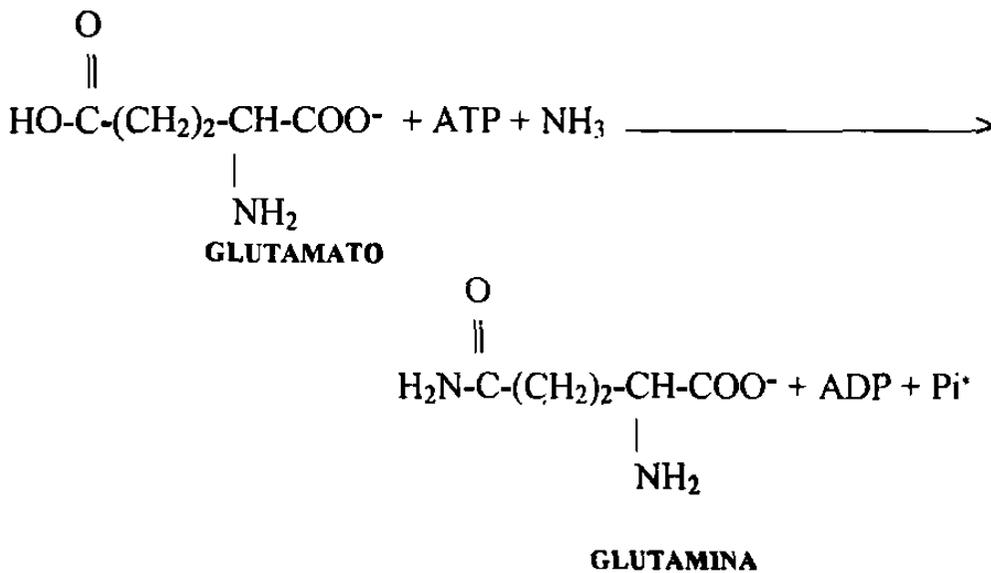
Cuando la cantidad de amoniaco es alta, funciona la vía de “Glutamato Deshidrogenasa”, efectuándose la síntesis de ácido glutámico a partir del amonio y α -cetoglutarato. Esta reacción requiere el poder de reducción en forma de NADPH^* (u ocasionalmente como NADH^{**}).



* Dinucleótido de Niacina Adenina Fosfato

** Dinucleótido de Niacina Adenina

Cuando las concentraciones de amoníaco son bajas, entra en funcionamiento una secuencia de reacciones más complejas que involucran a la glutamina (amida del ácido glutámico) que es sintetizada a partir del glutamato y el amonio en una reacción que requiere adenosín trifosfato (ATP) y es catalizada por la enzima "GLUTAMINA SINTETASA".



En una segunda reacción, la enzima "GLUTAMATO SINTETASA" cataliza la transferencia del grupo amida a glutamina que al sumarse a una molécula de α -cetoglutarato forma dos moléculas de glutamato.



Cuando se suman las dos reacciones resulta lo siguiente:



* FOSFORO INORGANICO

Una vez que el átomo de nitrógeno ha sido incorporado al glutamato puede ser transferido a otros compuestos mediante la acción de las transaminasas, que intercambian un grupo "amino" de un compuesto orgánico por el grupo "ceto" de otro.

En las reacciones de transaminación participa la enzima "piridoxal fosfato", que activa el grupo "amino" de tal manera que puede ser transportado fácilmente.

La "glutamina sintetasa" está presente tanto en la forma activa como en la inactiva, esto es consecuencia de la unión del residuo de adenina procedente de ATP a la molécula. Al proceso se le conoce como **ADENILACION**.

La adenilación de la "glutamina sintetasa" es favorecida por altas concentraciones de amoníaco, dando lugar a la inactivación de la enzima. Sin embargo, puesto que la "glutamato deshidrogenasa" funciona cuando las concentraciones de amoníaco son altas, la asimilación de este último cambia la vía de la glutamina a la del glutamato. Cuando disminuyen las concentraciones de amoníaco, la "glutamina sintetasa" se desadeniliza y vuelve a ser activa.

1.5 Fuentes de Nitrógeno

Las fuentes más importantes de residuos nitrogenados corresponden a los sectores de la industria química que fabrican y utilizan compuestos de nitrógeno y a las fuentes biológicas, tales como residuos humanos, animales y de industrias procesadoras de alimentos.

Al considerar los residuos nitrogenados procedentes de la industria química, se debe recordar que, así como la mayoría de los productos químicos industriales, los compuestos de nitrógeno son valiosos y no se deben desperdiciar. Sin embargo, las concentraciones tan bajas que resulte no económico o impracticable recuperar los materiales de las corrientes del proceso por operaciones químicas normales, si pueden ser todavía **suficientemente** altas en términos biológicos para causar contaminación.

El amoníaco y el ácido nítrico son productos químicos industriales clave y la industria de los fertilizantes en particular, implica la fabricación del amoníaco, ácido nítrico, nitrato de amonio, sulfato de amonio y urea. Es posible que todos ellos entren a las corrientes de aguas residuales como resultado de derrames, lavado de recipientes y la descarga de los depuradores.

La industria de explosivos fabrica también nitrato de amonio y utiliza el ácido nítrico como principal reactivo para la nitración de diferentes materiales, tales como desperdicios del algodón para la nitrocelulosa, tolueno para Tri Nitro Tolueno (TNT) y glicerina para la nitroglicerina. El ácido nítrico también se usa en las industrias de acabados de metales para su limpieza y desincrustación y en la manufactura del plaguicida inorgánico arseniato de plomo. Así mismo, el proceso de carbonización del carbón, en el que se obtiene el coque, es una fuente importante de aguas residuales que contienen amoníaco.

El coque se utiliza para producir el acero, en la carbonización se produce amoníaco y un número valioso de materiales orgánicos. Con el creciente costo y final agotamiento de los suministros de petróleo y gas natural, es probable que una porción significativa de la industria química volverá a tener su base en el carbón como fuente de materias primas así como de energía. Con el uso del carbón como materia prima orgánica se implica una carbonización, por lo que se presume que una fuente ya de por sí grande de aguas residuales nitrogenadas, resulte aún más significativa en el futuro.

El proceso "Solvay" para fabricar carbonato de sodio, es un proceso clave que utiliza amoníaco como un reactivo intermedio, con lo que se crea una corriente de aguas residuales nitrogenadas. Entre otras fuentes de residuos amoniacales se encuentran las plantas de refrigeración que utilizan amoníaco como un líquido termodinámico, así como algunas industrias y plantas para la producción de fibras sintéticas que utilizan amoníaco en las operaciones de lavado y limpieza; se ha empleado el hidróxido de amonio en la neutralización de aguas residuales industriales ácidas

Entre las principales fuentes de nitrógeno orgánico se encuentran las aguas residuales domésticas, las suspensiones de origen animal provenientes de las operaciones intensivas de cultivo y los residuos de alto contenido de proteínas procedentes de ciertas operaciones de procesamiento de alimentos.

El nitrógeno orgánico se convierte en amoníaco por acción de los microorganismos heterótrofos, de manera que gran parte del nitrógeno orgánico se descompone en amoníaco mucho antes de llegar al punto de disposición o a la planta de tratamiento y, según Culp, Wesner y Culp (1978), el 90% del contenido de nitrógeno de las aguas residuales domésticas primarias está por lo general bajo la forma de amoníaco o compuestos de los cuales se forma fácilmente el amoníaco. Las aguas residuales domésticas son débiles comparadas con las aguas residuales de las industrias biológicas como resultado de su dilución con las aguas procedentes de baños, descargas de los servicios sanitarios, etc.

Las aguas negras domésticas contienen usualmente 35 mg/l de nitrógeno en forma de amoníaco y una DBO_5 de aproximadamente 200 a 350 mg/l. Estos valores se pueden usar para ilustrar las altas demandas de oxígeno ejercidas para la nitrificación del amoníaco. El efecto de dilución tiene lugar en un grado mucho menor, en la recolección de suspensiones de origen animal y los problemas de tratamiento de residuos procedentes de operaciones intensivas de cultivo son el resultado tanto de su concentración global, como de su contenido de nitrógeno.

Las plantas procesadoras de leche son también fuentes de aguas residuales nitrogenadas.

1.6 Fijación de Nitrógeno

La contaminación nitrogenada de las corrientes de agua proviene también de fuentes naturales y adventicias. Una enorme cantidad de nitrógeno del aire se convierte en compuestos de nitrógeno por medios naturales. Este proceso llamado **FIJACION DE NITROGENO** ocurre por medios naturales y es aproximadamente el doble de la realizada por la industria química.

La mayor parte de la fijación natural de nitrógeno se efectúa por ciertos tipos de microorganismos a pesar de que casi 15% se ha atribuido a las descargas eléctricas.

Lindberg, T, y Granhall U. (1984) identificaron a *Enterobacter agglomerans* y *Bacillus polymyxa* como bacterias fijadoras de dinitrógeno $N_2(C_2H_2)$ en la rizósfera de varios tipos de cereales y zacates forrajeros en Suecia.

Los organismos capaces de fijar el nitrógeno despiertan actualmente gran interés, ya que es posible que utilizando las técnicas de la ingeniería genética, se podrá conferir la capacidad de fijar el nitrógeno a diversos tipos de microorganismos. No obstante, considerada desde el punto de vista de la contaminación, la fijación de nitrógeno proporciona una fuente de contaminantes nitrogenados potenciales.

Los compuestos de nitrógeno se abren paso hasta las corrientes de agua al ser liberados de la vegetación en descomposición y de excrementos de aves y animales, así como de un modo adventicio como resultado de la actividad humana. Esto incluye la lixiviación de los fertilizantes de los terrenos dedicados a la agricultura, y en precipitaciones pluviales y el polvo.

El nitrógeno presente en el polvo, y precipitado durante la lluvia, proviene del uso de fertilizantes sintéticos en la agricultura y de la quema de combustibles fósiles.

La fijación de nitrógeno por anaerobios facultativos se restringe a ciertos miembros de la familia Enterobacteriaceae, los cuales son capaces de crecer en un gran número de ambientes acuáticos y terrestres. La fijación de nitrógeno por *Klebsiella* se ha establecido en asociación con hongos en fase de decaimiento (Aho y col, 1974) y en agua y sedimentos marinos (Werner, Evans y Sfidler, 1974).

La utilización del gas nitrógeno (N_2) como fuente de nitrógeno se denomina fijación de nitrógeno y es una propiedad que poseen sólo algunas bacterias y cianobacterias, entre las especies capaces de llevar a cabo esta función se encuentran: *Azotobacter* sp., *Mycobacterium flavum*, *Klebsiella* sp., *Spirillum lipoferum*, *Beijerinckia* y *Bacillus polymyxa*. En este proceso, el nitrógeno es reducido a amonio, que posteriormente es convertido a la forma orgánica.

