UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

CARACTERIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES BACTERIANAS PRESENTES EN EL HUMEDAL ARTIFICIAL 1 DE LA UAM IZTAPALAPA

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N E N T A :

BIÓL. NANCY NAYELI DOMÍNGUEZ ALFARO

ASESORA: DRA. MÓNICA A. MERAZ RODRÍGUEZ

COASESORA: DRA. Mª DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE, 2012

DIRECTORA:

DRA. MÓNICA A. MERAZ RODRÍGUEZ

CODIRECTORA:

DRA. Ma. DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

LECTORA:

DRA. PATRICIA CASTILLA HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado con una beca para realizar la Especialidad en Biotecnología del Proyecto INE/A1-016/2010 “Estudio y evaluación del tratamiento de aguas residuales con reactores de flujo ascendente (UASB) y humedales artificiales” .

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL 3
ÍNDICE DE CUADROS 5
ÍNDICE DE FIGURAS 6

RESÚMEN 7

1. INTRODUCCIÓN
1.1 Aguas residuales 8
1.1.1 Aguas residuales industriales y municipales 8
1.1.2 Sistema de tratamiento de aguas residuales 9
1.1.3 Sistema natural para la depuración de aguas residuales 11
1.2 Humedales Artificiales 12
1.2.1 Clasificación de humedales artificiales por tipo de macrófitas 12
1.2.2 Clasificación de humedales artificiales por flujo de agua 13
1.2.3 Papel de las macrófitas en los humedales artificiales 14
1.3 Ciclos biogeoquímicos 17
1.3.1 Ciclo del carbono 17
1.3.2 Ciclo del nitrógeno 18
1.3.3 Ciclo del azufre 20
1.4 Actividades microbianas en humedales artificiales 22

2. ANTECEDENTES 26

3. JUSTIFICACIÓN 27

4. HIPÓTESIS 28

5. OBJETIVOS
5.1 Objetivo general 29
5.2 Objetivos particulares 29

6. METODOLOGÍA

6.1 Diagrama de flujo 30

6.2 Muestreo 31

6.3 Análisis fisicoquímicos 32

6.4 Análisis microbiológicos

6.4.1 Actividades metanogénicas 34

6.4.2 Actividades desnitrificantes 35

6.4.3 Actividad anammox 36

6.4.4 Actividad sulfato reductora 36

6.5 Análisis de los sustratos consumidos y productos formados 37

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Perfiles de materia orgánica y nutrientes del humedal artificial 1 38

