

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE INGENIERIA  
MAESTRIA EN INGENIERIA AMBIENTAL**

**CARACTERIZACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LOS MICROORGANISMOS  
DE LAS ZONAS ANAEROBIA Y ANOXICA DEL SISTEMA BIOACTIVADO  
RDS CON REMOCION DE NUTRIENTES A ESCALA DE LABORATORIO.**

**Autor:** Abreu, L Adriana del C

**Tutor:** Prof. Ing. Msc. Auxilia Mallia

Bárbula, Abril 2013

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE INGENIERIA  
MAESTRIA EN INGENIERIA AMBIENTAL**

**CARACTERIZACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LOS MICROORGANISMOS  
DE LAS ZONAS ANAEROBIA Y ANOXICA DEL SISTEMA BIOACTIVADO  
RDS CON REMOCION DE NUTRIENTES A ESCALA DE LABORATORIO.**

**Autor:** Abreu, L Adriana del C

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO ANTE EL  
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE LA  
UNIVERSIDAD DE CARABOBO PARA OPTAR AL  
TITULO DE MAGISTER EN INGENIERIA  
AMBIENTAL.

Bárbula, Abril 2013

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE INGENIERIA  
MAESTRIA EN INGENIERIA AMBIENTAL**

**CARACTERIZACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LOS MICROORGANISMOS  
DE LAS ZONAS ANAEROBIA Y ANOXICA DEL SISTEMA BIOACTIVADO  
RDS CON REMOCION DE NUTRIENTES A ESCALA DE LABORATORIO.**

**Autor:** Abreu, L Adriana del C

APROBADO EN EL AREA DE ESTUDIOS DE  
POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD DE  
CARABOBO POR MIEMBROS DE LA COMISION  
COORDINADORA DEL PROGRAMA.

---

---

---

Bárbula, Abril 2013

## RECONOCIMIENTO

A la profesora Auxilia Mallia por haberme brindado la oportunidad de poder trabajar junto a ella en esta investigación. Por sus buenos consejos y recomendaciones.

Al Prof. Rafael Dautant y Laboratorios Ambientales DISA por el apoyo suministrado para la realización de los análisis físico-químicos requeridos para la primera etapa del proyecto.

Al Prof. Luis Medina y al personal del Centro de Investigaciones Ambientales de la Universidad de Carabobo (CIMA) por permitirme ejecutar los análisis microbiológicos necesarios para el cumplimiento de los objetivos de este estudio. Así como también por su buena disposición en las asesorías técnicas solicitadas.

A mis compañeros de trabajo durante esta investigación: Tania Peña, Randy Sanchez, María J Marin, Mary Carmen Da Silva, Iris Estrada y Edmundo Fajardo. Gracias a ellos el camino fue menos complicado.

Y por supuesto a mi esposo, padres y familia por su incondicional apoyo durante esta etapa de aprendizajes. Gracias a ellos, una nueva meta esta cerca.

## INDICE

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	viii
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
OBJETIVOS	10
Objetivo General	10
Objetivos Específicos	10
JUSTIFICACION	11
CAPITULO II	12
MARCO DE REFERENCIA	12
Antecedentes	12
Revisión Bibliográfica	16
Remoción de Materia Orgánica	18
Degradación Anaerobia de la	19

Materia Orgánica	
Remoción de Nitrógeno	20
Nitrificación	20
Des-nitrificación	22
Remoción de Fósforo	24
Metabolización del Carbono	24
Metabolización del Fósforo	25
Mecanismo para la eliminación del Fósforo	26
Crecimiento Bacteriano	28
CAPITULO III	32
METODOLOGIA	32
Desarrollo Experimental	32
Toma de muestras	33
Medición del crecimiento bacteriano a través del método de	33

vaciado en placa	
Identificación de las cepas bacterianas	35
Curvas de crecimiento bacteriano	36
CAPITULO IV	37
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFIA	48
APENDICE A	50

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Sistema biológico de reactores escala del tipo bioactivado RDS a escala de laboratorio	8
Figura 2. Representación esquemática de la etapa anaerobia de la eliminación del fósforo	27
Figura 3. Representación esquemática de la etapa aerobia de la eliminación del fósforo	28
Figura 4. Curva característica del crecimiento bacteriano	31
Figura 5. Esquema representativo de la técnica de dilución seriada	34
Tabla 1. Carga bacteriana de las zonas anaerobia y anóxica del reactor biológico del tipo bioactivado RDS con remoción de nutrientes a	37



escala de laboratorio

Tabla 2. Observación microscópica e  
identificación bacteriana 40

Figura 6. Curva de crecimiento  
bacteriano a escala de laboratorio  
con inculo de la zona dinámica  
funcional y efluente preparado 43

Figura 7. Curva de crecimiento  
bacteriano en la zona anaerobia 44

Figura 8. Curva de crecimiento  
bacteriano en la zona anóxica 45

Tabla 3. Parámetros físico-químicos  
de entrada y salida del sistema 50

Tabla 4. Parámetros físico-químicos  
del sistema anaerobio 51

Tabla 5. Parámetros físico-químicos  
del sistema anóxico 51



---

---

## RESUMEN

### **CARACTERIZACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LOS MICROORGANISMOS DE LAS ZONAS ANAEROBIA Y ANOXICA DEL SISTEMA BIOACTIVADO RDS CON REMOCION DE NUTRIENTES A ESCALA DE LABORATORIO.**

**AUTOR:** Lic. Abreu L. Adriana del C

**TUTOR:** Ing. Msc. Auxilia Mallia

**FECHA:** Abril 2013

El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización morfo-funcional de los microorganismos de las zonas anaerobia y anóxica del sistema Bioactivado RDS con remoción de nutrientes a escala de laboratorio presentándose como una nueva alternativa para el tratamiento biológico de aguas residuales con alta eficiencia, desarrollada por el Centro de Investigaciones Ambientales de las Universidad de Carabobo (CIA-UC). El sistema está conformado por una secuencia de zonas anaerobia, anóxica, aerobia a través de biomasa suspendida y por un reactor de biopelícula móvil (biodiscos) sin sedimentación intermedia entre ambas; empleando un efluente sintético preparado con azúcar comercial, urea y tripolifosfato de sodio. La evaluación consistió en la toma de una muestra puntual de las zonas anaerobia y anóxica a una condición de entrada del efluente sintético de 1500mg/L de DBO y a un caudal de 120L/d, a las cuales se les realizaron análisis de carga bacteriana por el método de vaciado en placa, identificación de cepas bacterianas a través de la técnica microscópica y aplicación de Galerías API (estudios bioquímicos) y finalmente la realización de curvas de crecimiento. Las cargas bacterianas de las zonas anaerobia y anóxica fueron de  $6,4 \times 10^7$  UFC y  $4,1 \times 10^6$  UFC respectivamente. En la zona anaerobia se encontraron *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*, uno de los grupos principales encargados de las desnitrificación. Así mismo, se identificaron en la zona anóxica *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus thermoglucosida* y *Bacillus cereus*, los cuales contribuyen con la eliminación de fósforo pero no de la manera más eficiente a diferencia del grupo *Acinetobacter* que no se encontró presente.

**Palabras Claves:** Bio-Activado, Biopelícula Móvil, Galerías API.

## INTRODUCCION

Actualmente, uno de los problemas que más preocupa a la humanidad es la gran cantidad de contaminantes que se desechan en el agua. El tratamiento de estas aguas residuales es de gran importancia ya que ofrece una alternativa de solución; para que esto se logre se recurre a muchos métodos de los cuales los más utilizados son los que involucran microorganismos debido a que son económicos, eficientes y generan menor cantidad de subproductos contaminantes.

Los contaminantes más frecuentes del agua son pesticidas y otros utilizados en la agricultura, desechos químicos, metales pesados, residuos radiactivos, materia orgánica, bacterias, desperdicios industriales, productos químicos domésticos, derivados del petróleo, etc. Se encuentran, en cantidades mayores o menores, en las aguas del mundo. Muchas aguas están contaminadas hasta el punto de hacerlas peligrosas para la salud humana.

Una de las clasificaciones más comunes de los contaminantes (Guzmán L, 2007) son:

*Microorganismos patógenos:* en donde se encuentran las bacterias, virus, protozoos y otros organismos que transmiten enfermedades como el cólera, tifus, hepatitis, gastroenteritis, etc; que llegan al agua en las heces y otros organismos que producen las personas infectadas.

*Desechos orgánicos:* son los producidos por el hombre y los animales. Incluyen heces y otros materiales que se pueden descomponer por bacterias

aeróbicas.

*Compuestos orgánicos:* moléculas orgánicas como petróleo, gasolina, plásticos, plaguicidas, disolventes, detergentes, etc; que en algunos casos, perduran largos períodos de tiempo, porque, al ser productos fabricados por el hombre, tienen estructuras moleculares complejas difíciles de degradar por los microorganismos.

*Sustancias químicas inorgánicas:* ácidos, sales y metales tóxicos como el mercurio y el plomo. Si están en cantidades altas pueden causar graves daños a los seres vivos, disminuir los rendimientos agrícolas y corroer los equipos que se usan para trabajar con el agua.