Una amplia variedad de bacterias es capaz de fijar el nitrógeno, y allí se incluyen organismos tanto anaeróbicos como aeróbicos, así como ciertas algas fotosintéticas verde azules (Painter, 1977).

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Determinar la posible participación de algunas bacterias de la familia Enterobacteriaceae en el proceso de nitrificación en el tratamiento de las aguas residuales.

3. HIPOTESIS

En el proceso de nitrificación de las aguas residuales intervienen otras bacterias diferentes a las de la familia Nitrobacteriaceae y al igual que éstas tienen relación con el pH y el tiempo de retención del agua en los reactores utilizados durante el proceso aeróbico del tratamiento biológico.

4. ORIGINALIDAD

El presente estudio surge para establecer una relación entre algunas especies de la familia Enterobacteriaceae y el proceso de nitrificación de un agua residual. Este hecho se fundamenta en que existen ciertas enterobacterias con capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, además de que se conocen las rutas metabólicas de asimilación de amoníaco por estos organismos, por lo tanto, al aislar a algunas de estas bacterias de un reactor de nitrificación a escala de laboratorio se buscó establecer si tenían participación directa e importante en el proceso, ya que tanto su tasa de crecimiento como su capacidad de competir por el amonio disponible son mayores en comparación con las nitrobacterias.

5. IMPORTANCIA

Dado que el proceso de nitrificación es considerado como un tratamiento avanzado del agua residual, es importante establecer si otros microorganismos diferentes a las nitrobacterias (*Nitrosomonas* y *Nitrobacter* que son capaces de crecer en un reactor biológico de nitrificación) también tienen participación durante este proceso.

El presente estudio pretende establecer la participación de algunas especies de la familia Enterobacteriaceae durante el proceso de nitrificación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el presente estudio se trazó un plan de trabajo con fechas y frecuencias bien definidas para la realización de los muestreos y análisis, comenzando en mayo de 1994 y concluyendo en septiembre de ese mismo año.

6.1 Equipo Utilizado

Para el aislamiento de los microorganismos se utilizó un reactor de lodos activados de tipo completamente mezclado, con retorno de biomasa y capacidad de 19 litros, al cual se le denominó **REACTOR BIOLÓGICO (RB)**, ya que en él se recibía el agua residual municipal cruda, previamente sedimentada, con un caudal de 19 ml/min y un tiempo de retención hidráulico de 0.69 días, posteriormente el agua efluente pasaba a otros 2 reactores (reactores biológicos para nitrificación), con sistema de aireación y flujo continuo, completamente mezclados y sin retorno de biomasa; uno de ellos con capacidad de 10 litros y un tiempo de retención hidráulico de 1.16 días denominado **REACTOR BIOLÓGICO DE NITRIFICACION 1 (R1)** y el otro, con capacidad de 20 litros y un tiempo de retención hidráulico de 4.63 días identificado como **REACTOR BIOLÓGICO DE NITRIFICACION 2 (R2)**, (Figura No.1).

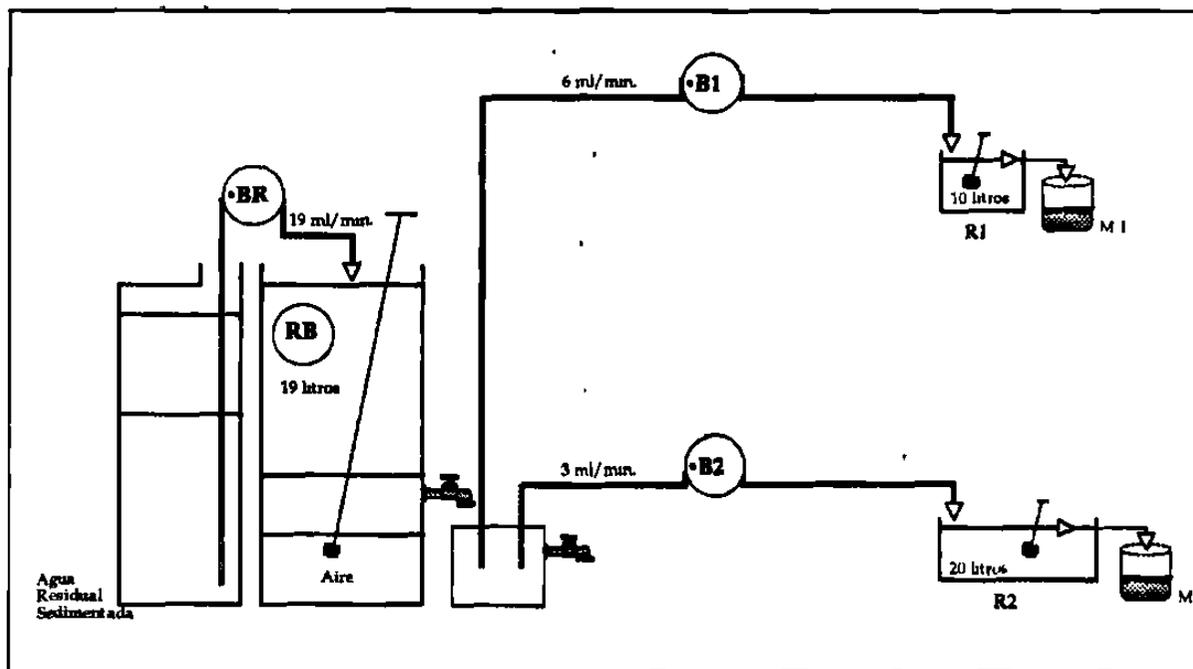


Figura No. 1. Diagrama de flujo de distribución de reactores durante el proceso de nitrificación.

Los reactores se construyeron de vidrio y las uniones fueron pegadas con silicón, además se utilizaron tapones de hule en los orificios de salida de cada reactor a los cuales se adaptó un embudo cuyo cono quedaba hacia el interior y en la salida del mismo se insertó una manguera de látex, la cual por gravedad conducía el agua tratada hacia un recipiente de plástico, en el exterior.

La operación de los reactores fue de flujo continuo, empleando para esto bombas peristálticas marca Cole-Parmer, Instrument Co., Catálogo No. 7545-00 de 30 a 60 rpm. Una bomba de doble cabezal empleada para la alimentación del reactor biológico (RB) y dos bombas de cabezal simple para los reactores R1 y R2 respectivamente.

• Bombas Peristálticas

Para el sistema de agitación se utilizaron motores Dayton, modelo 2Z811, 115 Volts, 48 Amps y 60 Hz a los que se adaptaron paletas de acero inoxidable para operar a una velocidad de 120 rpm. Las paletas fueron recubiertas con barniz marino para evitar la oxidación y se aplicó aire burbujeando al reactor biológico "RB".

El sistema se instaló en un lugar cerrado, manteniendo una temperatura aproximada de 20 °C (Figura No. 2 anexos).

6.2 Fuente de Agua Residual

El agua residual cruda empleada para este estudio se colectó de un registro localizado en la Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad B, de la U.A.N.L., situada en Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., el cual corresponde al colector No. 4 según plano proporcionado por Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey IPD, el cual recibe agua residual doméstica e industrial (Plano anexos).

6.3 Conservación de la Muestra

Las muestras de agua residual cruda se colectaron diariamente en cubetas de plástico de 18 litros de capacidad y se mantuvieron aproximadamente a 4 °C hasta el momento de su utilización (Figura No. 3 anexos).

6.4 Montaje de Reactores

Para la colocación de los reactores se acondicionó un espacio en el que la temperatura pudiera ser controlada aproximadamente en 20 °C, estos se distribuyeron como se observa en la figura No. 1, anterior.

El agua residual cruda, previamente sedimentada y conservada a una temperatura de aproximadamente 4 °C se transfirió al reactor biológico de lodos activados con un gasto de 19 ml/min. Posteriormente el agua pasó a los otros dos reactores biológicos para su nitrificación con un gasto de 6 ml/min para R1 y 3 ml/min para R2.

El agua efluente procedente de cada reactor se obtuvo por decantación en recipientes de plástico y se emplearon para realizar su caracterización fisicoquímica.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Parasitología y en el Departamento de Ecología Pesquera de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

6.5 Parámetros Fisicoquímicos

En cada reactor se analizaron periódicamente, durante 2 meses los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, temperatura, conductividad eléctrica, alcalinidad total, nitrógeno orgánico (N org.), nitrógeno amoniacal (N-NH₃), nitrógeno de nitratos (N-NO₃), nitrógeno de nitritos (N-NO₂), fósforo total, Oxígeno Disuelto (OD), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos Disueltos Totales (SDT), Sólidos Suspendidos Totales (SST), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Volátiles (STV).

6.5.1 Métodos Analíticos Utilizados

PARAMETRO	METODO	CLAVE
Sólidos Totales (ST)	Gravimétrico	208 A* y 2540 C**
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	Gravimétrico	208 D* y 2540 D**
Sólidos Totales Volátiles (STV)	Gravimétrico	208 E* y 2540 E**
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	Gravimétrico	208 E* y 2540 E**
Sólidos Disueltos Totales (SDT)	Gravimétrico	208 C* y 2540 E**
Conductividad eléctrica (C.E.)	Instrumental (Conductimétrico)	205* y 2510 B**
pH	Instrumental (Potenciométrico)	424 B* y 4500 B**
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃)	Colorimétrico de Nessler Volumétrico	418 B* y 4500-NH ₃ C** 418 D* y 4500-NH ₃ C**
Nitrógeno orgánico (N-orgánico)	Macro-Kjeldahl	421 D* y 4500-Norg B**
Nitrógeno de nitratos (N-NO ₃)	Reducción con Cadmio	419 C* y 4500-NO ₃ E**
Nitrógeno de nitritos (N-NO ₂)	Colorimétrico	420* y 4500-NO ₂ B**
Fósforo	Colorimétrico (Cloruro estanoso)	425 E* y 4500-P D**
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Reflujo abierto	508* y 5220 B**
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	Método biológico (Diluciones)	507* y 5210 B**
Alcalinidad Total	Volumétrico	403* y 2320 B**

* Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 14th Edition 1975 APHA-AWWA-WPCF

** Métodos Normalizados para análisis de Aguas Potables y Residuales. 1989 APHA-AWWA-WPCF.

6.6 Aislamiento e Identificación de Bacterias

6.6.1 Colecta de Muestras

Las muestras de agua procedentes del reactor biológico y de los reactores biológicos de nitrificación se colectaron en frascos de vidrio estériles de 125 ml, con tapón esmerilado y boca ancha, los cuales fueron sumergidos en el interior de los reactores colectándose aproximadamente 100 ml, trasladándose al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. para su análisis.