Discusión de resultados fisicoquímicos 43

7.2 Actividades microbiológicas encontradas en el humedal artificial 1 45

Discusión de resultados microbiológicos 52

8. CONCLUSIONES 55

9. BIBLIOGRAFÍA 56

10. ANEXO 61

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1.1	Procesos de depuración en humedales artificiales	16
CUADRO 1.2	Porcentaje de materia orgánica eliminada en humedales artificiales	24
CUADRO 2.1	Características del reactor UASB en la UAM Iztapalapa	26
CUADRO 2.2	Características de los humedales artificiales en la UAM Iztapalapa	26
CUADRO 3.1	Sustratos de actividades metanogénicas	34
CUADRO 3.2	Sustratos de actividades desnitrificantes	35
CUADRO 3.3	Sustratos de actividad anammox	36
CUADRO 3.4	Sustratos de actividad sulfato reductora	36
CUADRO 4.1	Comparación de nutrientes en humedales artificiales	42
CUADRO 4.2	Actividades bacterianas del humedal artificial 1 UAM Iztapalapa	50
CUADRO 4.3	Velocidad de formación de productos de las reacciones metanogénicas	51
CUADRO 4.4	Balance molar de las reacciones desnitrificantes	51
CUADRO 4.5	Comparación de actividades bacterianas	53
CUADRO 5.1	Preparación de medio basal	69
CUADRO 5.2	Preparación de medio mineral	70
CUADRO 5.3	Preparación de medio anammox	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Procedimiento general para el tratamiento de aguas residuales	9
FIGURA 1.2	Esquema de la estructura de un humedal de flujo sub-superficial	14
FIGURA 2.1	Esquema del ciclo del carbono	18
FIGURA 2.2	Esquema del ciclo del nitrógeno	20
FIGURA 2.3	Esquema del ciclo del sulfuro	21
FIGURA 3.1	Esquema de la planta de tratamiento de agua residual de la UAM Iztapalapa	31
FIGURA 4.1	Perfil de materia orgánica del humedal artificial 1	37
FIGURA 4.2	Perfil de amonio del humedal artificial 1	39
FIGURA 4.3	Perfil de nitrato del humedal artificial 1	39
FIGURA 4.4	Perfil de nitrito del humedal artificial 1	40
FIGURA 4.5	Perfil de sulfuro del humedal artificial 1	40
FIGURA 4.6	Perfil de fosfato del humedal artificial 1	41
FIGURA 4.7	Actividad metanogénica acetoclástica	45
FIGURA 4.8	Actividad metanogénica hidrogenotrófica	45
FIGURA 4.9	Actividad metanogénica con agua residual	46
FIGURA 4.10	Actividad desnitrificante heterótrofa con acetato	47
FIGURA 4.11	Actividad desnitrificante autótrofa con sulfuro	47
FIGURA 4.12	Actividad desnitrificante autótrofa con tiosulfato	48
FIGURA 4.13	Reacción anammox	49
FIGURA 4.14	Actividad sulfato reductora	49
FIGURA 5.1	Curva de calibración de amonio	62
FIGURA 5.2	Curva de calibración de nitrato	63
FIGURA 5.3	Curva de calibración de nitrito	64
FIGURA 5.4	Curva de calibración de sulfuro	65
FIGURA 5.5	Curva de calibración de fosfato	66
FIGURA 5.6	Curva de calibración de DQO	68

RESUMEN

La materia orgánica de las aguas residuales domésticas está formada por materia fecal, hidratos de carbono (celulosa, almidón y azúcares), grasas y jabones (sales metálicas de los ácidos grasos), detergentes sintéticos, proteínas y sus productos de descomposición (urea, glicina y cisteína), hidróxido de amonio y sales amoniacales procedentes de la descomposición de complejos orgánicos nitrogenados **(Rivas, 1978; Knobelsdorf, 2005).** La eliminación de la materia orgánica del agua residual se debe fundamentalmente a la degradación biológica de la misma por parte de microorganismos a través de sus diferentes rutas metabólicas **(Vymazal et al., 2006).**

En la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I) se cuenta con un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB), para el tratamiento de una fracción de las aguas residuales municipales generadas en la Unidad **(Cervantes-Zepeda et al., 2011)**. Recientemente se instalaron dos humedales artificiales de flujo combinado que sirven como postratamiento al agua residual tratada en el reactor UASB. En ellos se encuentran cultivos de tres especies de plantas, *Juncus effusus* L. (carrizo), *Cyperus papirus* L. (papiro) y *Sparaxis bulbifera* (Iridaceae). El objetivo general del proyecto fue el de evaluar la actividad microbiana de los sólidos sedimentados que se pudieran encontrar en el humedal y su participación en el funcionamiento del humedal artificial como sistema de postratamiento de agua residual de la UAM Iztapalapa. El humedal artificial 1 se muestreó durante el trimestre 12-I se calculó una remoción promedio de 48.3% de materia orgánica y 9.7% de compuestos nitrogenados.

Posteriormente se extrajo biomasa del fondo del humedal y se encontraron distintas actividades microbianas; metanogénica: 19.05 mg CH_4/g SSV·d por bacterias acetoclásticas. 16.13 mg CH_4/g SSV·d por bacterias hidrogenotrofas y con agua residual como sustrato 28.05 mg CH_4/g SSV•d. Actividades desnitrificantes: heterótrofa (17.08 mg N-N_2/g SSV·d), autótrofa con sulfuro (15.78 mg N-N_2/g SSV·d) y autótrofa con tiosulfato que fue de 120.53 mg N-N2/g SSV·d siendo la más alta realizada por bacterias desnitrificantes. También se observaron la actividad anammox con un valor de 1.27 mg N-N_2/g SSV·d y sulfato reductora (10.23 mg DQO-S^{2-}/g SSV•d).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aguas residuales

Cuando el agua es contaminada por diversas fuentes como son los desechos domésticos, industriales y agrícolas, los derrames de petróleo y la contaminación térmica, se le denomina entonces como aguas negras o residuales. Los contaminantes hidrológicos se pueden clasificar en físicos (material flotante, suspendidos, depositable, espumas, líquidos insolubles, calor), químicos (compuestos orgánicos, iones inorgánicos, material radiactivo) y biológicos (bacterias y hongos, algas y vegetales, protozoarios y virus).