Como principales nutrientes de importancia en el vertido de aguas residuales se encuentran el fósforo y el nitrógeno, debido a que pueden acelerar la eutrofización de lagos, ríos y embalses, y estimular el crecimiento de algas y plantas acuáticas arraigadas en cursos de agua. Por ello, el control de estos nutrientes está ganando importancia en la gestión de calidad del agua y en proyectos de plantas de tratamiento. Actualmente existe una tendencia creciente en el uso de métodos biológicos para la eliminación integrada de nitrógeno, fósforo y materia orgánica.

En la búsqueda de soluciones alternativas eficientes, se han estado realizando una serie de estudios en un nuevo sistema llamado, Proceso Bioactivado RDS, el cual consiste en la integración de una unidad anaerobia, una anóxica y de un reactor de biomasa suspendido (Lodos Activados) seguido de un reactor de biopelícula móvil (Biodiscos) sin colocar una unidad

de sedimentación secundaria entre estos dos últimos y colocando una sola unidad de sedimentación luego de la unidad de biopelícula móvil.

Por lo expuesto anteriormente, el proceso Bioactivado RDS se muestra como una alternativa para la remoción de nutrientes motivado al esquema que presenta con la combinación de las etapas anaerobia, anóxica y aerobia. El proyecto en estudio se encuentra inserto dentro de las líneas de investigación del Centro de Investigaciones Ambientales de la Universidad de Carabobo (CIAUC), el cual se ha enfocado en indagar métodos de tratamiento de agua eficientes con la finalidad de contribuir con el medio ambiente.

El presente trabajo tiene como objetivo principal el caracterizar la población microbiana que se encuentra presente en las zonas anaerobia y anóxica con la finalidad de apoyar el desarrollo de los parámetros de operación del sistema.

El estudio esta conformado por cuatro capítulos:

Capítulo I, Planteamiento del problema, donde se detalla la problemática estudiada junto a la justificación y los objetivos.

Capítulo II, Marco de referencia, para exponer la revisión bibliográfica y los antecedentes.

Capítulo III, Metodología, en donde se expone el desarrollo experimental aplicado en el trabajo con el fin de dar cumplimiento a los objetivos planteados.

Capítulo IV, Discusión de resultados, junto a las conclusiones y recomendaciones.

## **CAPITULO I**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Con el desarrollo de la urbanización y con la diversificación de los procesos industriales, un sin número de sustancias químicas elaboradas por la sociedad junto a una mayor cantidad de materias orgánicas son vertidos en los cursos normales de agua, depositándose en lagunas, ríos y mares.

En la actualidad, uno de los problemas que más preocupa a la humanidad es consecuencia del hecho mencionado anteriormente y está relacionado con los efectos que se han venido produciendo en las fuentes de abastecimiento de agua como lo son el alto porcentaje de contaminación y agotamiento de este recurso natural. Es por esta razón, que el tratamiento de las aguas residuales se ha convertido en un tema de gran importancia mundial ya que ofrece una alternativa de solución a estos problemas.

Según estimaciones de la NASA, el volumen de los contaminantes vertidos al océano es de 3175 millones de litros anuales, el cual destruye importantes ecosistemas del planeta. Los mayores "colaboradores" son los desechos de las ciudades y de las industrias que alcanzan 1633 millones de litros, lo que representa un 51,4% (El mundo de la Química, Fundación Empresas Polar).

Venezuela no escapa de esta situación ya que el volumen de las aguas residuales que reciben tratamiento a escala nacional se incrementó de 9% en el año 1998 a 32% en el año 2009, lo que representa una variación de 255% en el período de 10 años (Pagina web del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente, 2009).

Ejemplo de ello son los resultados mostrados en la página web del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente en el año 2009 sobre el Índice de Calidad del Agua General de algunos de los cuerpos de agua principales del país, donde el río Tocuyo y el Lago de Maracaibo presentaron una calidad del agua regular mientras que para el río Yaracuy y el Lago de Valencia la calidad se encontró fuera de parámetros; aunque este último ha mejorado la calidad al acercarse de forma sostenida al nivel regular; y el río Tuy fue el cuerpo de agua que presento la peor calidad.

Por ello, el control de estos nutrientes junto con la materia orgánica está ganando importancia en la gestión de calidad del agua y en proyectos de plantas de tratamiento, sobre todo en la utilización de los métodos biológicos que involucran microorganismos ya que son económicos, eficientes y generan menor cantidad de subproductos contaminantes que los métodos químicos.



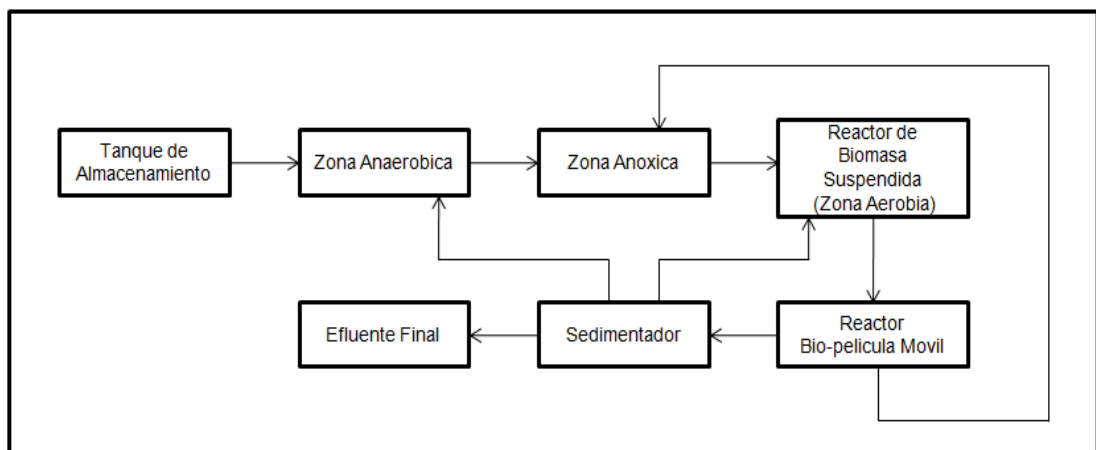
Basado en lo expuesto anteriormente y en la búsqueda de una adecuada solución para transformar los contaminantes en productos; capaces de minimizar el impacto en las aguas, surge la necesidad de realizar el presente trabajo de investigación, con el fin de complementar y fortalecer las investigaciones que se han venido levantando sobre una nueva tecnología denominada Reactor Biológico del tipo Bioactivado RDS a escala de laboratorio, el cual consiste en la combinación de un Reactor de tipo Biomasa Suspendida con un Reactor de biopelícula móvil, trabajando en serie sin sedimentación intermedia, cuyas ventajas son:

- ✓ Alcanzar eficiencias elevadas en la eliminación de los compuestos orgánicos a través de la combinación de procesos de flujo continuo y mezcla completa (Biomasa Suspendida) y de pistón (biopelícula).
- ✓ Economía importante en la inversión inicial y en el consumo de energía del sistema de tratamiento.

Como puede observarse en la Figura 1, el sistema consta de un tanque de almacenamiento del efluente sintético a tratar; una zona anaeróbica, donde se produce la liberación de fósforo en forma de ortofosfatos y consumo de la DBO; una zona anóxica para promover la desnitrificación, un reactor de biomasa suspendida (zona aeróbica), lugar donde ocurre una parte del consumo de fósforo por parte de los microorganismos y fija las

condiciones necesarias para la desnitrificación; seguidamente un reactor de biopelícula móvil, en el cual se produce el consumo de la materia orgánica extracelular que no ha sido consumida anaeróticamente en el primer tanque o con nitratos en el segundo; además del proceso de nitrificación y de captación de fósforo como consecuencia del consumo de materia orgánica almacenada intracelularmente.

Adicionalmente, en este tanque existe una recirculación hacia la zona anóxica con la finalidad de consumir el oxígeno molecular presente en el mismo. Finalmente se encuentra el sedimentador, donde se obtiene el agua tratada por la parte superior o sobrenadante, con dos recirculaciones de lodo: una a la zona anaeróbica y la otra hacia el reactor de biomasa suspendida, cuyo fin es el de garantizar presencia de biomasa en los mismos.



**Figura 1. Sistema biológico de reactores escala del tipo bioactivado RDS a escala de laboratorio (Abreu Adriana, 2013)**

En la actualidad, se desconocen, las características de la población microbiana presente en cada uno de los sistemas biológicos del sistema, por lo cual, el presente estudio plantea la caracterización de los grupos bacterianos presentes específicamente en las Zonas Anaerobia y Anóxica, contribuyendo de esta manera con el levantamiento de una data confiable sobre el sistema ya que el mismo presenta un diseño innovador pero carece de referencias bibliográficas y experimentales en relación a este tema.

## **OBJETIVOS**

**OBJETIVO GENERAL:** Caracterizar la población microbiana de las zonas anaerobia y anóxica del Sistema Bioactivado RDS con remoción de nutrientes a escala de laboratorio.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

1. Cuantificar la población bacteriana presente en las zonas anaerobia y anóxica del sistema en estudio.
2. Establecer las curvas de crecimiento bacteriano de las zonas anaerobia y anóxica del sistema en estudio.
3. Aislar las cepas bacterianas de las zonas anaerobia y anóxica del sistema en estudio.
4. Identificar la población bacteriana de las zonas anaerobia y anóxica del sistema en estudio.