6.6.2 Aislamiento de Colonias Bacterianas

De cada muestra se transfirió por triplicado 1 ml a tubos de ensayo conteniendo 5 ml de caldo nutritivo. Se incubaron a 35 °C durante 24 h y posteriormente a partir de éstos, se sembró por estría cruzada en placas Petri conteniendo agar soya tripticasa, agar Mc Conkey y agar EMB respectivamente. Las cajas inoculadas, conteniendo los diferentes medios de cultivo, se incubaron a 35°C durante 24 h.

6.6.3 Identificación de Bacterias Aisladas

Cada colonia distinta desarrollada en los diferentes medios de agar para cultivo (agar soya tripticasa, agar Mc Conkey o agar EMB) se resembró en tubos con agar soya tripticasa inclinado, se incubaron a 35°C por 24 h, y posteriormente se determinó su morfología mediante frotis y tinción de Gram (Cowan y Stell; 1982).

A las cepas que resultaron ser bacilos cortos Gram negativos se les practicó la prueba de citocromo oxidasa y dependiendo de la positividad (oxidasa positiva) o negatividad (oxidasa negativa) de esta prueba se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas; para organismos oxidasa positivos: motilidad, oxidación-fermentación de la glucosa y maltosa, hidrólisis de la gelatina y del almidón, reducción de nitratos-nitritos-nitrógeno (gas), producción de pigmento, ácido sulfhídrico, indol, acetil-metil-carbinol, crecimiento a 4 y 42°C, utilización de citrato como única fuente de carbono, descarboxilación de la ornitina, hidrólisis de la urea y acción sobre carbohidratos (glucosa, maltosa, manitol, sacarosa y lactosa).

Para los organismos oxidasa negativos se efectuaron las siguientes pruebas: motilidad, rojo de metilo, producción de indol, acetil-metil-carbinol y ácido sulfhídrico, utilización de citratos como única fuente de carbono, hidrólisis de la urea, descarboxilación de la lisina y ornitina, acción sobre la glucosa, lactosa y sacarosa y oxidación-fermentación de la glucosa (Figura No. 4 anexos).

La identificación de los microorganismos se realizó aplicando los resultados de las pruebas anteriores en cuadros específicos (Edwards y Ewing, 1972; Finegold y Martin, 1982; Krieger y Holt, 1984). Identificando a *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter agglomerans*.

6.7 Comportamiento de las Bacterias Aisladas sobre Diferentes Fuentes de Nitrógeno

Para evaluar si las bacterias aisladas eran capaces de oxidar el NO_2 o el NH_3 se inocularon en medios de cultivo sintéticos, que contenían concentraciones conocidas de NO_2 y NH_3 respectivamente.

6.7.1 Composición Química de los Medios Empleados para Evaluar la Posible Oxidación de NO₂ y NH₃

MEDIO "A" (N-NO₂)

Na H ₂ PO ₄	13.5 g	CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.18 g
KH ₂ PO ₄	0.7 g	FeCl ₃ • 6H ₂ O	0.014 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.1 g	H ₂ O (DESTILADA)	1000 ml
NaHCO ₃	0.5 g		

Antes de esterilizar se agregó nitrito de sodio (NaNO₂) para tener una concentración final de 0.5 g/1000 ml (70 mg/l de N-NO₂) (Si se tiene el pH adecuado).

MEDIO "B" (N-NH₃)

Na H ₂ PO ₄	13.5 g	CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.18 g
KH ₂ PO ₄	0.7 g	FeCl ₃ • 6H ₂ O	0.014 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.1 g	H ₂ O (DESTILADA)	1000 ml
NaHCO ₃	0.5 g		

A este medio se le agregó después de la esterilización sulfato de amonio esterilizado previamente por filtración para tener una concentración final de 0.05% (72.1 mg/l de N-NH₃) (Si se tiene el pH adecuado).

6.7.2 Bacterias Utilizadas

Se ensayó experimentalmente con las tres bacterias aisladas de los diferentes reactores en forma individual y con la mezcla de éstas (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter agglomerans*.)

6.7.3 Preparación del Inóculo

Para conocer el número de unidades formadoras de colonias (UFC) con las que fueron inoculados los medios de cultivo se partió del mismo inóculo el cual se preparó en solución “buffer” de fosfatos pH 7.2 y se ajustó a una turbidez equivalente al tubo No. 1 del Nefelómetro de Macfarland (Kolmer y Boerner, 1948). Posteriormente se realizó la cuenta bacteriana mediante siembra de diluciones decimales en agar soya tripticasa, utilizando el método de cuenta viable por difusión en placa.

Por estadísticas descriptivas se determinó el intervalo de confianza del 95% para la media de la población, partiendo de 10 repeticiones de la técnica de cuenta viable en placa, para encontrar el porcentaje de la muestra que se desvía de la media que resultó con un coeficiente de variación de aproximadamente $\pm 13\%$ y con esto evaluar el error en las subsecuentes determinaciones (Anexos).

6.7.4 Comportamiento de las Bacterias en los Medios de Cultivo Utilizados

Para cada una de las tres bacterias estudiadas y para una mezcla de éstas se inocularon dos matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo cada uno 150 ml de medio de cultivo correspondiente (medio A con N-NO₂ o medio B con N-NH₃). Además se utilizó un matraz con cada medio sin inocular como control, siendo un total de 10 matraces.

A cada matraz se transfirió 1 ml del inóculo previamente preparado (6.7.3); se incubaron a 28 ± 2 °C durante 15 días con burbujeo de aire que fue esterilizado por filtración. Los matraces considerados como control no fueron inoculados y se incubaron en las mismas condiciones (figura 5, anexos).

Para la mezcla de cultivos se utilizaron 0.33 ml de cada uno de los inóculos mencionados anteriormente, con lo que se obtuvo una mezcla equivalente en cuanto a volumen, más no así en cuanto al número de microorganismos adicionados de cada inóculo.

En todos los matraces, con intervalos de 5 días se substrajeron submuestras de cada matraz en condiciones asépticas para determinar las concentraciones de N-NO₂, N-NO₃ y N-NH₃; finalmente a los 15 días se realizaron cuentas de bacterias por el método de difusión en placa.

6.7.4.1 Determinación Cualitativa de N-NH₃

Se transfirieron 3 gotas del cultivo a una placa de toque y se mezclaron con un volumen equivalente de solución reactiva de Nessler, la presencia de N-NH₃ se detectó por cambio de color naranja a amarillo (anexos).

6.7.4.2 Determinación Cualitativa de N-NO₂

A 0.5 ml del cultivo se agregaron 6 gotas de un reactivo preparado con volúmenes iguales de solución A (0.02 g de α naftil amina en 100 ml de HCl 1.5 N) y solución B (1 g de ácido sulfanílico en 100 ml de HCl 1.5 N), una coloración roja indica la presencia de nitritos (anexos).

6.7.4.3 Determinación Cualitativa de N-NO₃

A los tubos en donde se realizó la prueba de nitritos (6.7.4.2) y cuyo resultado fue negativo se les agregó 0.1 g de polvo de zinc. Una coloración roja indica la presencia de nitratos (anexos).

6.7.4.4 Determinación Cuantitativa de los Diferentes Compuestos de Nitrógeno

La determinación cuantitativa de los diferentes compuestos de nitrógeno en los medios de cultivo A y B se realizó en base a los “Métodos Estándares” para análisis de agua y agua residual (cuadro 6.5.1).

Determinación titulométrica de N-NH₃

Determinación de N-NO₂ por el método colorimétrico

Determinación de N-NO₃ por el método de reducción de cadmio.

6.7.4.5 Cuenta de Bacterias en los Cultivos Realizados con los Medios A y B, al Final del Período de Incubación

Al momento de inocular los matraces con los medios de cultivo A y B, y también después de incubar a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un total de 15 días, se realizaron nuevas cuentas en placa utilizando diluciones decimales de cada cultivo y se procedió igual que cuando se preparó el inóculo.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

La tabla 1 nos muestra la caracterización fisicoquímica del agua residual municipal cruda sin sedimentar, durante el período de estudio.

	Jul 20	Jul 29	Ago 5	Ago 12	Ago 21	Ago 31	Sept 9	Sept 16	Sept 24
pH	7,3	7,4	7,3	7,3	7,1	7,0	7,1	7,3	7,3
C.E. μ mhos/cm	945	870	910	880	940	1075	910	960	860
SDT mg/l.	630	790	610	590	650	720	610	640	580
Temp. $^{\circ}$ C	29	29	29	29	29	29	29	29	29
Alc. tot mg/l.	404	340	450	320	327	330	340	332	320
N-NH ₃ mg/l.	21,8	19	19,7	24,2	15,2	19	21	19,4	20,4
N-org. mg/l.	8,96	14	12,3	10,5	17,3	12,3	11,2	10,5	13,2
N-NO ₂ mg/l.	0,07	0,12	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
N-NO ₃ mg/l.	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	2	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
P total mg/l.	7,2	4,9	6,7	8,4	7,5	9,8	8,2	9,8	9,5
DBO ₅ mg/l.	260	240	280	340	190	240	350	200	175
DQO mg/l.	390	430	606	673	770	610	530	420	460
SST mg/l.	160	184	164	160	175	203	290	180	150
ST mg/l.	774	980	773	878	1117	1070	920	850	720
SSV mg/l.	128	158	95	80	125	240	200	150	90
STV mg/l.	340	530	225	290	260	485	310	350	230
OD mg/l.	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

Tabla No. 1. Caracterización del agua residual cruda en las diferentes fechas del muestreo.

SIMBOLOGIA:

pH potencial de Hidrógeno
 C.E. Conductividad Eléctrica
 N-NH₃ Nitrógeno amoniacal
 N-NO₂ Nitrógeno de nitritos
 N-NO₃ Nitrógeno de nitratos
 DQO Demanda Química de Oxígeno
 ST Sólidos Totales
 STV Sólidos Totales Volátiles

S.D.T.
 T
 N. org
 P. total
 DBO₅
 SST
 SSV
 Alc. total

Sólidos Disueltos Totales
 Temperatura
 Nitrógeno orgánico
 Fósforo total
 Demanda Bioquímica de Oxígeno
 Sólidos Suspendidos Totales
 Sólidos Suspendidos Volátiles
 Alcalinidad total.

La caracterización fisicoquímica promedio de 15 muestras de agua residual efluente, sin sedimentar procedentes del reactor biológico y de los dos reactores de nitrificación, se presenta en la tabla 2.