1.1.1 Aguas residuales industriales y municipales

Los contaminantes de tipo industrial son residuos peligrosos entre los que se encuentran gran cantidad de compuestos orgánicos, hidrocarburos y metales. El agua se utiliza en variados procesos industriales, sobretodo en países desarrollados por lo que la posibilidad de contaminación en estos sitios es más alta. Gran parte de los vertidos residuales son generados en la industria química, y otras industrias relacionadas.

En general se consideran aguas residuales domésticas a los líquidos provenientes de las viviendas o residencias, edificios comerciales e institucionales. También se acostumbra denominar aguas negras a las aguas residuales provenientes de inodoros, es decir, aquellas que transportan excrementos humanos y orina, ricas en sólidos suspendidos, nitrógeno y coliformes fecales. Y aguas grises a las aguas residuales provenientes de tinas, duchas, lavamanos y lavadoras, aportadoras de DBO, sólidos suspendidos, fósforo, grasas y coliformes fecales, esto es aguas residuales domésticas, excluyendo las de los inodoros **(Romero, 2004)**.

La materia orgánica de un agua residual urbana o doméstica está formada mayoritariamente por materia fecal. Además, también contiene hidratos de carbono (celulosa, almidón y azúcares), grasas y jabones (sales metálicas de los ácidos grasos), detergentes sintéticos, proteínas y sus productos de descomposición (urea, glicina y cisteína) así como hidróxido de amonio y sales amoniacales procedentes de la descomposición de complejos orgánicos nitrogenados **(Rivas, 1978; Knobelsdorf, 2005).**

1.1.2 Sistema de tratamiento de aguas residuales

Los sistemas de tratamiento de las aguas residuales consisten en una serie de procedimientos que tratan de devolver al medio natural el agua, una vez empleada para diferentes usos, a través de métodos físicos, químicos y biológicos **(Eilbeck & Mattock, 1987; Ramahlo, 1991)**. De manera general las etapas de un sistema de tratamiento son (Fig. 1.1):

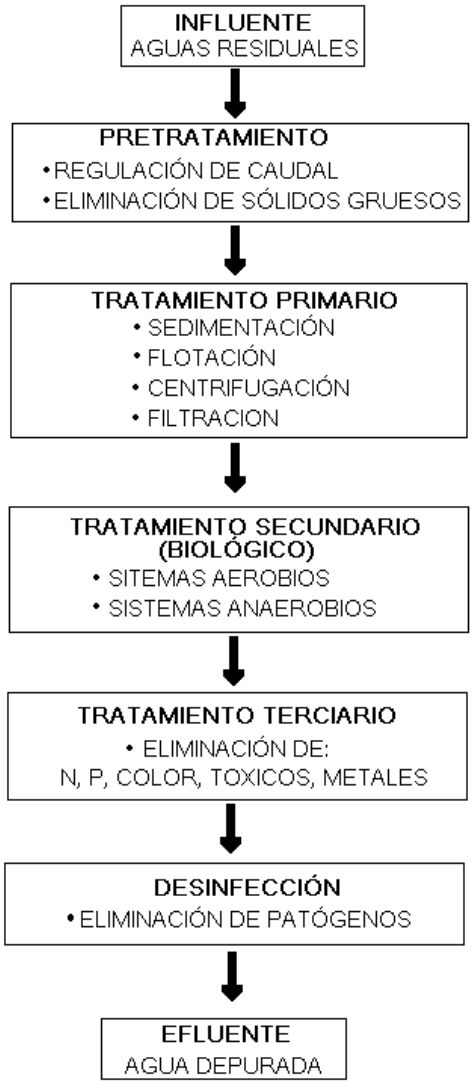


Figura 1.1 Procedimiento general para el tratamiento de aguas residuales.