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente, en el mundo y en Venezuela, la legislación ambiental es más restrictiva en lo relacionado al vertido de aguas residuales con nutrientes, especialmente en las llamadas áreas sensibles o zonas vulnerables. A partir de este hecho, se ha estimulado el conocimiento, desarrollo y mejora de los procesos de eliminación de nutrientes; así como también el compromiso y responsabilidad ambiental de manera de generar conciencia sobre este tema.

Por lo antes expuesto, el presente estudio contribuye y complementa las investigaciones que se han venido realizando sobre esta nueva tecnología del sistema Bioactivado RDS, apoyando de esta manera el desarrollo sustentable de los cuerpos de agua tanto de Venezuela como de otros países del mundo.

Adicionalmente, se estarían ampliando las características microbiológicas del sistema en estudio que servirán de base para investigaciones futuras ya que en la actualidad la información relacionada a esta materia es escasa.

## CAPITULO II

### MARCO DE REFERENCIA

#### 2.1. Antecedentes.

**Montero O, Pedro A (2009). Evaluación del proceso de des nitrificación en reactores escala piloto tipo Bioactivado RDS con remoción de nutrientes. Valencia, Venezuela.**

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el proceso de desnitrificación en reactores escala piloto tipo bioactivados RDS con remoción de nutrientes, el cual emplea un efluente crudo sintético. Para ello, se emplearon diferentes concentraciones de DBO y caudales de dicho efluente y se midieron las cantidades de nitrógeno total (Nt) tanto en la entrada como salida del sistema; así como también en la salida de la zona anóxica y adicionalmente se analizó la influencia de la relación nitrógeno/carbono en la remoción de Nt. Los valores obtenidos fueron favorables ya que mostraron porcentajes de remoción por encima del 90% y cumpliendo con la normativa de Nt establecida en el decreto N° 3219 referente al Lago de Valencia, con lo cual se concluye que el sistema realiza un tratamiento biológico viable.

Este antecedente presenta la similitud con la investigación en que ambos se desarrollan en el mismo equipo de reactores biológicos del tipo bioactivado RDS, por lo cual se tomaron en cuenta los antecedentes de los parámetros de operación; adicionalmente de una información macro levantada sobre las curva de crecimiento del sistema anóxico bajo las condiciones analizadas resultando satisfactoriamente el comportamiento teórico esperado de las cuatro fases. Así mismo, difieren en que el estudio precedente se enfoca hacia la evaluación de los parámetros químicos.

**Álvarez, D. Edenys A (2009). Evaluación del comportamiento de las cargas orgánicas y contenido de fósforo en reactores escala tipo Bioactivado RDS con eliminación de nutrientes mediante la utilización de un efluente líquido sintético. Valencia – Venezuela.**

El estudio experimental se baso en la evaluación del comportamiento de las cargas orgánicas y contenido de fósforo empleando un efluente sintético para alimentar el sistema Bio-activado RDS con la finalidad de determinar la efectividad de esta novedosa alternativa. Se analizaron parámetros como: DBO, DQO, N, P, OD y pH a la entrada y salida del sistema, así como también en cada una de las etapas que conforman el reactor. Los resultados obtenidos demostraron que el sistema es eficaz en la remoción de materia orgánica ya que se alcanzaron porcentajes de remoción

de hasta 99%; sin embargo, para el caso del fósforo, la eficiencia estuvo en 44%, lo cual se vio afectada por variables de control del proceso.

Este estudio fue realizado en el mismo reactor del trabajo en desarrollo, por lo cual se empleó como referencia bibliográfica para el reacondicionamiento de los equipos a emplear motivado a que presenta una descripción detallada del sistema. La diferencia se encuentra en que los objetivos estuvieron direccionados hacia la evaluación fisicoquímica del sistema.

**Mota, Ma. Carolina (2009). Evaluación de los parámetros físico-químicos y biológicos durante el proceso de nitrificación y des nitrificación en un reactor del tipo bioactivado con remoción de nutrientes a escala de laboratorio. Valencia – Venezuela.**

La investigación se desarrolló planteando como objetivo principal la evaluación de la relación existente entre las variables orgánicas y el proceso de nitrificación y desnitrificación empleando un efluente sintético en un sistema conformado por reactores de tipo bioactivado con remoción de nutrientes a escala de laboratorio con la finalidad de estudiar la eficiencia del sistema. Para ello, se determinaron los parámetros característicos (DBO, DQO, N, P OD y pH) así como el levantamiento de curvas de crecimiento en las zonas anóxica, aerobia y biopelícula móvil bajo tres condiciones



diferentes de concentración del efluente usado. Los resultados más importantes se encuentran en el hecho de que el sistema demostró alta eficiencia en la remoción de materia orgánica (DBO, DQO) y de nitrógeno en promedio de 95%.

La semejanza de dicho estudio con el presente se encuentra en que se emplea la misma alternativa tecnológica, por lo cual se toman como referencias los parámetros de operación y la metodología empleada para el levantamiento de las curvas de crecimiento. Sin embargo, esta evaluación no tomo en cuenta el análisis de las curvas de crecimiento en la zona anaerobia.

**Sandoval, Claudia y Carreño, Mariela (2007). Caracterización microbiológica de lodos anaerobios utilizados en el tratamiento de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos. Bucaramanga, Colombia.**

Esta investigación presenta los resultados obtenidos de la caracterización microbiológica de un reactor anaerobio en dos fases para el tratamiento de la Fracción Orgánica de los Residuos sólidos Urbanos (FORSU) mediante recuentos por sensibilidad al oxígeno y grupos metabólicos por la técnica del Número Más Probable (NMP). Se encontró un predominio de la población fermentativa, seguida por la acetogénica y la sulfatorreductora en el reactor acidogénico. No se detectó competencia entre

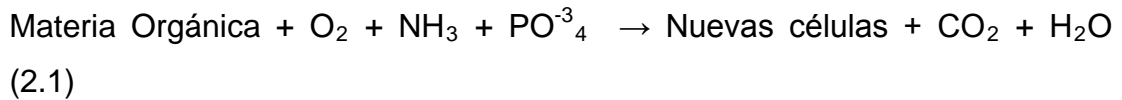
la población sulfatorreductora y la metanogénica en el reactor metanogénico. Se observaron principalmente los géneros: *Methanotrix sp*, *Methanosarcina sp*, *Methanococcus sp* y *Methanobacterium sp*.

La similitud que presenta esta investigación con el trabajo en estudio es la caracterización de la población microbiana en lodos anaerobios y la metodología aplicada para el aislamiento e identificación de las bacterias en dicho reactor. La diferencia se encuentra en que los residuos a tratar provienen de los sólidos urbanos, recolectados específicamente en una plaza del barrio San Francisco ubicada en Bucaramanga, Colombia.

## **2.2. Revisión Bibliográfica.**

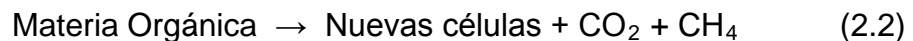
La base del tratamiento biológico se basa en el funcionamiento de microorganismos. La remoción de la DBO disuelto y en partícula, así como la estabilización de la materia orgánica, se lleva a cabo biológicamente mediante el uso de una gran cantidad de microorganismos, principalmente bacterias.

El rol de los microorganismos en procesos aerobios es oxidar la materia orgánica en productos simples y nuevas células denominadas biomasa, como se representa en la siguiente ecuación:



El oxígeno, amoníaco y fosfato representan la necesidad de nutrientes de los microorganismos para poder realizar la conversión de materia orgánica a productos finales simples como lo son el dióxido de carbono y agua.

Por su parte, los microorganismos en los procesos anaerobios tienen como finalidad principalmente la conversión del material orgánico en productos como lo son el dióxido de carbono y metano.



Adicionalmente, existen microorganismos que son empleados para la remoción de nitrógeno y fósforo. Existen bacterias específicas capaces de oxidar amoníaco en nitritos y nitratos (nitrificación), mientras que otras bacterias pueden reducir el nitrógeno oxidado a nitrógeno gas (desnitrificación). Para el caso del fósforo, los procesos biológicos se configuran para promover el crecimiento de bacterias con capacidad de remover y almacenar grandes cantidades de fósforo inorgánico.

### 2.2.1. Remoción de Materia Orgánica.

El mecanismo más importante para la remoción de la materia orgánica presente en el agua residual, es el metabolismo bacteriano. El metabolismo consiste en la utilización por parte de las bacterias, de la materia orgánica como fuente de energía y carbono para generar nueva biomasa.

Cuando parte de la materia orgánica es metabolizada y moléculas grandes como proteínas, grasas (lípidos) y/o azúcares (carbohidratos) son transformadas químicamente a moléculas pequeñas (ácido láctico, ácido acético, bióxido de carbono, amoníaco, urea) acompañado por la liberación de energía, el proceso es llamado **Catabolismo**. Esta energía se conserva en forma de molécula conocida como adenosíntrifosfato (ATP), la cual es de vital importancia en el metabolismo de cualquier organismo vivo.