PARAMETROS	REACTOR BIOLÓGICO Gasto = 19 ml/min	REACTOR 1 Gasto = 6 ml/min	REACTOR 2 Gasto = 3 ml/min
θ_h (días)	0.69	1.6	4.63
TEMPERATURA °C	19	19	19
CONDUCTIVIDAD (μ mhos/cm)	900	770	820
pH	7.5	7.2	7.4
ALC. TOTAL (mg/l) como CaCO_3	322	170	118
N-orgánico (mg/l)	3.5	3.9	2.3
N-NH ₃ (mg/l)	25.2	6.1	0.35
N-NO ₂ (mg/l)	0.05	11.4	9.7
N-NO ₃ (mg/l)	1.7	8.7	18
P-TOTAL (mg/l)	6.9	4.8	5.5
DBO ₅ (mg/l)	67.5	3.0	3.4
DQO (mg/l)	190	85	54
SDT (mg/l)	600	520	550
SST (mg/l)	135	122	200
ST (mg/l)	740	670	755
SSV (mg/l)	70	3	3.6
STV (mg/l)	225	210	275

Tabla No. 2. Características fisicoquímicas promedio de 15 muestras de agua residual efluente procedente del reactor biológico (RB) y de los reactores de nitrificación (R1 y R2).

SIMBOLOGIA:

N- NH₃ = Nitrogeno amoniacal
 N-NO₂ = Nitrogeno de Nitritos
 N-NO₃ = Nitrogeno de Nitratos
 N-org. = Nitrogeno Orgánico
 DBO₅ = Demanda Bioquímica de Oxígeno

DQO = Demanda Química De Oxígeno
 SSV = Sólidos Suspendedos Volátiles
 SST = Sólidos Suspendedos Totales
 SDT = Sólidos Disueltos Totales
 ST = Sólidos Totales
 STV = Sólidos Totales Volátiles

En la tabla 3 se presentan las enterobacterias aisladas en los diferentes reactores:

FUENTE	BACTERIAS AISLADAS
R B	<i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Citrobacter freundii</i> y <i>Escherichia coli</i>
R 1	<i>Enterobacter agglomerans</i> y <i>Escherichia coli</i>
R 2	<i>Escherichia coli</i>

Tabla No. 3. Bacterias aisladas de agua residual procedentes del reactor biológico (RB) y de los reactores de nitrificación (R1 y R2).

La tabla 4 presenta las cuentas bacterianas obtenidas en cultivos agitados por aireación al inicio de las pruebas y después de 15 días de incubación, a 28 ± 2 °C, cuando se utilizaron dos medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno (gráficas 1, 2, 3 y 4 en anexos).

Se observa al final del período de incubación, que las cuentas de bacterias obtenidas cuando se utilizó el medio "B" (a base de N-NH₃) fueron mayores que las correspondientes al medio "A" (a base de N-NO₂), lo que indica que las bacterias utilizaron el amoníaco como única fuente de nitrógeno; sin embargo, cuando se utilizó el medio "A", las cuentas bacterianas fueron inferiores para *E. coli* y para la MEZCLA, lo que indica que cuando la fuente de nitrógeno es el nitrito no lo emplearon ampliamente o bien, éste puede incluso ser tóxico para ciertas bacterias (R.C. Charley, D.G. Hooper y A.G. McLee; 1980). Por ser mayor de 20.0 mg/l de NO₂ como N.

Asimismo, es importante mencionar que *E. coli* fue la bacteria cuyo crecimiento resultó favorecido por el NH₃ como fuente de nitrógeno y además, como se observa en la tabla 3, esta bacteria se aisló en los tres reactores biológicos que conformaron este estudio.

MICROORGANISMO	CUENTA INICIAL MEDIOS A Y B (TIEMPO CERO)* (UFC/ml)	CUENTAS FINALES EN LOS MEDIOS A LOS 15 DÍAS (UFC/ml) y rel. C.F./c.i			
		c.i.	MEDIO "A"	CF/c.l	MEDIO "B"
<i>E. Coli</i>	95,000	20,000	0.21	300,000,000	3158
<i>E. agglomerans</i>	140	5,000	35.7	30,000	214
<i>C. freundii</i>	8*	1,000	125	2,500	312
MEZCLA	30,000	2,000	0.07	650,000	21.7
CONTROL	0	0	-	0	-

(gráficas 1,2,3 y 4 en anexos)

* Menor de 20 UFC/ml placa

Tabla No. 4. Cuentas bacterianas iniciales y finales obtenidas en cultivos agitados por aireación antes y después de ser incubados a $28 \pm 2^\circ$ C durante 15 días, utilizando medios de cultivo con diferente fuente de nitrógeno.

El número de microorganismos presentes, después de 15 días de incubación con aireación en los medios "A" y "B", fue mayor para el medio, con NH₃. Los valores más altos de la cuenta viable en placa correspondieron a *Escherichia coli*, mientras que *E. agglomerans* registró el menor crecimiento de colonias.

E. coli fue el microorganismo con la mayor tasa de crecimiento, lo cual se confirma, ya que esta bacteria estuvo presente en todos los reactores biológicos durante la primera etapa del estudio.

Se determinó la concentración de nitrógeno en sus diferentes formas (NH_3 , NO_2 y NO_3) con intervalos de 5 días a partir de la inoculación, encontrándose que en el medio "B" (a base de sulfato de amonio) la concentración de NH_3 sufrió una ligera disminución; por otro lado en el medio "A" (a base de nitrito de sodio) una pequeña cantidad de NO_2 se oxidó a NO_3 .

La tabla 5 presenta los valores de nitrógeno de NO_2 y NO_3 determinados con intervalos de 5 días en los matraces con medio "A" (a base de NO_2), inoculados con bacterias aisladas del agua residual de los diferentes reactores (RB, R1 y R2), encontrándose que para nitritos la oxidación obtenida fue mínima al término de 15 días. Si se observa la concentración detectada de NO_3 en este tiempo se puede presumir que es equivalente al nitrito oxidado.

MEDIO DE CULTIVO "A"	CONCENTRACION DE N-NO ₂ (mg/l)				CONCENTRACION DE N-NO ₃ (mg/l)				No. UFC FINAL	NO ₂ fijado UFC X 10 ³
	INICIAL	5 DIAS	10 DIAS	15 DIAS	INICIAL	5 DIAS	10 DIAS	15 DIAS		
<i>E. coli</i>	70	69.7	69.2	69	0	0.3	0.8	1	20X10 ³	0.05
<i>E. agglomerans</i>	70	69.8	69.5	69.2	0	0.2	0.5	0.8	5X10 ³	0.16
<i>C. freundii</i>	70	69.7	69.7	69.4	0	0.3	0.3	0.6	1X10 ³	0.60
MEZCLA	70	69.6	68.7	68.0	0	0.4	1.3	2.0	2X10 ³	1.0
CONTROL	70	70	70	70	0	0	0	0	0	0

Tabla No. 5. Oxidación de nitrito (NO_2) a nitrato (NO_3) en el medio "A" por acción de las bacterias aisladas del agua residual procedente los reactores.

En la tabla 6 se presenta la oxidación del amoniaco a nitrato en el medio "B" por acción de bacterias aisladas del agua residual procedente de los diferentes reactores. Al igual que para el nitrito la oxidación del amoniaco a nitrato fue mínima.

MEDIO DE CULTIVO "B"	CONCENTRACION N-NH ₃ (mg/l)				CONCENTRACION DE N-NO ₃ (mg/l)				No. UFC FINAL	NO ₃ final UFCX10 ³
	INICIAL	3 DIAS	10 DIAS	15 DIAS	INICIAL	3 DIAS	10 DIAS	15 DIAS		
<i>E. coli</i>	72.0	71.6	71.2	70.9	0	0.4	0.8	1.1	30000X10 ⁴	0.000004
<i>E. agglomerans</i>	72.0	72.0	71.6	71.4	0	0	0.4	0.6	30X10 ³	0.02
<i>C. freundii</i>	72.0	72.0	71.8	71.7	0	0	0.2	0.3	2.5X10 ³	0.12
MEZCLA	72.0	71.5	71.1	70.9	0	0.5	0.9	1.1	650X10 ³	0.0017
CONTROL	72.0	72.0	72.0	72.0	0	0	0	0	0	0

Tabla No. 6. Oxidación de amoniaco (NH₃) a nitrato (NO₃) en el medio "B" por acción de las bacterias aisladas del agua residual procedente de los reactores.

8. CONCLUSIONES

8.1 La concentración de NH_3 en el medio "B" sufrió una pequeña disminución, lo cual confirma que los microorganismos inoculados en cada matraz con aireación fueron capaces de tomar el NH_3 e incorporarlo a cualquiera de las rutas metabólicas descritas anteriormente (vía de "Glutamato Deshidrogenasa" y la vía de la "Glutamina Sintetasa"), además de efectuar la oxidación de NH_3 a NO_3 en pequeña escala.

8.2 En los matraces con aireación que no fueron inoculados (controles) no se observaron cambios en las concentraciones de NH_3 y NO_2 , las cuales permanecieron constantes durante los 15 días del ensayo, lo que indica que para que ocurra la nitrificación es necesaria la presencia de microorganismos, o bien que existan condiciones diferentes de reacción.

8.3 Al comparar el crecimiento bacteriano entre los medios "A" y "B" se observó que el número de microorganismos fue mayor en el medio "B" (a base de NH_3), esto nos indica que los microorganismos tuvieron una mayor facilidad para asimilar el NH_3 e incorporarlo a su metabolismo, lo cual aparentemente no sucedió en el medio "A" (a base de NO_2) donde el número de microorganismos, o la velocidad de crecimiento de las diferentes especies fue menor (tabla 4 y gráficas 1, 2, 3 y 4 anexos). No obstante, es probable que se haya producido algún efecto inhibitor por la alta concentración inicial de nitritos en el medio "A".

8.4 Al analizar el comportamiento de cada uno de los microorganismos aislados durante el presente estudio (tabla 3) se observa que *E. coli* se desarrolló en todos los reactores biológicos (RB, R1 y R2), *E. agglomerans* creció en el reactor biológico (RB) y en el reactor biológico de nitrificación 1 (R1) y finalmente *C. freundii* solo se aisló del reactor biológico de lodos activados (RB).

8.5 El tiempo de retención hidráulico y la disponibilidad de sustrato afectó directamente a la variedad de enterobacterias, ya que a medida que aumentó el tiempo de retención hidráulico en los tres reactores utilizados ($\theta_{hRB} < \theta_{hR1} < \theta_{hR2}$), disminuyó la cantidad de materia orgánica (DBO_5) y por consiguiente la variedad de enterobacterias presentes. Esto puede explicar por qué en el reactor de nitrificación 2 (R2) sólo se aisló *E. coli*. (Tabla 3).

Con respecto al pH no pudo establecerse una relación con la presencia de enterobacterias en los diferentes reactores, ya que este parámetro no sufrió variaciones significativas durante el período de estudio, manteniéndose en un rango de 7 a 7.5 unidades; además de que no se evaluó el crecimiento de los diferentes microorganismos en condiciones extremas de pH.

8.6 Tanto en el medio "A" (a base de NO_2) como en el medio "B" (a base de NH_3) se observó una ligera oxidación de los compuestos nitrogenados, así como una tendencia de crecimiento en cada uno de los diferentes medios de cultivo para cada microorganismo (Tabla No. 4). Se observó que la población de *E. Coli* disminuyó de 95,000 a 20,000 UFC/ml, lo que equivale a 0.21 veces la cantidad inicial de bacterias en el medio "A", mientras que la población se incrementó hasta unas 3,160 veces en el medio "B", ocurriendo algo similar en los matraces inoculados con la mezcla de los microorganismos ensayados.