a) Pretratamiento: es la separación de sólidos en suspensión o flotantes de gran tamaño y densidad **(Kelly, 1998)**

- *Desbaste o retención:* a través de rejas finas o gruesas de los materiales más voluminosos. Posteriormente, y mediante una cinta trasportadora depositan en contenedores para su trasporte a vertederos municipales o incineradoras.
- *Desarenado:* o sistema de circulación del agua en cámaras a velocidades controladas para provocar el depósito de arenas en el fondo y su posterior extracción y eliminación. Para evitar malos olores se procede a inyectar aire durante el proceso
- *Desengrasado:* O eliminación de grasas, aceites, y otros materiales flotantes. Su mecanismo es igual que el anterior.

b) Tratamiento primario

La primera etapa de un sistema de tratamiento de residuos líquidos incluye normalmente, la separación de sólidos y material no disuelto (ej.: grasas, coloides), neutralización de pH, regulación de caudal y estabilización térmica **(Ramahlo, 1991)**.

La variedad de sistemas disponibles comercialmente es muy amplia. Los sólidos se eliminan usando mecanismos de sedimentación o flotación. Es necesario neutralizar y estabilizar el flujo y composición del efluente **(Kelly, 1998)**.

c) Tratamiento secundario (microbiológico)

El material orgánico solubilizado o en estado coloidal, puede ser utilizado como fuente de carbono por parte de microorganismos existentes en el medio, transformándolos en subproductos volátiles y en componentes celulares. A su vez, las células microscópicas pueden ser separadas del efluente, utilizando técnicas de separación sólido-líquido **(Eilbeck & Mattock, 1987)**.

Estos principios son utilizados en los sistemas de tratamiento biológico de efluentes contaminados con material orgánico bioutilizable. Las diferencias entre los diferentes procesos, se manifiestan en el tipo de microorganismos utilizados, la configuración de los biorreactores, su modo de operación y el tipo de actividad biológica presente **(Davis & Cornwell, 1991)**.

En estos sistemas, los contaminantes orgánicos son degradados por organismos que los transforman en compuestos más sencillos, de fácil eliminación (ej.: CO_2, CH_4) o incorporados al proceso de síntesis de material celular y, por lo tanto, concentrados en la biomasa. Esta última puede entonces ser eliminada con más facilidad por procesos de separación sólido-líquido **(Eilbeck & Mattock, 1987)**. Los microorganismos juegan un papel fundamental en los sistemas de tratamiento de residuos líquidos. En términos generales, los microorganismos heterótrofos necesitan carbono, nitrógeno, fósforo y trazas de metales para llevar a cabo las reacciones metabólicas y reproducirse. Dichos microorganismos se clasifican en aeróbicos *y* anaeróbicos **(Kelly, 1998)**.

d) Tratamiento terciario

En esta etapa se ocupan métodos avanzados, complementarios o alternativos realizados para extraer materia orgánica suplementaria no eliminadas anteriormente o para reducir nutrientes como N, P y sus compuestos: sales inorgánicas disueltas que se retienen por procesos de filtración, decantación o biológicos **(Ramahlo, 1991)**. En esta categoría se incluye sistemas para eliminar otros contaminantes, tales como: metales, nitrógeno, fósforo, compuestos coloreados, y compuestos no biodegradables **(Ramahlo, 1991)**.

e) Desinfección

El proceso de desinfección es un tratamiento final destinado a evitar problemas de salud debido a la existencia de bacterias y virus patógenos en el agua. Su utilización está en función del grado de eficacia de los tratamientos anteriores **(Davis & Cornwell, 1991)**.

1.1.3 Sistema natural para la depuración de aguas residuales

Cauces fluviales (como ríos arroyos, etc.) y humedales han sido receptores directos o indirectos de gran parte de los residuos líquidos generados por el hombre; estos ecosistemas, gracias a sus procesos de autodepuración, han soportado y depurado las cargas contaminantes que reciben. Actualmente, el ritmo de generación de residuos líquidos así como las características cualitativas de los mismos han superado a la autodepuración **(Rodríguez-Roda et al., 2008)**.