Por otra parte, el **Anabolismo** es la fase del metabolismo durante la cual se sintetizan las moléculas que las bacterias utilizan para regenerarse, mantenerse o dividirse, como son: las grasas, las proteínas, los azúcares o carbohidratos, que forman parte funcional o estructural de los organismos. Esto lo lleva a cabo a partir de los constituyentes primarios que se obtienen de los nutrientes. Sin embargo, tales procesos de síntesis requieren de energía y ésta la proporciona el ATP que fue generado durante el

catabolismo. Así, el anabolismo y el catabolismo se llevan a cabo simultáneamente y cada uno está regulado en forma muy precisa, ya que ambos procesos son interdependientes.

Por otra parte, los microorganismos que usan el carbono para formar nueva biomasa se denominan "heterótrofos" mientras que aquellos que emplean el dióxido de carbono para convertirlo en biomasa se llaman "autótrofos". La conversión de dióxido de carbono a compuestos celulares de carbono requiere de un proceso de reducción, el cual requiere energía para realizarse. Los organismos autótrofos utilizan una mayor cantidad de energía para la síntesis en comparación con los heterótrofos, existiendo generalmente una menor producción de células y tasas de crecimiento menores.

#### ***2.2.1.1. Degradación anaerobia de la Materia Orgánica.***

**(Rodríguez Jenny, 2011)**

Este proceso requiere la intervención de diversos grupos de bacterias facultativas y anaerobias estrictas, las cuales utilizan en forma secuencial los productos metabólicos generados por cada grupo. La digestión anaerobia de la materia orgánica involucra tres grandes grupos tróficos y cuatro pasos de transformación: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

El proceso se inicia con la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos por la acción de enzimas extracelulares producidas por las bacterias hidrolíticas y fermentativas. Los productos de esta reacción son moléculas de bajo peso molecular como los azúcares, los aminoácidos, los ácidos grasos y los alcoholes, los cuales son transportados a través de la membrana celular; posteriormente son fermentados a ácidos grasos con bajo número de carbonos como los ácidos acético, fórmico, propiónico y butírico, así como compuestos reducidos como el etanol, además de  $H_2$  y  $CO_2$ . Los productos de fermentación son convertidos a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por la acción de las bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno.

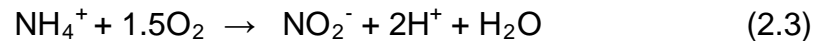
Finalmente, las bacterias metanogénicas convierten el acetato a metano y  $CO_2$  o reducen el  $CO_2$  a metano. Estas transformaciones involucran dos grupos metanogénicos: acetotróficas e hidrogenotróficas. En menor proporción, compuestos como el metanol, las metilaminas y el ácido fórmico pueden también ser usados como sustratos del grupo metanogénico.

## **2.2.2. Remoción de Nitrógeno**

### ***2.2.2.1. Nitrificación.***

En este proceso ocurre la oxidación biológica del amoníaco a nitrato en dos pasos (Lolmede y Jácome A, 2000):

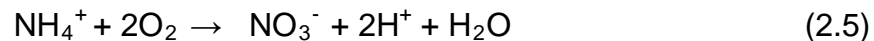
1. *Conversión de amonio a nitrito:*



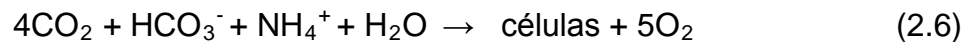
2. *Conversión de nitrito a nitrato:*



Conversión global de amonio a nitrato:



Además, de obtener energía, el tejido celular asimila una parte del ion amonio. La reacción de la síntesis de biomasa se puede representar de la siguiente manera:



A partir de estudios realizados tanto en el laboratorio como en plantas a gran escala, se encontró que los siguientes factores afectan el proceso de nitrificación (Crites y Tchobanoglous, 2004):

➤ **Concentración de amonio y nitritos y relación de DBO<sub>5</sub>/TKN:** una variedad de agentes orgánicos e inorgánicos pueden inhibir el crecimiento y la acción de estos organismos. La concentración de organismos nitrificantes presentes dependerá de la proporción de DBO<sub>5</sub>/TKN.

➤ **Concentración de oxígeno disuelto (OD):** valores de este parámetro que se encuentren por encima de 1mg/L son esenciales para que ocurra el proceso de nitrificación. Si los niveles de OD se encuentran por debajo de

este valor, el oxígeno se convierte en el nutriente limitante y la velocidad de nitrificación disminuye o el proceso se detiene por completo.

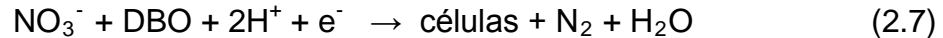
➤ **Temperatura y pH:** el efecto de estos parámetros es fundamental para el crecimiento de las bacterias nitrificantes. Existe un rango óptimo estrecho de pH entre 6,5 y 8,6; pero los sistemas que se encuentran aclimatados a valores de pH menores llevan a cabo la nitrificación con éxito también.

#### ***2.2.2.2. Desnitrificación.***

En el pasado, la conversión biológica de nitratos a nitrógeno se identificaba con frecuencia como desnitrificación anaerobia. Sin embargo, las vías bioquímicas principales no son anaerobias, sino más bien una modificación de las vías aerobias, en las cuales el nitrato sirve como aceptador de electrones en lugar del oxígeno; por tanto, se considera apropiado el uso del término anóxico en lugar de anaerobio (Crites y Tchobanoglous, 2004). Estas bacterias son organismos heterótrofos facultativos, las cuales obtienen energía para su crecimiento de la conversión de nitratos en nitrógeno gaseoso, pero requieren de una fuente de carbono para la síntesis celular. Dicha forma de nitrógeno tenderá a salir a la atmósfera, consiguiéndose así, la eliminación de nitrógeno en el agua.



1. *Para la remoción de los nitratos:*



2. *Para la remoción de nitritos:*



Para que las bacterias desnitrificantes actúen, es necesario que el agua tenga bastante carga de materia orgánica, una fuente de nitratos elevada, muy poco oxígeno libre y un pH situado entre 6,5 y 8. Por su parte, el oxígeno asociado a los nitratos es la única fuente de oxígeno necesaria para llevar a cabo sus funciones vitales. De esta forma los niveles de oxígeno libre en el medio donde actúan deben de ser inferiores a los 0,2 mg/l. El tiempo mínimo de contacto entre el agua y las bacterias desnitrificantes debe ser suficiente para que se produzcan las reacciones deseadas, estimándose un tiempo mínimo de 1,5 horas a caudal medio.

Por su parte, la influencia de la temperatura en la velocidad del proceso de desnitrificación depende de la cantidad de materia orgánica utilizada; sin embargo, se ha observado que a altas temperaturas la velocidad se hace independiente de la materia orgánica utilizada. Adicionalmente, el proceso de desnitrificación aumenta la alcalinidad del agua (Villaseñor, 2002).

### 2.2.3. Remoción de fósforo.

Los microorganismos emplean el fósforo para la síntesis celular y el transporte de energía. El proceso de eliminación de fósforo se basa en la polimerización de los ortofosfatos presentes en el agua residual a poli fosfatos (etapa aerobia) y su acumulación en el interior de determinadas bacterias, denominadas bacterias acumuladoras (etapa anaerobia).

**2.2.3.1. Metabolización del carbono:** las bacterias acumuladoras de fósforo pueden metabolizar el carbono del agua residual por medio de tres rutas posibles (Villaseñor, 2002):

- Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TAC)
- Ciclo glioxilato
- Formación y degradación de los polihidroxicanoatos (PHA)

Para usar una de estas tres vías se parte siempre de los ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente del ácido acético. Estos AGV pueden ir presentes en el agua residual o generarse en la etapa anaerobia mediante un proceso de hidrólisis y fermentación acidogénica. El ciclo TAC está orientado a la obtención de energía, además de tener función anapletórica (reposición de metabolitos). En el funcionamiento de dicho ciclo actúa una biomolécula llamada Adenin Nicotin Di nucleótido (ADN), la cual participa en la cadena de transporte electrónico de la respiración. La relación entre sus dos formas (reducida y oxidada, es decir,  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ ) influye en el

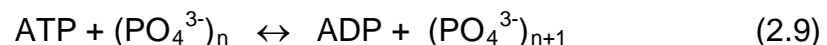
funcionamiento del ciclo. La presencia de elevadas relaciones  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  paraliza el ciclo de los TAC. Estas relaciones se dan cuando hay ausencias de aceptores de electrones para completar la cadena de transporte electrónico, es decir, en condiciones anaerobias.

El ciclo Glioxilato es una modificación del anterior y su principal función es anapletórica. Se caracteriza de nuevo porque se inhibe ante las altas relaciones de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ .

Por el contrario, la formación de PHA, principalmente poli- $\beta$ -hidroxibutiratos (PHB), es una polimerización catalizada por elevadas relaciones  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  (en condiciones anaerobias) y con abundante sustrato orgánico. La degradación de PHA se favorece en las condiciones aerobias en las que previamente haya existido una etapa anaerobia en la que se haya absorbido la mayor parte de sustrato orgánico presente.

**2.2.3.2. Metabolización del fósforo:** el uso del fósforo por las bacterias acumuladoras puede ser de dos tipos:

1. *Síntesis de polifosfatos:* el principal mecanismo es mediante la fosforilación enzimática por moléculas de ATP.