8.7 Contrario a lo que ocurrió con *E. coli* y la mezcla de bacterias, cuando se evaluó el comportamiento de *C. freundii* y *E. agglomerans*, se observó que el número de éstos se incrementó en ambos medios. No obstante, es importante mencionar que en general, con el medio "B" se obtuvieron cuentas bacterianas mayores que cuando se empleó el medio "A".

8.8 Al establecer una comparación sobre la capacidad de las diferentes bacterias involucradas en este estudio para crecer y oxidar (nitrificar) los compuestos nitrogenados se observa que se partió de inóculos con diferentes densidades de bacterias en cada cultivo ensayado. No obstante, al relacionar las producciones de nitratos contra las cuentas finales (UFC) de cada matraz con cultivos, se podría inferir que en el medio "A" la mezcla de los géneros de bacterias ensayadas produjeron la mayor proporción de nitrificación, seguida por *C. freundii* (Tabla No. 5), mientras que en el medio "B" la nitrificación fue mayor para *C. freundii* seguida por *E. agglomerans*.

8.9 Las tasas de oxidación tanto de amoníaco (medio "B") como de nitrito (medio "A") realizadas por las enterobacterias que fueron aisladas del reactor biológico y de los reactores de nitrificación 1 y 2, al someterlas a un medio de cultivo sintético fueron relativamente muy pobres. Las concentraciones (UFC/ml) de bacterias utilizadas en este estudio probablemente no representan gran importancia para su consideración como alternativa de nitrificación en el tratamiento de aguas residuales, domésticas o municipales en lugar de las bacterias nitrificantes clásicamente reconocidas.

9. REFERENCIAS

- American Water Works Association. 1968. Agua su Calidad y Tratamiento. Editorial UTEHA, México D.F.: 1-131.
- APHA-AWWA-WPCF. 1975. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater; 14th Edition; New York, N.Y.
- APHA-AWWA-WPCF. 1989. Métodos Normalizados Para el Análisis de Aguas Potables y Residuales; Editorial Díaz de Santos.
- Barnes, G. E. 1967. Tratamiento de Aguas Negras y Desechos Industriales. Manuales UTEHA. Editorial Hispano Americana. 1^a Edición en español.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1989. VOL. 3.
- Blackburn, H. T. y col. 1994. Simulation Model of the Coupling Between Nitrification and Denitrification in a Freshwater Sediment. Applied and Environmental Microbiology; 60(9): 3089 a 3095.
- Brock, T. D. Smith W. D. y Madigan, T.M. 1987. Microbiología. Editorial Prentice Hall. 4^a Edición.
- Charley, R. C., D. G. Hooker y A. G. McLee, 1979. Nitrification Kinetics in Activated Sludge at Various Temperatures and Dissolved Oxygen Concentrations. Water Research, 14: 1387-1396.
- Dahab, M. F. y Y. W. Lu. 1988. Nitrate Removal From Water Supplies Using Biological Denitrification. Journal Water Pollution Control Federal. 60:1670.
- Fair Geyer, 1983. Abastecimiento de Agua y Remoción de Aguas Residuales. Editorial LIMUSA. México. D.F.

- Fritzzsche, C. and Niemann, E. G. 1990. Nitrogen Fixation in Continuous Culture with NH_4Cl -Containing Media; Applied and Environmental Microbiology. 56 (4): 1160 - 1161
- Gomella, Cyril. 1977. Tratamiento de Aguas para Abastecimiento Público; Editores Técnicos. Barcelona: 240.
- Grahame, A. H. 1982. Apparent and Measured Rates of Nitrification in the Hipolimnion of a Mesotrophic Lake. Applied and Environmental Microbiology, 43 (3): 542-547
- Huang, J. M.; O. J. Hao, Y. C. Wu y A. H. Molof. 1989. Nitrification of Activated Sludge Effluent in a Cross - Flow Medium Trickling Filter System. Journal Water Pollution Control Federal. 61: 461.
- Jiménez, C. G. 1994. Sistemas Biológicos. Calidad Ambiental. C.C.A. - I.T.E.S.M. II(1):1-14.
- Lind, Owen T. 1979. Handbook of Common Methods in Limnology. Second Edition; The C.V. Mosby Company.
- Lindberg, T, and Granhall U. 1984. Isolation and Characterization of Dinitrogen-Fixing Bacteria from The Rhizosphere of Temperate Cereals and Forage Grasses; Applied and Environmental Microbiology, 48 (4): 683 - 689.
- Martine, S. O. 1984. Use of Nitrifying Measurements for Describing the Effect of Salinity on Nitrification in the Scheldt Estuary. Applied and Environmental Microbiology, 47 (2): 424-426.
- Metcalf y Eddy. 1985. Ingeniería Sanitaria, Tratamiento, Evaluación y Reutilización de Aguas Residuales.
- Okey, R. W y O. E. Albertson. 1989. Evidence for Oxygen - Limiting Conditions During Tertiary Fixed - Film Nitrification. Journal Water Pollution Control Federal. 61: 510-519.

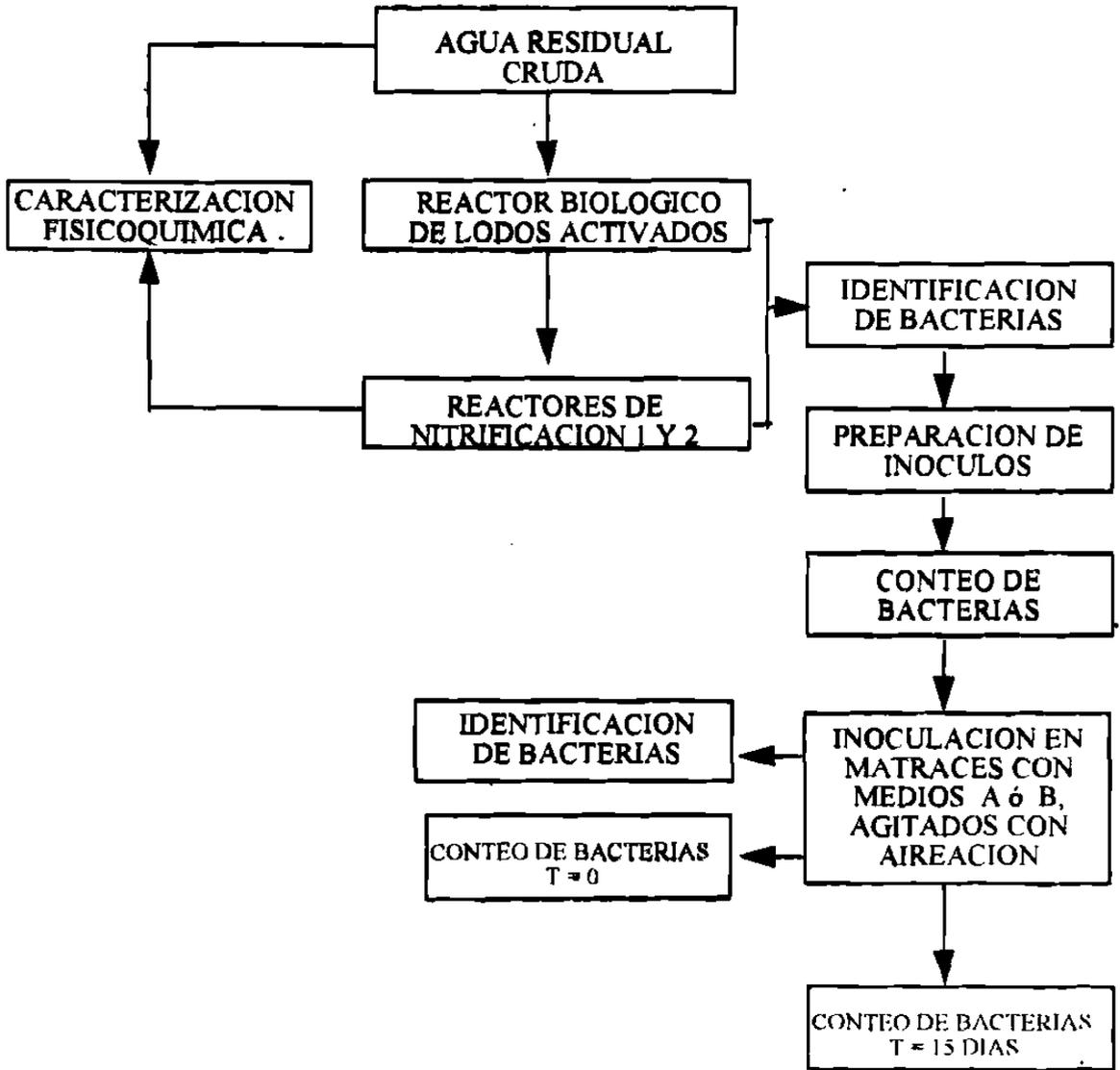
- Okey, R. W y O. E. Albertson. 1989. Diffusion's Role in Regulating Rate and Masking Temperature Effects in Fixed - Film Nitrifications. J. Water Pollution Control Federal. 61: 500-509.
- Oslislo, A. y Z. Lewandowski. 1985. Inhibition of Nitrification in the Packed Bed Reactors by Selected Organic Compounds. Water Research. 19 (14): 423-426.
- Parker, D., M. Lutz, R. Dahl, y S. Benkopf. 1989. Enhancing Reaction Rates in Nitrifying Trickling Filters Through Biofilm Control. Journal Water Pollution Control Federal. 61: 618-631.
- Parker, D. S. y R. Tyler. 1989. Nitrification in trickling filters. Journal Water Pollution Control Federal. 58: 896-902.
- Poduska, M.K. 1980. The Effect of Dissolved Oxygen Concentration on Nitrification. Water Research. 14: 643-649.
- Rivera y Calderón. 1990. Biotratamiento de Aguas Negras. Proyecto de Mejoramiento del Medio Ambiente. Escuela Nacional de Estudios Profesionales. UNAM.
- Rheinheimer, G. 1987. Microbiología de las Aguas; Editorial Acribia, S.A.
- Sawyer, C. N. 1966. Conceptos Básicos de Eutrificación. Journal Water Pollution Control Federal. 38:738.
- Secretaría de Recursos Hidráulicos. S. R. H. 1973. Control de la Contaminación del Agua en la Industria Química. Publicación de la Dirección General de Usos del Agua y Prevención de la Contaminación. Vol. I. No. 5.