Por ello, se han desarrollado distintos sistemas para tratar y depurar las aguas residuales. Los sistemas naturales de depuración del agua son tecnologías que toman a los ecosistemas naturales acuáticos como base para su diseño puramente ecológico **(Martel et al., 2006)**. El funcionamiento de un sistema natural y el de un sistema convencional es el mismo. La principal diferencia radica en la velocidad a la que ocurren los procesos de depuración. En un sistema convencional el proceso de depuración se realiza de forma secuencial y a velocidades altas, forzando el sistema mediante el aporte de energía y, en algunos casos, de reactivos. En los sistemas naturales se trabaja a velocidad natural según los procesos, sin gasto energético ni de otros reactivos. Tratándose de sistemas con aireación natural y baja concentración de bacterias, requiere superficies grandes de terreno frente a la aireación mecánica, alta concentración de bacterias y poca superficie del reactor de los sistemas convencionales **(Metcalf & Eddy, 2003)**. En los sistemas naturales el control del proceso es más complicado que en los tratamientos convencionales.

Los sistemas naturales se pueden clasificar de varias formas, según la intensidad del tratamiento o al tipo de biomasa activa. En algunos casos, los sistemas imitan las condiciones propias de los humedales naturales (humedales artificiales) o los procesos naturales de lagos y ríos (lagunajes). En otros casos se emplea el suelo como sistema natural para depurar (filtros verdes, zanjas, pozos y lechos filtrantes); estos sistemas o tecnologías no son independientes, por lo que se requiere una combinación de los mismos para lograr el grado de depuración deseado **(Rivas, 1978)**.

1.2 Humedales artificiales

Los humedales naturales se definen como aquellos lugares terrestres que permanecen inundados o saturados de agua, en ellos se desarrolla un tipo de vegetación característica, palustre, como por ejemplo, los carrizales, espadañales, juncales o los maciegales **(Kivaisi, 2001)**. La vegetación está adaptada a vivir con una fuerte limitación de oxígeno disponible en el suelo, es decir, en condiciones de anaerobiosis que normalmente no soportan las plantas terrestres. Se caracterizan por la acumulación de materia orgánica debido a la alta tasa de productividad primaria y a un tipo reducido de descomposición debido a la condición anaeróbica **(Hammer & Bastian, 1989)**. Los humedales artificiales reproducen la dinámica de los humedales naturales, constituyendo delicados ecosistemas, que combinan procesos físicos, químicos y biológicos en un medio diseñado, construido y manejado por el hombre **(Vymazal et al., 2006)**.

1.2.1 Clasificación de humedales artificiales por tipo de micrófitos

Según el esquema clásico de **Brix (1993)** los humedales artificiales pueden clasificarse en función del tipo de macrófito dominante en el ecosistema, tales como:

1. Sistemas con macrófitos flotantes. Pueden estar enraizadas al sustrato con hojas flotantes (por ejemplo el jacinto de agua, *Eichornia crassipes*, o la lechuga de agua, *Pistia stratiotes*), o presentar pequeñas o inexistentes raíces (por ejemplo las lentejas de agua, *Lemna sp.* y *Spirodela polyrhiza*) **(Brix & Schierup, 1989)**.

2. Sistemas con macrófitos sumergidos. Tienen su sistema fotosintético totalmente sumergido (por ejemplo, *Elodea nuttallii*).

3. Sistemas con macrófitos emergentes. Se encuentran enraizados al sustrato y su sistema fotosintético está por encima de la lámina de agua **(Vaillant-Gaveau et al., 2010)**. Es el caso de especies como la enea (*Typha latifolia*), el carrizo (*Phragmites australis*), o el lirio amarillo (*Iris pseudacorus*).