Cuando una molécula de ATP pierde un grupo fosfato se transforma en ADP (Adenosin Difosfato) y se libera una cierta cantidad de energía. La

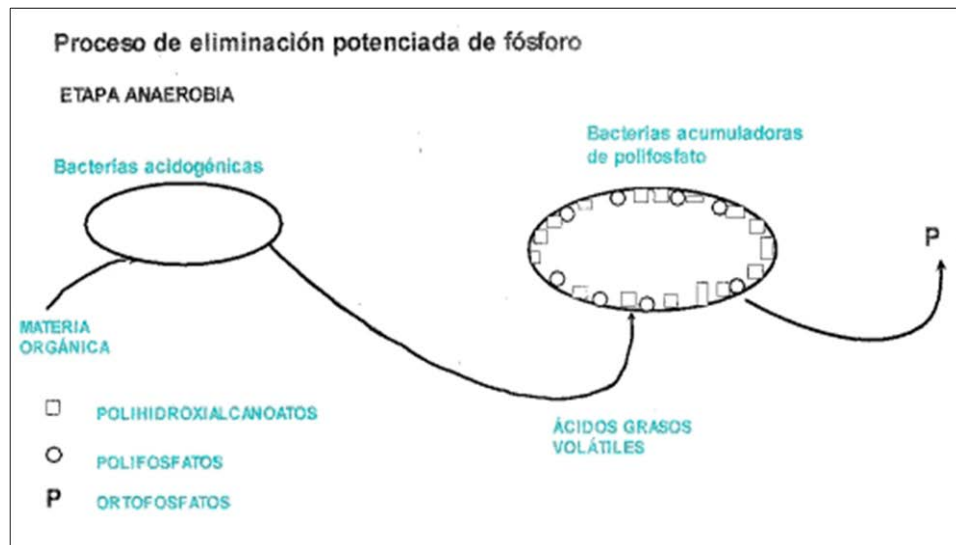
relación ATP/ADP es la que actúa sobre el equilibrio de forma que bajas relaciones ATP/ADP inhiben la síntesis, y esto se produce en situaciones de ausencia de oxígeno.

*2. Degradación de polifosfatos:* se describen hasta tres posibles vías de degradación de polifosfatos, siendo la más importante precisamente la reacción inversa a la anterior. Por ello, su inhibición es ahora en situaciones de alta relación ATP/ADP, y esto se produce en presencia de aceptores de electrones, principalmente oxígeno. En resumen, la acumulación de polifosfatos en el interior de las células de las bacterias acumuladoras se favorece en condiciones aerobias, mientras que la ausencia de oxígeno favorece su hidrólisis.

**2.2.3.3. Mecanismo para la eliminación del fósforo:** las bacterias acumuladoras en condiciones anaerobias no son capaces de degradar materia orgánica pero tienen la capacidad de tomar la fracción que se encuentra en forma de AGV en su medio extracelular y almacenarla en el medio intracelular en forma de PHA, generalmente PHB y polihidroxivaleriatos. La energía que necesitan para llevar a cabo esta operación la obtiene, de las reservas de polifosfatos. Estos compuestos pueden ser transformados, prácticamente sin coste energético, en moléculas de ATP, molécula conocida por servir como transportador de energía para procesos biológicos. El poder reductor NADH que se necesita en el ciclo de

formación de PHB se obtiene de los ciclos de los TAC y del ciclo del glioxilato (Rodrigo y Ferrer, 1999) tal y como se explicó en los párrafos anteriores y como puede verse en la Figura 2.

Los ácidos grasos volátiles se obtienen por la degradación anaerobia del sustrato orgánico complejo por parte de microorganismos acidogénicos.



**Figura 2. Representación esquemática de la etapa anaerobia de la eliminación del fósforo (Rodrigo – Ferrer, 1999)**

En condiciones aerobias (e incluso en condiciones de anoxia), las bacterias acumuladoras consumen con un aceptor de electrones (oxígeno o nitratos) la materia orgánica almacenada obteniendo así energía, parte de la cual almacenan en forma de polifosfatos (Ver Figura 3). La cantidad de polifosfatos que se forman y acumulan en la etapa aerobia es superior a la

de polifosfatos degradados en la etapa anaerobia, observándose una reducción neta del fósforo contenido en el agua residual.

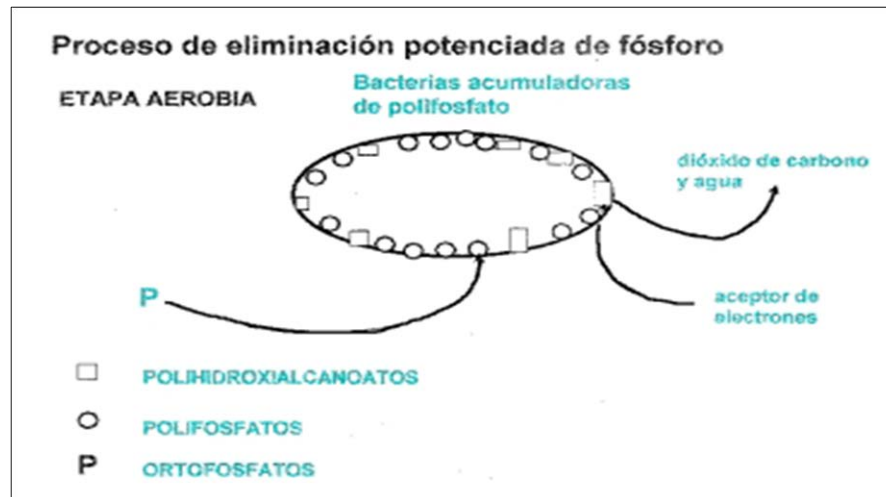


Figura 3. Representación esquemática de la etapa aerobia de la eliminación del fósforo (Rodrigo – Ferrer, 1999)

#### 2.2.4. Crecimiento bacteriano (Crites y Tchobanoglous, 2004).

Las bacterias se reproducen por fisión binaria, es decir, la célula original se convierte en dos organismos nuevos. El tiempo requerido para división, conocido como tiempo de generación, puede variar desde menos de 20 minutos hasta varios días.

Existen cuatro fases para el crecimiento bacteriano (ver figura 4):

**Fase de latencia o retardo:** la adición del material de inoculación a un medio nuevo no va seguido de la duplicación inmediata de la población sino después de cierto tiempo, llamado fase de retardo, la cual puede ser

breve o larga dependiendo de las condiciones del medio. Esto significa que las células se encuentran en estado latente; por el contrario las células individuales aumentan su tamaño sobre las dimensiones normales y fisiológicamente son muy activas. Las bacterias en el nuevo medio metabolizan, pero existe un retardo en la división celular.

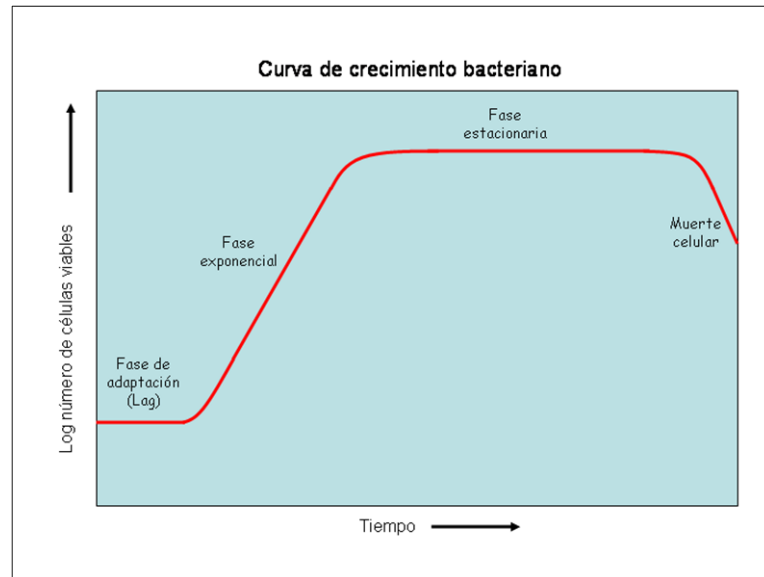
Si un cultivo que crece exponencialmente es inoculado al mismo medio bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa la fase de retardo y el crecimiento exponencial continua a la misma velocidad. Sin embargo, si el inóculo se toma de un cultivo viejo y se siembra en el mismo medio, generalmente se presenta la fase de retardo aun cuando las células estén vivas, lo que se debe en su mayoría a que diferentes coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares se agotan y se requiere cierto tiempo para su resíntesis.

**Fase de crecimiento exponencial:** durante este período las células se dividen a cierta tasa determinada por su tiempo generacional y su habilidad para procesar alimento (tasa constante de crecimiento porcentual). En esta fase la población es casi uniforme, en lo que se refiere a la composición química de las células, actividad metabólica y otros caracteres fisiológicos.

**Fase estacionaria:** en este período la población permanece estacionaria motivado a que las células agotaron el sustrato o los nutrientes necesarios para su crecimiento o el crecimiento de células nuevas se compensa con el número de células muertas. Sin embargo, muchas de las funciones celulares pueden continuar, incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. Ciertos metabolitos celulares, llamados metabolitos secundarios se producen principalmente en la fase estacionaria, entre los que se encuentran: antibióticos (penicilina y estreptomicina), endosporas y varias enzimas.