- Schimel, J. P.; Firestone, M. K. and Killham, K. S. 1984 Identification of Heterotrophic Nitrification in a Sierran Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 (4): 802 - 806
- Uchino, F.; Hambali, G. G. and Yatazawa, M. 1984. Nitrogen-Fixing Bacteria from Warty Lenticellate Bark of a Mangrove Tree. *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lamk; *Applied and Environmental Microbiology* 47 (1): 44- 48.
- Verhagen, F. J. M.; Duyts, H. and Laanbroek, H. J. 1992 Competition for Ammonium between Nitrifying and Heterotrophic Bacteria in Continuously Percolated Soil Columns. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (10): 3303 - 3311
- Williamson, R. B. y J. G. Cooke. 1985. The Effect of Storms on Nitrification Rates in a Small Storm. *Water Research*. 19 (4): 435-440.
- Winkler, M. 1986. Tratamiento Biológico de Aguas de Desecho. 1ª Edición, Ed. LIMUSA. México.
- Wright, Sara F. & Weaver, R.W. 1981. Enumeration and Identification of Nitrogen-Fixing Bacteria From Forage Grass Roots. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 1.

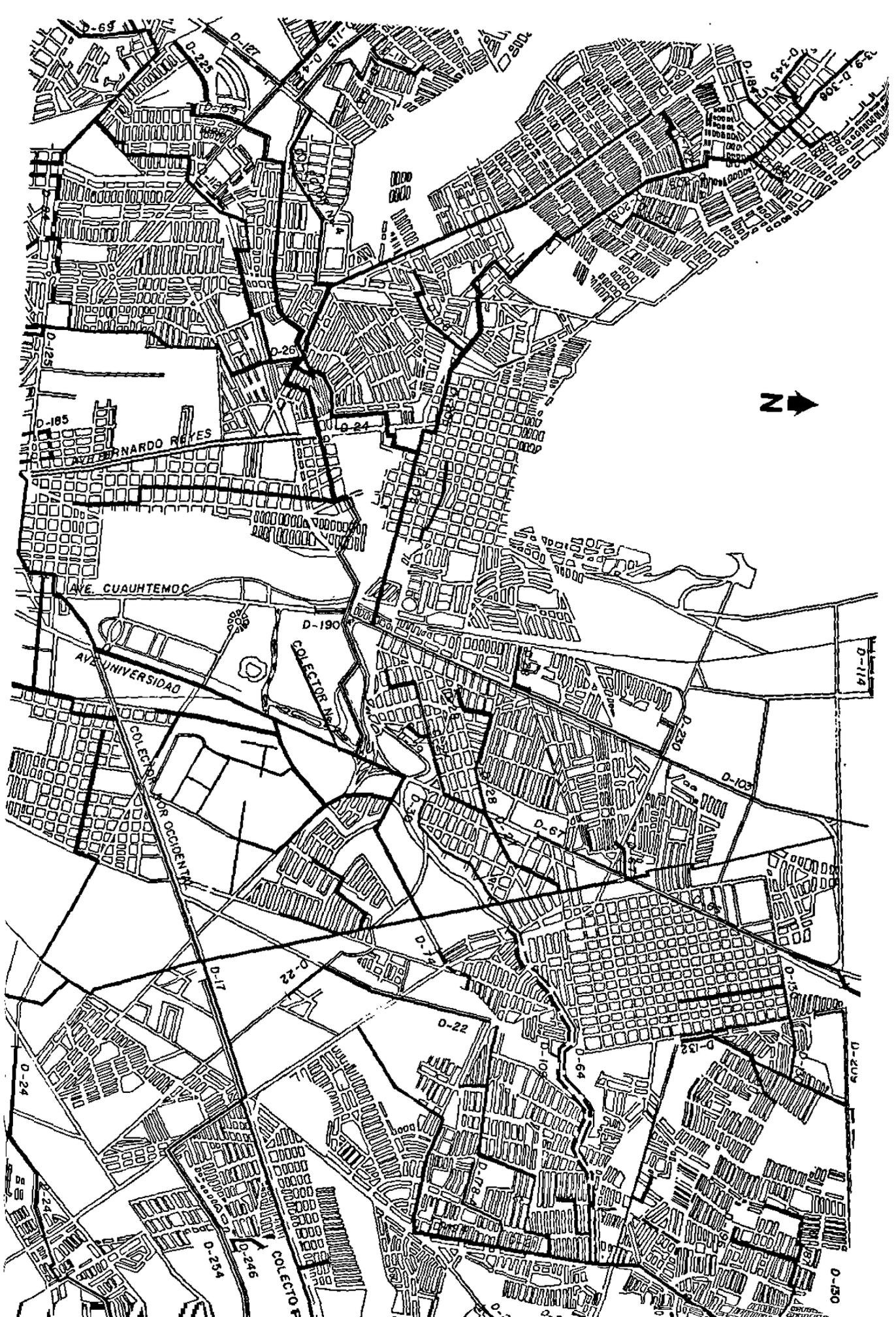
10. Anexos

10.1 Diagrama de Flujo

DIAGRAMA DE FLUJO



10.2 Plano. Ubicación del Colector No. 4.



10.3 Figuras

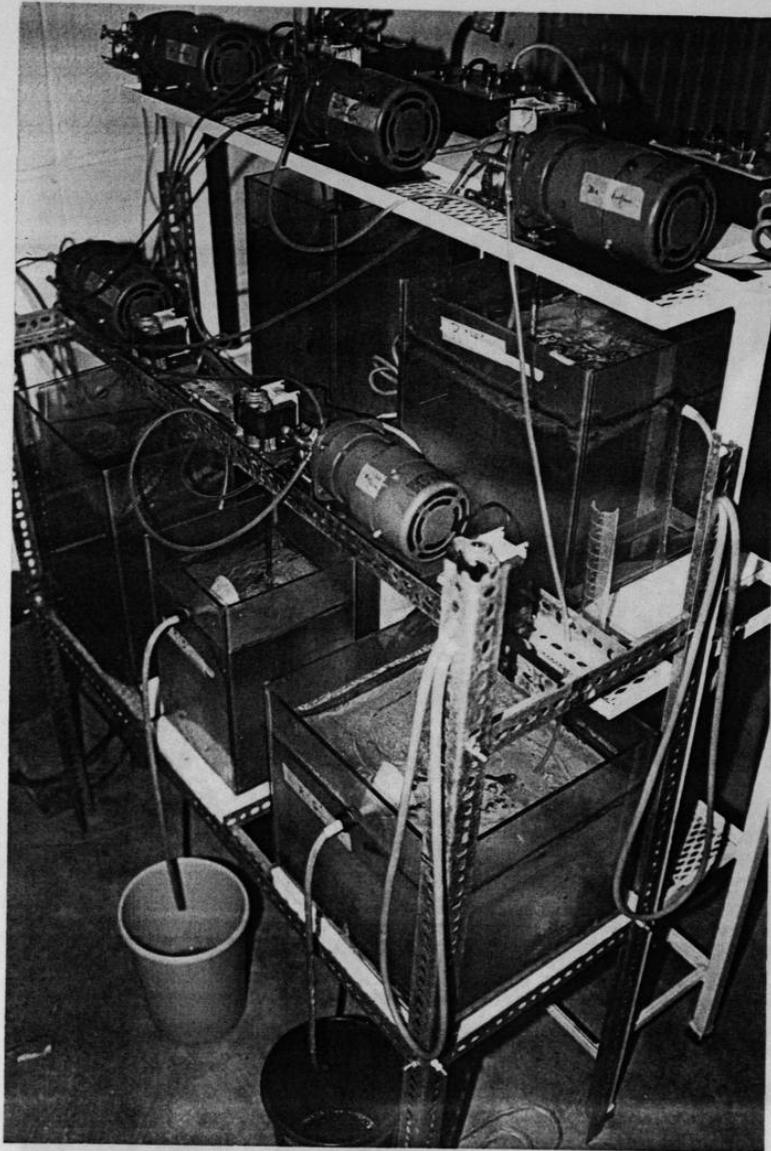


Figura No. 2. Instalación del Sistema.



Figura No. 3. Vista del Colector No. 4.

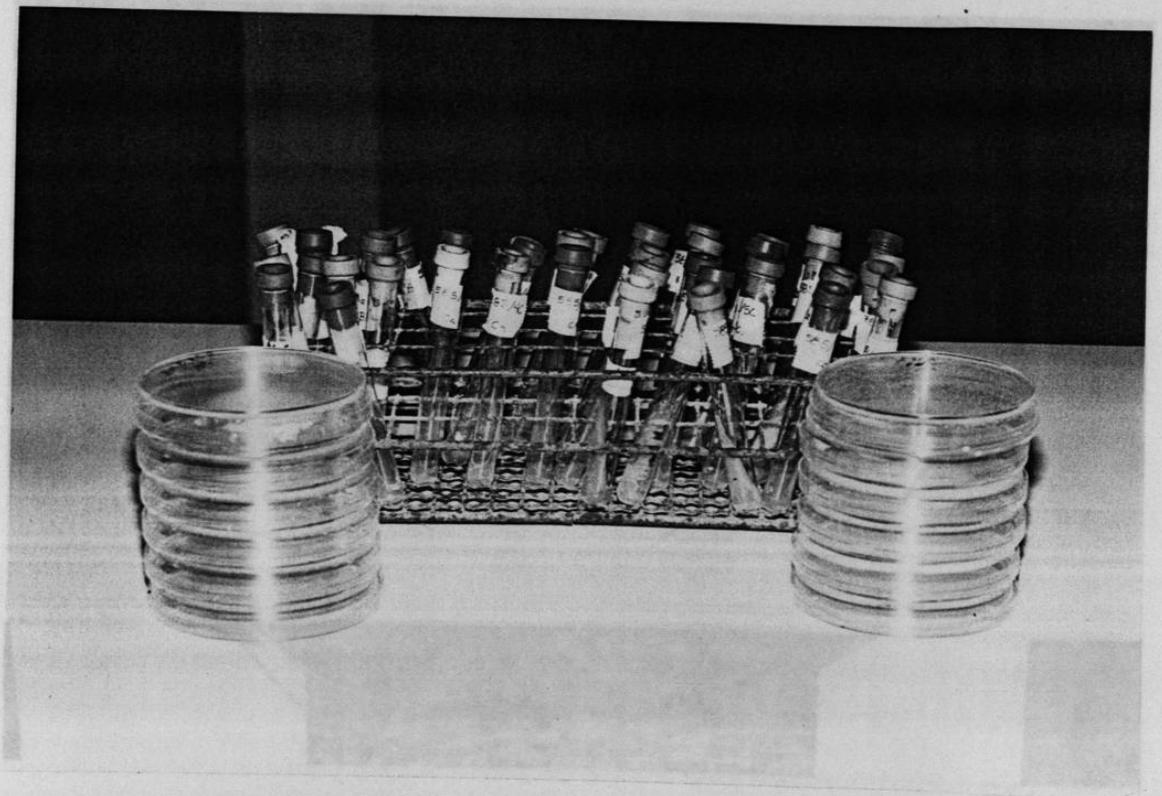


Figura No. 4. Identificación de las Bacterias Aisladas.