1.2.2 Clasificación de humedales artificiales por flujo de agua

Un aspecto diferencial con respecto a los humedales naturales, son el hecho de que el flujo de agua es más estable y no está sometido necesariamente a fluctuaciones estacionales, el tiempo de retención está controlado por el operador, y la carga contaminante es más elevada. Sin embargo, y a semejanza de lo que ocurre en los humedales naturales la influencia de los parámetros climáticos (precipitación, radiación, temperatura) en el comportamiento del humedal es importante. En función de la circulación del agua en el humedal se dividen en dos subtipos principales:

a) *Humedales de flujo hidráulico superficial*. Presentan una lámina de agua no muy profunda que fluye por encima del sustrato, está expuesta directamente a la atmósfera y circula preferentemente a través de los tallos de los macrófitos **(García et al., 2004)**.

b) *Humedales de flujo hidráulico subsuperficial*. El agua discurre en ellos a través de un medio granular muy permeable que se encuentra en contacto con los rizomas y las raíces de los macrófitos. Dentro de este tipo de humedales de flujo subsuperficial existen a su vez, dos modalidades diferentes: humedales con flujo horizontal y humedales con flujo vertical o mixto **(Vymazal, 2005)**.

Los sistemas más comunes están diseñados con una superficie de agua libre o con flujo horizontal del agua debajo de la superficie, la cual está formada por el material en el que se arraigan los macrófitos, por ejemplo, piedra de tezontle, grava, zeolita, piedra de río. El diseño consiste en una cama regular recubierta en el fondo con una membrana impermeable y rellena con el material que formará el sustrato (figura 1.2). El flujo del agua pasa a través de la cama en un patrón de flujo horizontal, los humedales se inundan al nivel del agua en el que las raíces permanezcan sumergidas, y puedan tomar los nutrientes necesarios del agua residual o tratada, como por ejemplo, fósforo, nitrógeno, minerales, metales, etc., incorporándolos junto con el CO_2 atmosférico como biomasa vegetal.

Adicionalmente varios microambientes se implantarán en el humedal: aerobio, anóxico y anaerobio, y junto con las plantas llevarán a cabo la remoción de carbono orgánico y el resto de los nutrientes incorporándolos como biomasa **(Ramírez-Carrillo et al, 2009)**.

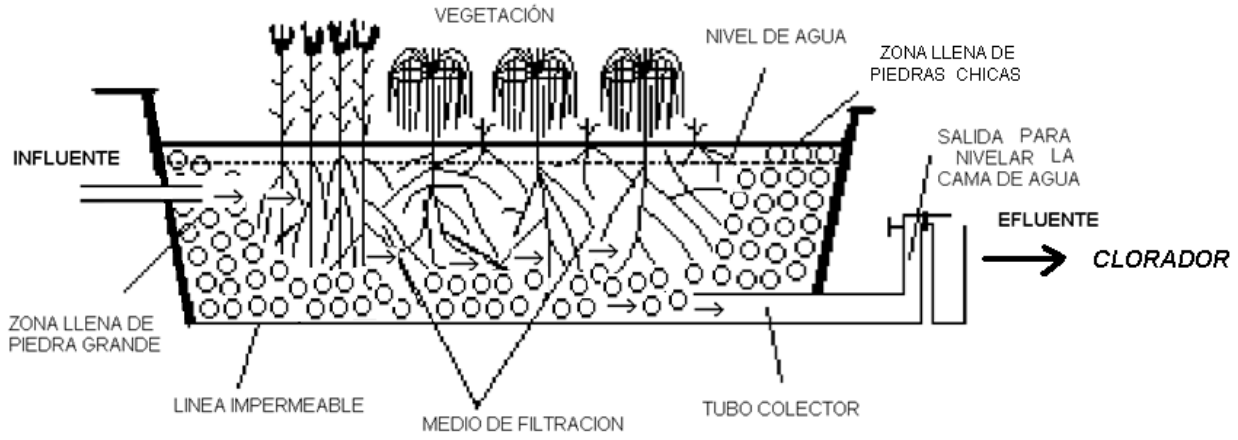


Figura 1.2 Esquema de la estructura de un humedal de flujo Subsuperficial.