**Fase de muerte:** durante esa fase, la población muere a una velocidad superior a la de producción de nuevas células, suponiendo que todavía se reproduzcan algunas de ellas. La tasa de mortalidad generalmente es una función de la población viable y de las características ambientales. En algunos casos, la fase de muerte exponencial es inversa de la fase de crecimiento.





**Figura 4. Curva característica del crecimiento bacteriano (Wikipedia La Enciclopedia Libre, 1998)**

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGIA**

El tipo de investigación aplicada fue experimental ya que consistió en la manipulación de una variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento en particular (Van Dalen y Meyer, 1983).

#### **3.1. Desarrollo Experimental.**

En base al concepto anterior, la metodología se realizó a través de una toma de muestra de los lodos biológicos de las zonas anaerobia y anóxica del Sistema Bioactivado RDS con remoción de nutrientes a escala de laboratorio para realizar el conteo, aislamiento de cepas e identificación. Así como también para realizar el levantamiento de la curva de crecimiento.

Para ello previamente se debió re-acondicionar el sistema. Inicialmente se ejecutó un mantenimiento a los equipos involucrados y luego se realizó la aclimatación de los reactores biológicos, para lo cual se empleó una muestra de lodos aerobios extraídos de una planta de tratamiento de aguas residuales en funcionamiento de una empresa alimenticia; mientras que las muestras de los lodos anaerobios y anoxicos se extrajeron de una

planta de tratamiento de aguas residuales en funcionamiento de una empresa automotriz. Este proceso tuvo una duración de 3 meses.

El efluente sintético a ser tratado consistió en una solución de azúcar comercial, Trifosfato de Sodio (TTP) y Urea ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ), estos reactivos en descomposición simulaban los contaminantes y la carga orgánica de un agua residual.

### **3.1.1. Toma de muestras.**

Para el análisis se tomó una muestra representativa de cada zona: anaerobia y anóxica para poder determinar así su calidad microbiológica. Para su recogida se usaron frascos estériles de 500ml, los cuales fueron llenados por completo para excluir el aire.

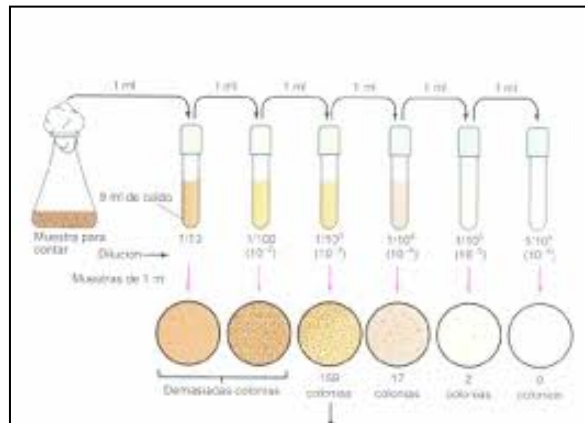
Adicionalmente, se tomaron muestras del efluente crudo a la entrada y descarga del sistema, así como de las unidades en estudio para realizar los análisis físico químicos (Demanda Bioquímica de Oxígeno, Demanda Química de Oxígeno, Fósforo, Nitrógeno, pH y Temperatura) con la finalidad de validar el comportamiento del sistema en ese momento (Ver Apéndice A).

### **3.1.2. Medición del crecimiento bacteriano a través del método de vaciado en placa.**

El sistema de vaciado en placa consiste en la toma de un volumen conocido de 1,0 ml de cultivo y se pasa a una placa Petri estéril, a la cual se

le adiciona un método de agar fundido y se mezclan bien mediante un suave movimiento giratorio de la placa sobre la superficie de la mesa.

Para poder obtener el número apropiado de colonias, se debe diluir la muestra a contar. Para ello, se realizan diluciones sucesivas, según la figura que se muestra a continuación:



**Figura 5. Esquema representativo de la técnica de dilución seriada (Wikipedia La Enciclopedia Libre, 2005)**

Para el caso de la Zona Anaerobia se realizó una carga de la muestra de lodos anaerobios a través del método de diluciones seriadas y vertido en placa de agar anaeróbico. En el caso de la Zona Anóxica, se realizó la carga aplicando la misma técnica de diluciones seriadas y vertido en placa de agar nitrato. En ambos casos, se dejaron las placas durante 24 horas en una estufa a 35°C para observar el crecimiento bacteriano.

### **3.1.3. Identificación de las cepas bacterianas.**

Para el aislamiento de las cepas bacterianas de la Zona Anaerobia se sembró un volumen de los lodos en caldo nitrato; se realizaron diluciones seriadas y luego estriaciones en agar nitrato. Para el caso de la Zona Anóxica se empleó caldo nutritivo, diluciones seriadas y las estriaciones se aplicaron en agar anaeróbico.

Una vez aisladas, las cepas de ambas zonas fueron caracterizadas morfológicamente mediante la técnica de Tinción de Gram, cuyo método consiste en la tinción diferencial (color violeta para las Gram Positivas y color rojo para las Gram Negativas). La diferencia de coloración se debe a las distintas estructuras entre las paredes celulares de las bacterias.

Tomando en cuenta los resultados de los grupos morfológicos se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes para cada caso. Para la confirmación de género y especie microbiológica, se aplicaron pruebas bioquímicas automatizadas mediante sistemas API en campana de anaerobiosis (para el caso de las bacterias de la Zona Anaerobia) y en cámara de microaerofilia (para el caso de las bacterias de la Zona Anóxica). Todas encubadas a 37°C.

#### **3.1.4. Curva de crecimiento bacteriano.**

Para el levantamiento de la curva de crecimiento de la población bacteriana en las Zonas Anaerobia y Anóxica se ajustó el pH de las muestras a  $7 \pm 0,2$  y se preparó un pool bacteriano con cada cepa identificada en cada una de las zonas. Luego se preparó una dilución 1:10 del efluente con la biomasa de cada una de las zonas: el frasco de la suspensión de la biomasa anóxica con el efluente se incubó a temperatura ambiente en microaerofilia mientras que el frasco con la suspensión de la biomasa anaerobia se cubrió con parafina para dar la anaerobiosis y las muestras fueron tomadas por el lado inferior del mismo. Se incubaron también a temperatura ambiente.

Finalizado el tiempo de incubación, se tomaron las cargas bacterianas iniciales para cada zona siendo estas las correspondientes al tiempo cero ("0"). Las placas se incubaron de acuerdo a las necesidades microbiológicas, es decir, en microaerofilia y en anaerobiosis respectivamente. La carga bacteriana se midió cada hora de acuerdo a cada una de las zonas durante cinco (5) horas de contacto.

## CAPITULO IV

### DISCUSION DE RESULTADOS

La caracterización de la población microbiana de las zonas Anaerobia y Anóxica del Reactor Biológico del tipo Bioactivado RDS con remoción de nutrientes a escala de laboratorio, se inicio con la evaluación de la carga bacteriana, es decir, la determinación de la cantidad de bacterias presentes en dichos reactores ya que a través de este valor se puede medir la eficiencia del proceso de degradación de la carga orgánica y nutrientes contenida en el agua residual sintética empleada en el sistema en estudio.

**Tabla 1. Carga Bacteriana de las Zonas Anaerobia y Anóxica del Reactor Biológico del tipo Bioactivado RDS con remoción de nutrientes a escala de laboratorio.**

Zona en estudio	pH	Temperatura (°C)	Oxígeno Disuelto (mgO <sub>2</sub> /L)	UFC/mL
Anaerobia	7,67	25,4	0,02	6,4 x 10 <sup>7</sup>
Anóxica	7,92	25,6	1,28	4,1 x 10 <sup>6</sup>

(Abreu Adriana, 2013)

En la tabla 1 se puede observar que la carga bacteriana en la zona anaerobia es mayor a la anóxica. Según bibliografía consultada (Crites y Tchobanoglous, 2004), los valores de la población bacteriana en un reactor

biológico de una Planta de tratamiento de aguas residuales debería ser mayor a una cantidad de  $10^{12}$  UFC/mL; sin embargo, el valor adecuado de la población microbiana está íntimamente relacionado con los porcentajes de eficiencia de los parámetros físico-químicos (DBO, DQO, fósforo y nitrógeno) ya que si dichos porcentajes se mantienen en los rangos esperados cuando la cantidad de población bacteriana presenta valores por debajo de  $10^{12}$  UFC/mL, entonces, este sería el valor adecuado al cual trabajan los reactores biológicos.

En este estudio en particular, los porcentajes de remoción de la carga orgánica, DBO y DQO, estuvieron en 99,83% y 98,96% respectivamente. Por su parte, las eficiencias de remoción nitrógeno total y amoniacal resultaron en 90,32% y 98,07%, mientras que el porcentaje de remoción del fósforo fue de 61,96%; por lo tanto pudiera decirse que las cargas bacterianas se encuentran en valores acordes para realizar la biodegradación de la carga orgánica y del nitrógeno, en su presentación de nitrógeno amoniacal.