los Medios de Cultivos A y B

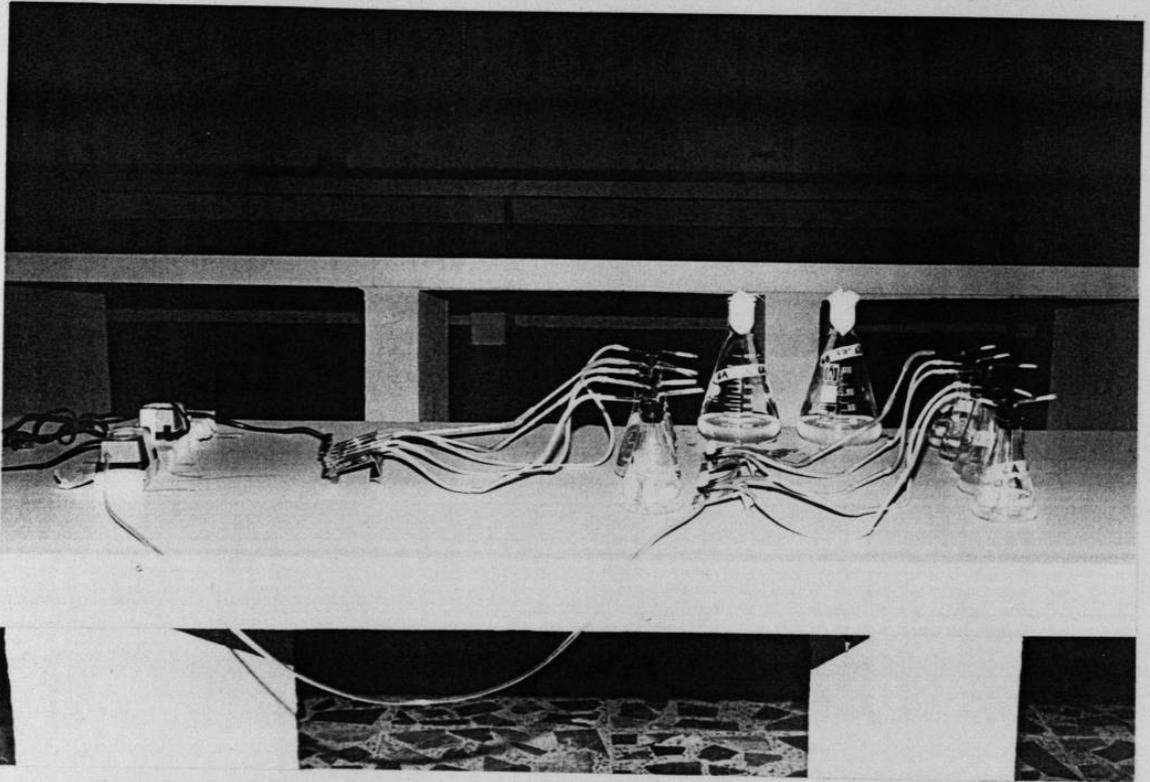
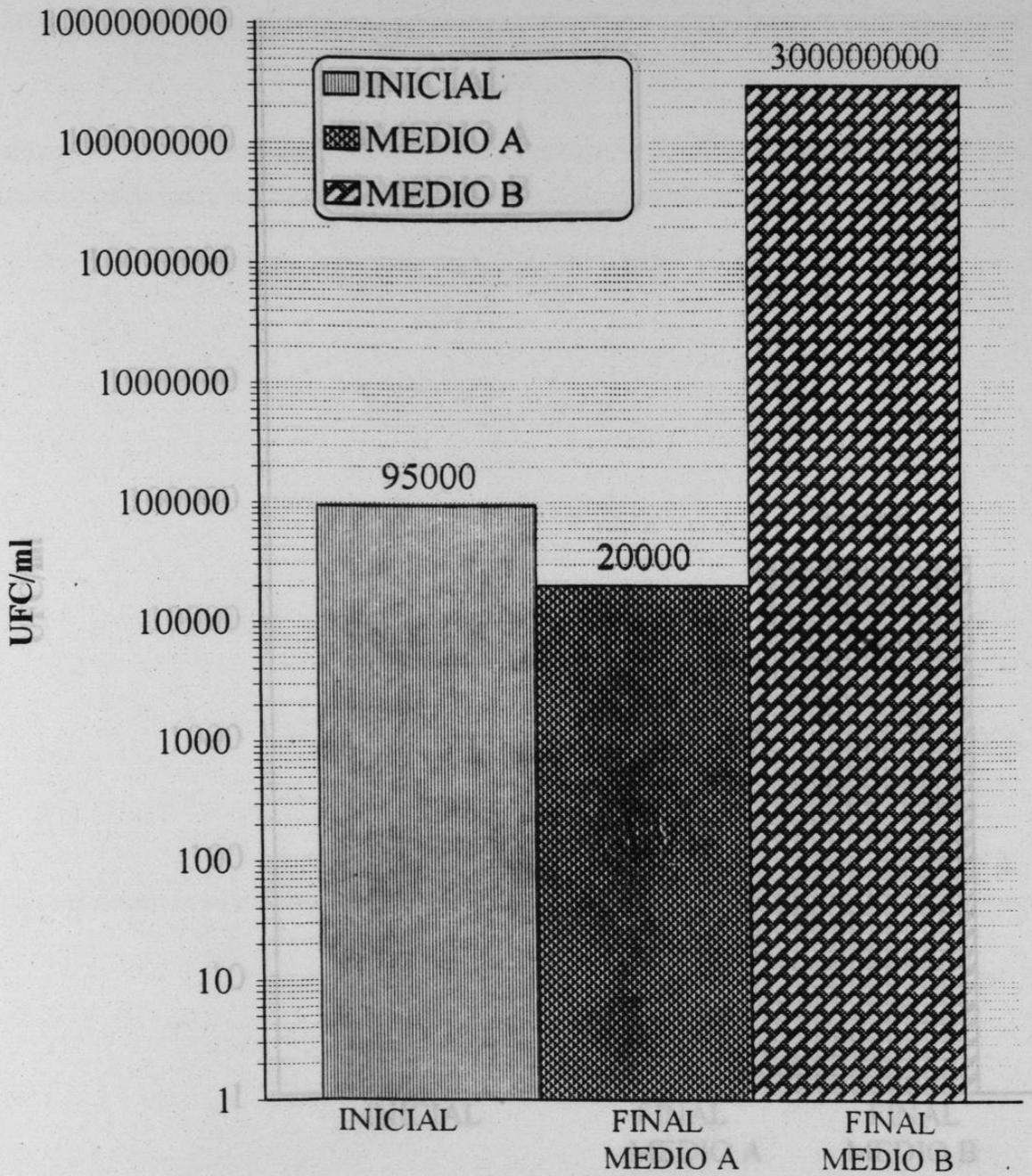
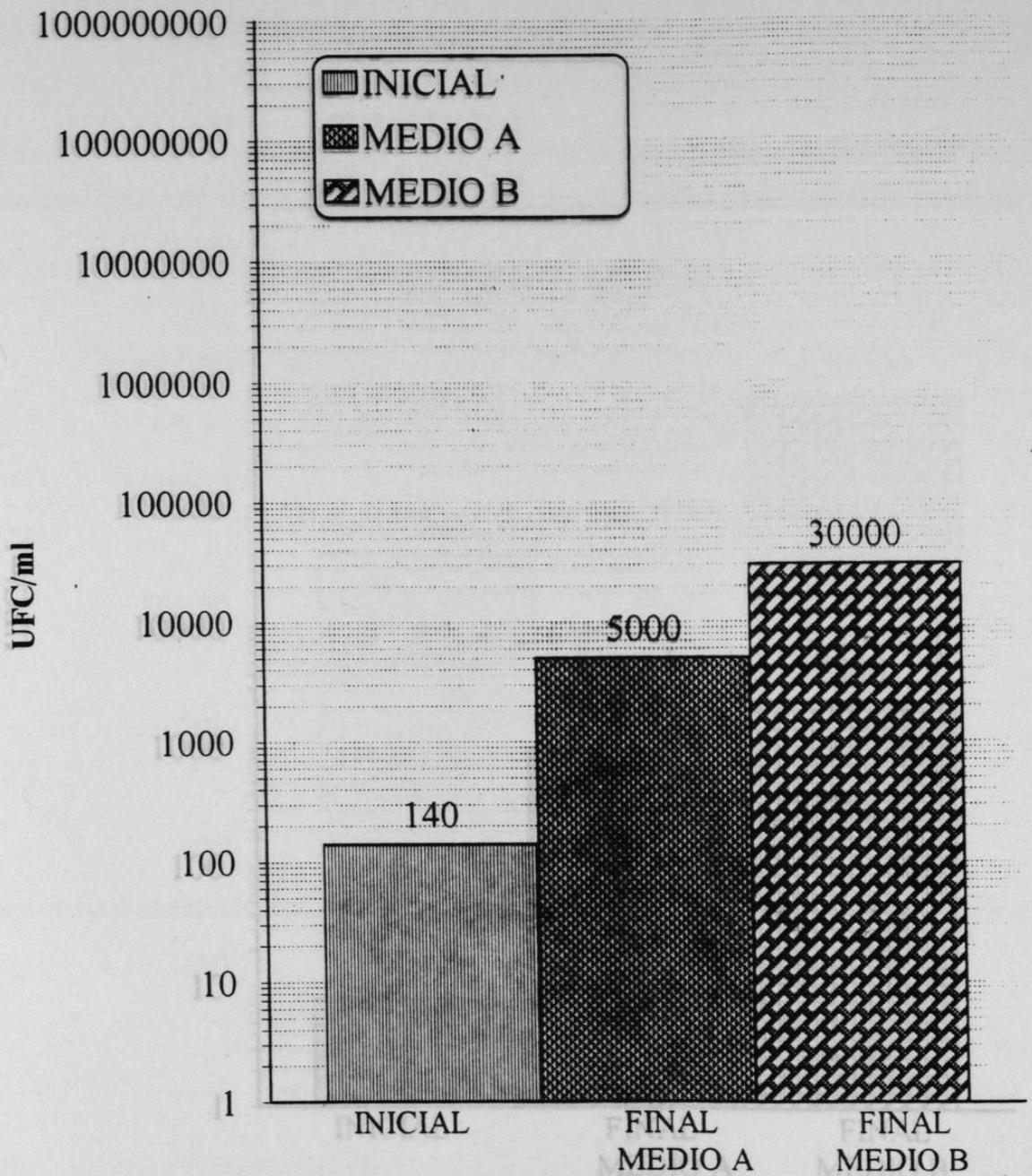


Figura No. 5. Incubación de las Bacterias Aisladas en los Medios de Cultivos A y B.