Sin embargo, para el caso del nitrógeno total la eficiencia del 90%, pudiera deberse en parte no solo a la cantidad de bacterias sino a las condiciones de los siguientes parámetros en la zona anóxica, donde ocurre la desnitrificación, proceso de reducción biológica de nitratos a óxido nítrico, óxido nitroso y nitrógeno gas, el cual comprende la oxidación de distintos



sustratos orgánicos empleando los nitratos como receptores de electrones en lugar del oxígeno y el dador es el carbono orgánico del agua:

1. Oxígeno disuelto, cuyo valor se encontraba en 1,28 mgO<sub>2</sub>/L, muy por encima del valor recomendado en la teoría, las cuales comentan valores por debajo de 0,2 mgO<sub>2</sub>/L ya que por encima de 2 mgO<sub>2</sub>/L se desfavorece por completo a la reacción de desnitrificación ya que da paso a la oxidación aerobia del carbono. Es importante mencionar que este valor de oxígeno disuelto se observó solamente en el día de la toma de la muestra y el día anterior motivado a problemas con la regulación de la descarga de la bomba de agitación usada en el reactor, cuyo ajuste se realiza de manera manual.

2. Alta carga orgánica: el valor de la DBO a la salida de la zona anaerobia, previa a la anóxica, fue de 70mg/L, lo cual es considerado bajo. Para ello sería recomendable agregar un sustrato externo como el metanol para subir los niveles de carga orgánica.

Con respecto a la identificación de las cepas bacterianas encontradas en las zonas anaerobia y anóxica, los resultados pueden verse en la Tabla 2.

En bibliografía consultada (Lolmede – Tejero, 2000), las bacterias desnitrificadoras pueden ser de los géneros: *Acetobacter*, *Micrococcus*, *Spirillum*, *Hyphomicrobium*, *Agrobacterium*, *Propionobacterium*, *Rhizobium*, *Cornebacterium*, *Cytophata*, *Thiobacillus*, *Alcaligenes*, *Bacillus* y

*Pseudomonas*. No obstante, las más extendidas en las aguas residuales son *Pseudomonas fluorescens*, *P. Aeruginosa*, *P. denitrificans* y *Alcaligenes sp.* (Smith *et al.* 1994; Bitton 1994). Como puede observarse en la Tabla 2, en la zona anóxica se encontraron los grupos de bacterias *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus thermoglucosida* y *Bacillus circulans*, es decir, que se tienen tres tipos de colonias responsables de la metabolización de la materia orgánica mediante el uso de nitratos (bacterias heterótrofas desnitrificantes).

**Tabla 2. Observación microscópica e identificación bacteriana.**

Zona en estudio	Caracterización GRAM	Identificación
Anaerobia	Bacilos Gram Negativos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Bacilos Gram Positivos	<i>Bacillus cereus</i>
Anóxica	Bacilos Gram Negativos	<i>Chromobacterium violaceum</i>
	Bacilos Gram Negativos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Bacilos Gram Negativos	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	Bacilos Gram Positivos	<i>Bacillus thermoglucosida</i>
	Bacilos Gram Positivos	<i>Bacillus circulans</i>

(Abreu Adriana, 2013)

Por su parte, la baja eficiencia del fósforo obtenido en el sistema, no puede explicarse por completo ya que el alcance de este trabajo sólo se

limita a las zonas anaerobias y anóxicas, faltando el detalle de los comportamientos de las zonas aerobias y de la zona dinámica funcional. Sin embargo, se puede observar en la Tabla 2 que no se identificó cepa del género facultativo *Acinetobacter* en ninguna de las dos zonas evaluadas, cuyas bacterias según la teoría consultada constituyen los microorganismos más importantes para la eliminación del fósforo, cuyo proceso ocurre en dos etapas: anaerobia y aerobia (e incluso en condiciones de anoxia) tal y como se explica en los fundamentos teóricos.

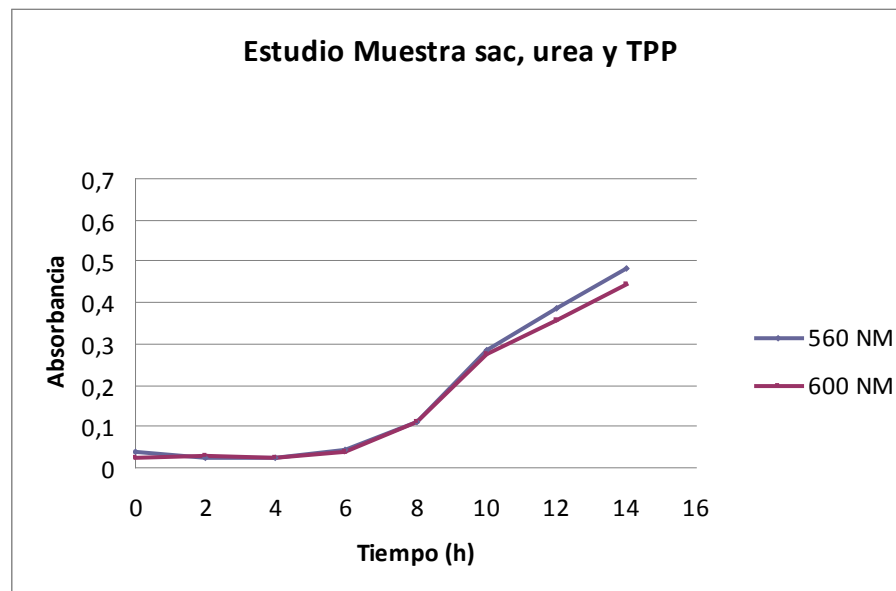
Sin embargo, en la bibliografía consultada (Rodrigo y Ferrer, 1999), se encontró que también se han identificado otros tipos de bacterias (*Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Klebsiella*, *Moraxella* y *Pseudomonas*) que pueden contener gránulos de poli fosfatos y contribuir con el proceso de la eliminación del fósforo.

En la Tabla 2 se puede observar que se identificaron los géneros *Pseudomonas* en ambas zonas y *Klebsiella* en la zona anóxica. Adicionalmente, al observar los valores obtenidos del análisis de fósforo tanto en la entrada del sistema como en la zona anaerobia, la variación no es significativa (4mg/L aprox.), por lo cual se pudiera inferir que el proceso de acumulación de los AGV en el interior de la célula no fue tan eficiente por la ausencia del género *Acinetobacter*. Sin embargo, al revisar el valor en la zona anóxica, el mismo se disminuye con respecto a la anaerobia en

8,46mg/L, con lo cual pudiera inferirse que la presencia de las bacterias *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella oxytoca* está apoyando el proceso de eliminación de fósforo aunque no con la mayor eficiencia como ya se ha comentado anteriormente, confirmando parte de la explicación de la baja remoción en el sistema completo.

Finalmente, se realizaron curvas de crecimiento en las zonas anaerobia y anóxica; sin embargo, la medición solamente se pudo realizar durante las primeras 5 horas debido a falta de recursos económicos para abarcar las horas de medición completas, las cuales se estimaban fuesen de al menos 15 horas en base a los siguientes puntos:

- ✓ Un estudio previo realizado durante la etapa de re-acondicionamiento del equipo con el objetivo de validar la mejor combinación de nutrientes en el efluente, para lo cual se preparó una muestra del efluente sintético (conformado por sacarosa, urea y tripolifosfato con agua) con inóculo de la zona dinámica funcional del sistema, y se realizaron mediciones a través de la técnica de espectrofotometría a 560nm observándose que la mejor curva se daba a 15 horas de iniciada la evaluación (Ver Figura 6)

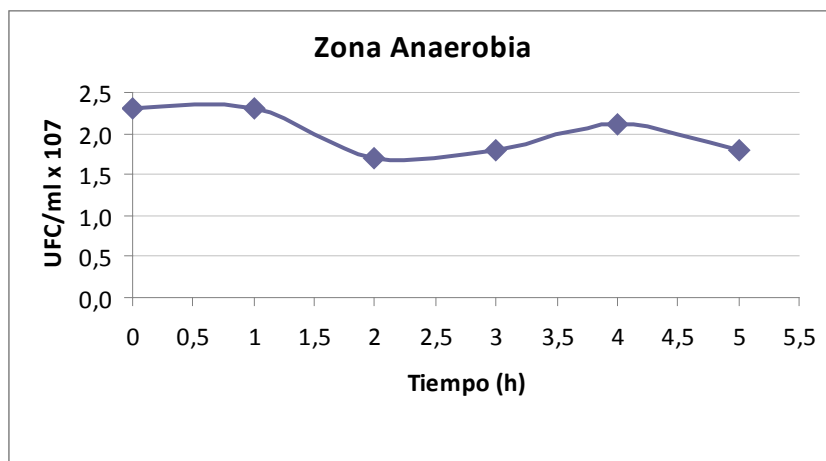


**Figura 6. Curva de crecimiento bacteriano a escala de laboratorio con inóculo de la zona dinámica funcional y efluente preparado: sacarosa , urea y tripolifosfato (Abreu Adriana, 2013)**

✓ En los trabajos de Mota C, y Montero, P (2009), dos de los antecedentes de este trabajo, se presentaron curvas de crecimiento de las zonas anóxica, biomasa suspendida y biodisco, en cuyas gráficas bajo la condición de 1500ppm de DBO se observaron que los tiempos de duración estuvieron entre 15 y 20 horas. Por lo expuesto anteriormente se estará discutiendo en base a las tendencias reflejadas en las gráficas.