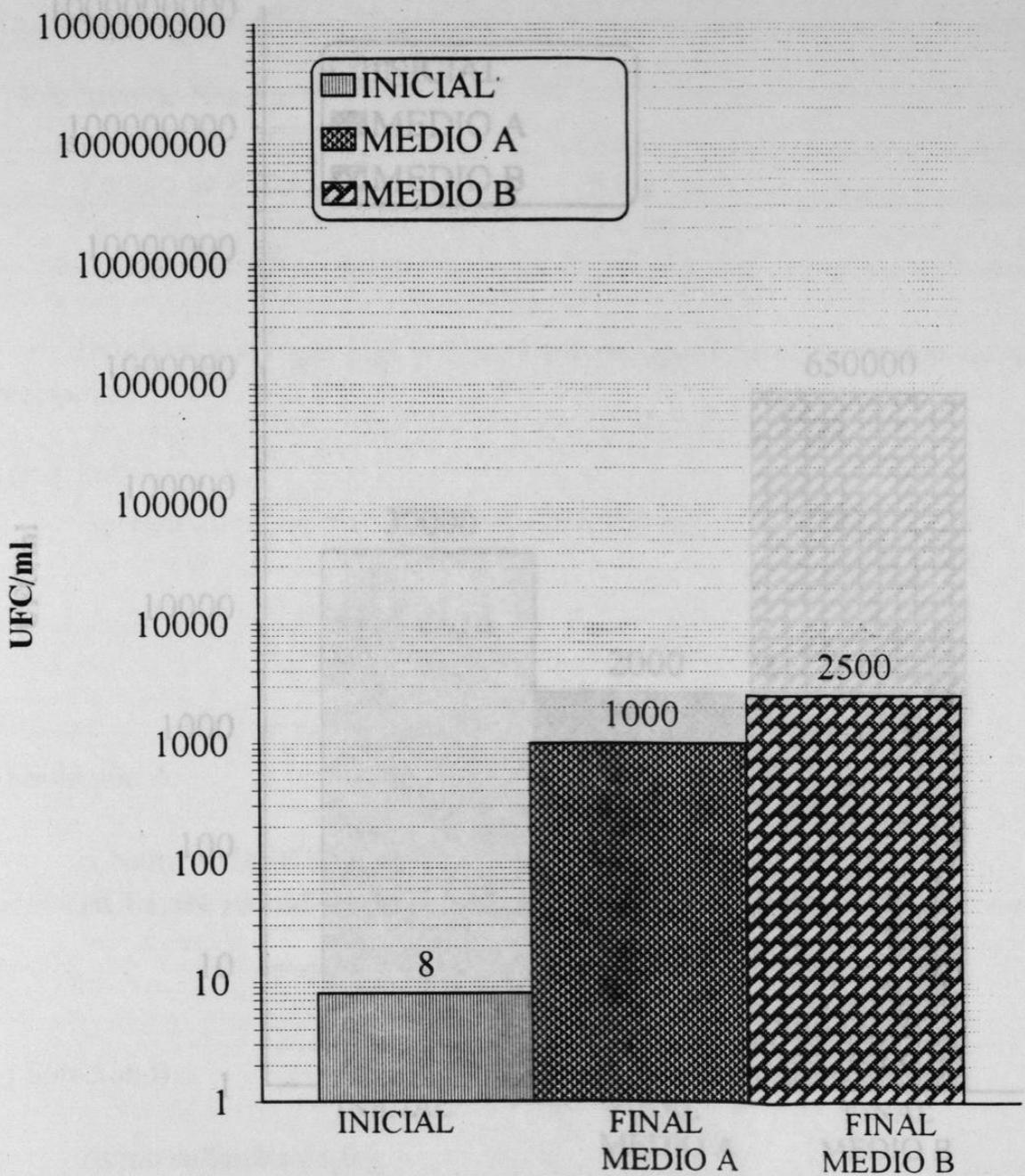
10.4 Gráficas



Gráfica 1. Cuentas bacterianas correspondientes a *E. coli* en los medios A y B, inicio y final del periodo de incubación de 15 días.

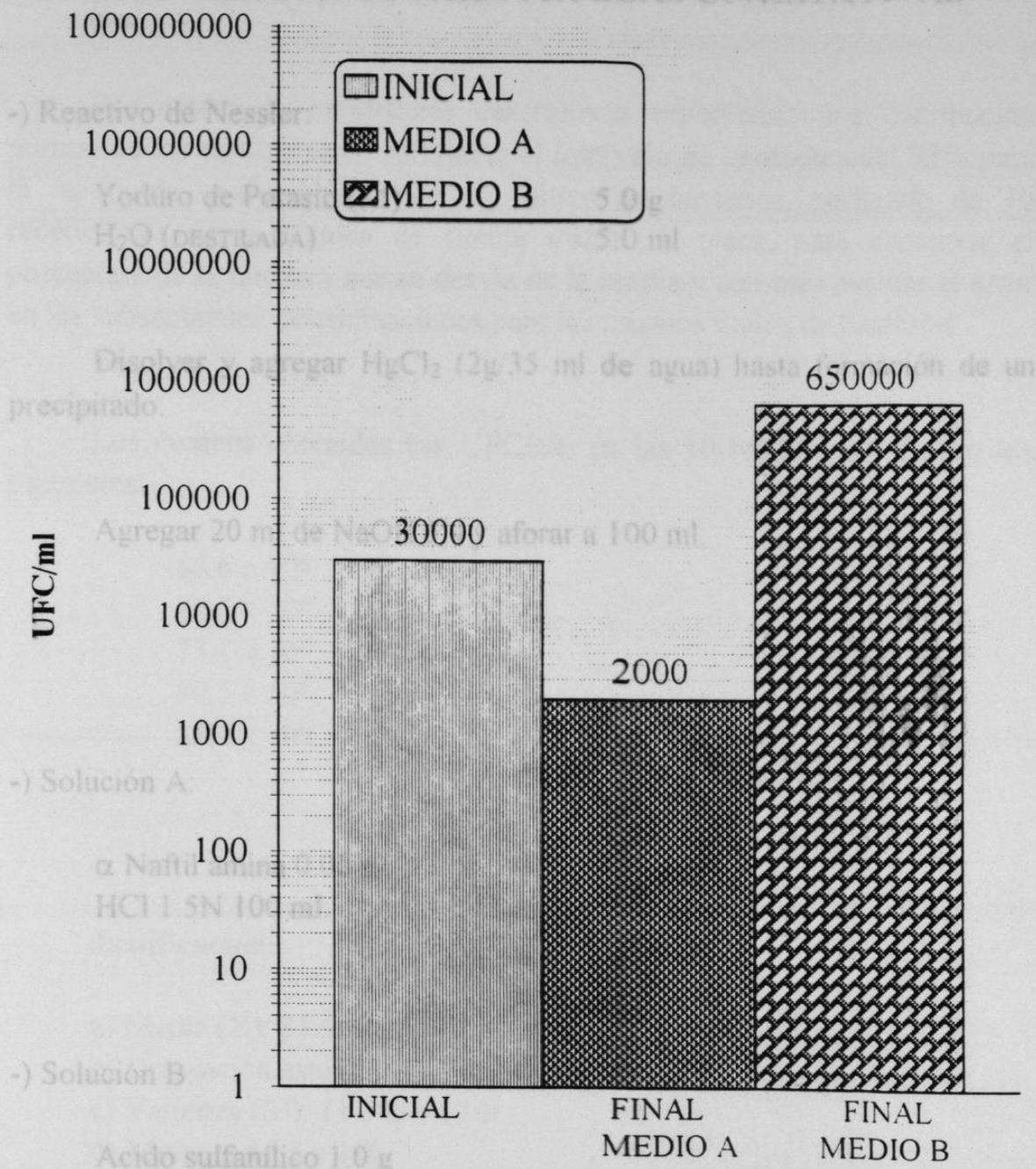


Gráfica 2. Cuentas bacterianas correspondientes a *E. agglomerans* en los medios A y B, inicio y final del periodo de incubación de 15 días.



Gráfica 3. Cuentas bacterianas correspondientes a *Citrobacter freundii* en los medios A y B, inicio y final del periodo de incubación de 15 días.

10.5. REACTIVOS PARA PRUEBAS CUALITATIVAS



Gráfica 4. Cuentas bacterianas correspondientes a la mezcla de Meza microorganismos. les de A y B antes de usar los reactivos.

10.5.a REACTIVOS PARA PRUEBAS CUALITATIVAS

-) Reactivo de Nessler:

Yoduro de Potasio (KI)	5.0 g
H ₂ O (DESTILADA)	5.0 ml

Disolver y agregar HgCl₂ (2g/35 ml de agua) hasta formación de un precipitado.

Agregar 20 ml de NaOH 5N y aforar a 100 ml.

-) Solución A:

α Naftil amina 0.02 g.
HCl 1.5N 100 ml.

-) Solución B:

Acido sulfanílico 1.0 g
HCl 1.5N 100 ml

Mezclar volúmenes iguales de A y B antes de usar los reactivos.

10.5.b PRUEBA ESTADISTICA DE CUENTAS VIABLES EN PLACA

Por medio de estadísticas descriptivas suponiendo una distribución normal de los resultados se determinó el intervalo de confianza del 95% para la media de una población de un cultivo de bacterias, partiendo de 10 repeticiones de la técnica de cuenta viable en placa, para encontrar el porcentaje de la muestra que se desvía de la media y con esto evaluar el error en las subsecuentes determinaciones para los mismos títulos de bacterias.

Los conteos obtenidos (en UFC/ml) en las 10 repeticiones fueron los siguientes:

86.6 x 10 ⁶	84.3 x 10 ⁶
76.7 x 10 ⁶	100 x 10 ⁶
73.1 x 10 ⁶	95.4 x 10 ⁶
80.5 x 10 ⁶	72.5 x 10 ⁶
85.2 x 10 ⁶	65.5 x 10 ⁶

Justificación:

- a) Media (\bar{X}): 81.965 x 10⁶
- b) Desviación estándar (S^2)^{1/2}: 10.606 x 10⁶
- c) Varianza (S^2): 112.486 x 10⁶
- d) Mínimo: 65.5 x 10⁶
- e) Máximo: 100 x 10⁶
- f) Coeficiente de variación (C.V.): 12.94%

ESTIMACION DE LA MEDIA (95% DE CONFIANZA)

$$\mu = X \pm \frac{(t)(s)}{\sqrt{n-1}}$$

$$\mu = [81.965 \pm \frac{(2.96)(10.606)}{\sqrt{10-1}}$$

$$\mu = 1.965 \pm 10.46$$

$$71.5 \times 10^6 < \mu < 92.43 \times 10^6 *$$

* Debido a que las medidas fueron en millones (10^6) los límites de la estimación de la media se multiplican por el factor.