En la Figura 7, curva de la zona anaerobia, se observa que entre la hora 0 y la hora 3, las bacterias se encuentran en fase de retardo o adaptación mientras que entre la hora 3 y hora 4 pareciera que estuvieran en

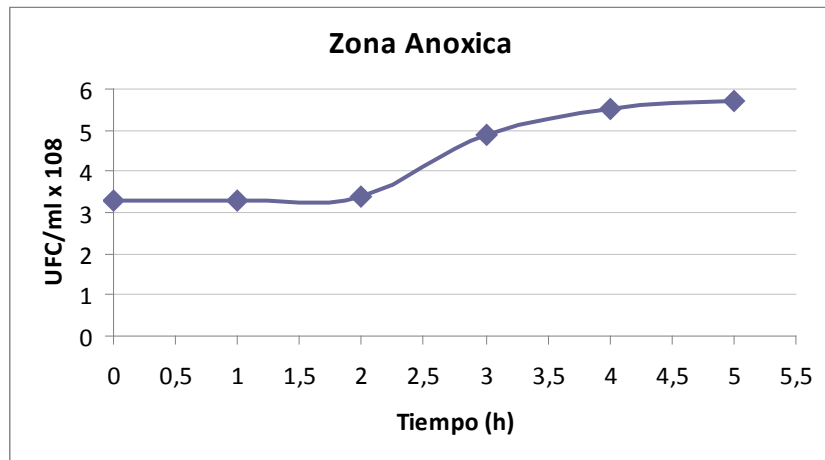
la fase de crecimiento exponencial ya que a partir de la hora 5 se observa un punto de disminución para lo cual pudiera decirse que el sustrato de las bacterias disminuyó de manera significativa; sin embargo, se hace necesario la repetición de este estudio con los tiempos completos para validar si efectivamente era el inicio de la fase estacionaria y de muerte celular.



**Figura 7. Curva de crecimiento bacteriano en la zona anaerobia a 1500mg/L de DBO (Abreu Adriana, 2013)**

Por su parte, en la figura 8, curva de la zona anóxica se observa claramente entre la hora 0 y la hora 2 la fase de retardo y a partir de la hora 2 la fase de crecimiento exponencial que se mantiene hasta la hora 5, cuyo fin no pudo verse. Sin embargo, puede decirse que esta tendencia se encuentra acorde con los resultados obtenidos en el trabajo de grado realizado por Montero, P (2009) en el cual se muestran tres curvas de crecimiento en la

zona anóxica para comparar las distintas concentraciones de DBO del efluente sintético preparado, en las cuales, se observa que la fase de crecimiento exponencial se encuentra a partir de las horas 4 y 5 con intervalos de 5 horas aproximadamente.



**Figura 8. Curva de crecimiento bacteriano en la zona anóxica a 1500mg/L de DBO (Abreu Adriana, 2013)**

## CONCLUSIONES

1. Los valores de la población bacteriana en las zonas anaerobia y anóxica fueron de  $6,4 \times 10^7$  UFC y  $4,1 \times 10^6$  UFC respectivamente.
2. Las bacterias identificadas en la zona anaerobia fueron: *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*.
3. Se contiene en la zona anóxica uno de los principales grupos bacterianos que producen la desnitrificación: *Pseudomonas aeruginosa*.
4. Las bacterias identificadas en la zona anóxica fueron: *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus thermoglucosida* y *Bacillus cereus*.
5. La curva de crecimiento de la zona anóxica presentó una fase de crecimiento a partir de la hora 2.
6. La curva de crecimiento de la zona anaerobia muestra un comportamiento de un consumo rápido del sustrato.



## RECOMENDACIONES

1. Realizar estudio de concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y ortofosfatos en la zona anaerobia para validar la eficiencia del proceso de acumulación de los AGV y la liberación de los fosfatos con la finalidad de poder detallar la eficiencia de esta síntesis.
2. Realizar un estudio adicionando metanol en la etapa anóxica de manera de incrementar la carga orgánica para validar si existe mejoría en el proceso de desnitrificación.
3. Colocar un sistema de autorregulación a las bombas de agitación de las zonas anaerobia y anóxica.
4. Repetir las curvas de crecimiento con la finalidad de dar continuidad a la medición por al menos 20 horas con la finalidad de validar los comportamientos de los grupos bacterianos identificados en las zonas evaluadas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abreu, A. (2003). Evaluación **Microbiana de los reactores biológicos de una planta de tratamiento de aguas residuales. Caso: Mavesa. U.N. Limpieza.** Trabajo de Grado para la Licenciatura de Química, Universidad de Carabobo. Valencia - Venezuela.

Bohinski. (1978). Bioquímica. Editorial: Fondo Educativo Interamericano. 2da Edición.

Castellanos, P y Moreno, M. (2002). **Avances en Calidad Ambiental.** [Libro en línea]. Ediciones Universidad Salamanca. Disponible en: <http://books.google.co.ve/books>.

Crites y Tchobanoglous. (2004). **Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones.** Editorial McGraw - Hill Interamericana, S.A.

Guzmán, Luis (2007). **Contaminación del agua. Ingeniería del Ambiente.** [Presentación en línea]. Disponible en: [www.slideshare.net/daniel526/evaluacin-y-control-de-la-contaminacin-del-agua-1-presentation](http://www.slideshare.net/daniel526/evaluacin-y-control-de-la-contaminacin-del-agua-1-presentation).

Madigan,T - Martinko,J y Parker, J. **Biología de los Microorganismos.** Editorial: Pearson Prentice Hall. 10ma Edición.

Mallia, A y Dautant, R. (2008). **Evaluación de un reactor biológico del tipo Bio-Activado para la remoción de carga orgánica a escala laboratorio.** Ponencia presentada en el XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS), Santiago de Chile, Chile.

Ministerio del Poder Popular para el Ambiente. **Información Estadística.** [Presentación en línea]. Disponible en: [www.minamb.gob.ve/](http://www.minamb.gob.ve/)

Montero O, Pedro A (2009). **Evaluación del proceso de desnitrificación en reactores escala piloto tipo Bioactivado RDS con remoción de nutrientes.** Trabajo de Grado de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Mota, Ma. Carolina (2009). **Evaluación de los parámetros físico-químicos y biológicos durante el proceso de nitrificación y des nitrificación en un reactor del tipo bioactivado con remoción de nutrientes a escala de laboratorio.** Trabajo de Grado de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Carabobo. Valencia – Venezuela.

Rodrigo, M y Ferrer, J. (1999). **Tratamiento de aguas residuales.** Ediciones de la Universidad de Castilla - La Mancha.

Rodríguez, J (2011). **Tratamiento anaerobio de aguas residuales.** [Documento en línea]. Departamento de Ingeniería Sanitaria de la Universidad El Valle, Cali - Colombia. Disponible en: [www.ingenieroambiental.com/4014/tratamiento545.pdf](http://www.ingenieroambiental.com/4014/tratamiento545.pdf).

Villaseñor, José. (2001). **Eliminación biológica de fósforo en aguas residuales urbanas.** [Libro en línea]. Ediciones de la Universidad de Castilla - La Mancha. Disponible en: <http://books.google.co.ve/books>.

## APENDICE A

### A.1. Evaluación físico-química del sistema.

Para la evaluación de las aguas de entrada y salida del sistema se determinaron los siguientes parámetros físico-químicos: Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), Nitrógeno Total, Nitrógeno Amoniacal y Fósforo. Es importante destacar que las condiciones de operación fueron las siguientes: DBO de entrada de 1500mg/L y caudal de entrada de 120L/d.

**Tabla 3. Parámetros físico-químicos de entrada y salida del sistema.**

<b>Parámetro evaluado</b>	<b>Entrada (mg/L)</b>	<b>Salida (mg/L)</b>	<b>% Remoción</b>
<b>DBO</b>	1804,00	33,33	99,83
<b>DQO</b>	2914,67	30,33	98,96
<b>Nitrógeno Total</b>	89,98	13,25	90,32
<b>Nitrógeno Amoniacal</b>	21,65	0,34	98,07
<b>Fósforo</b>	54,84	20,27	61,96

(Abreu Adriana, 2013)

Para el caso de las aguas residuales a la entrada y salida de las zonas en estudio (Anaerobia y Anóxica) se evaluaron los parámetros: DBO, nitrógeno Amoniacal, nitrógeno en forma de Nitritos y Nitratos y Fósforo.

**Tabla 4. Parámetros físico-químicos del sistema anaerobio.**

<b>Parámetro evaluado</b>	<b>Resultado (mg/L)</b>
<b>DBO</b>	71,00
<b>Nitrógeno Amoniacal</b>	12,35
<b>Nitratos</b>	1,53
<b>Nitritos</b>	0,08
<b>Fósforo</b>	58,77

(Abreu Adriana, 2013)

**Tabla 5. Parámetros físico-químicos del sistema anóxico.**

<b>Parámetro evaluado</b>	<b>Resultado (mg/L)</b>
<b>DBO</b>	24,00
<b>Nitrógeno Amoniacal</b>	3,64
<b>Nitratos</b>	1,10
<b>Nitritos</b>	0,08
<b>Fósforo</b>	46,39

(Abreu Adriana, 2013)