1.2.3 Papel de las macrófitas en los humedales artificiales

Las macrófitas en los humedales utilizados cómo sistemas de tratamiento de aguas residuales, desempeñan papeles múltiples en el buen funcionamiento del sistema, tratándose tanto de actuaciones activas derivadas de la actividad fisiológica de la vegetación como actuaciones pasivas, en las que no intervienen éstos **(Pérez-Olmedilla & Rojo, 2000)**. En primer lugar pueden ejercer funciones de desbaste, reteniendo los sólidos gruesos arrastrados por el agua residual, reducen la velocidad del influente, lo que favorece la floculación y la sedimentación de partículas en suspensión **(Coleman et al., 2001)**.

Por otro lado, las partes de las plantas que están en contacto con el influente, actúan como soporte pasivo de microorganismos y crean en sus proximidades ambientes propicios para el desarrollo de estos; una enorme área superficial para el desarrollo de 'bio-películas', en las que crecen bacterias y protozoos **(Rodríguez-Monroy & Durán-de-Bazúa, 2006)**.

Con respecto a las funciones que desempeñan activamente se destaca: el intercambio gaseoso desde las hojas hacia la zona radicular en contacto con el agua residual, y la extracción de contaminantes del agua **(Pérez-Olmedilla & Rojo, 2000)**.

Las macrófitas están adaptadas a vivir en aguas con elevada carga orgánica, utilizan su propia energía procedente de la energía solar captada por fotosíntesis, son capaces de enviar el oxígeno del aire hasta sus raíces a través de un sistema conductor muy especializado. Esto favorece la degradación de la materia orgánica del entorno de las raíces por medio de los microorganismos que viven asociados al sistema radicular de la planta.

También las macrófitas pueden ejercer una depuración directa por la absorción de iones contaminantes, tanto metales pesados como aniones eutrofizantes (nitratos y fosfatos principalmente) cómo macronutrientes (N, P, K), micronutrientes (S, Ca, Mg) y oligoelementos (Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo) que se encuentran en proporciones muy pequeñas, en sus tejidos.

Los procesos que conducen a la remoción de la materia orgánica son de dos tipos: físicos y biológicos, ambos estrechamente inter-relacionados. La materia orgánica que llega en el influente puede encontrarse en forma de partículas, coloides, supracoloides o disuelta. En los tres primeros casos, los principales procesos que conducen a su separación física son similares a los indicados para los sólidos en suspensión: sedimentación.

Además, pueden darse procesos de adsorción y absorción en la materia orgánica disuelta, procesos que genéricamente se denominan procesos de "sorción" y que están relacionados con las características superficiales del sólido o cuerpo sobre el que se producen. En los procesos biológicos intervienen organismos vivos (micro y macroscópicos) e influyen de manera drástica sobre factores como la disponibilidad de oxígeno, el pH del medio, y la temperatura. En estos procesos se pueden dar reacciones de oxidación/reducción, hidrólisis y fotólisis, que conducen a la biodegradación de la materia orgánica (ver Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Procesos que contribuyen a la depuración de aguas residuales en Sistemas de Plantas Acuáticas (SPA), Humedales de Flujo Superficial (HFS), Humedales de Flujo Subsuperficial (HFSS), Humedales de Flujo Vertical (HFV) **Arias & Brix, 2003**.

Contaminante	SPA	HFS	HFSS	HFV
Materia Orgánica	Conversión Biológica por acción de bacterias aerobias, facultativas y anaerobias adheridas a las superficies de las plantas y los detritos.	Reducción de la DBO soluble por conversión biológica por efecto de bacterias aerobias, facultativas y anaerobias que crecen en la superficie de las plantas y los detritos. La DBO particulada se elimina por absorción, filtración y sedimentación.	Reducción por conversión biológica por acción bacterias facultativas y anaeróbicas adheridas a las superficies de las plantas y los detritos.	Reducción por conversión biológica por medio de bacterias facultativas y anaeróbicas adheridas a las superficies de las plantas y los detritos.
Materia en suspensión	Sedimentación	Filtración y sedimentación.	Filtración y sedimentación.	Filtración.
Nitrógeno	Procesos de Nitrificación/Desnitrificación	Procesos de Nitrificación/Desnitrificación, asimilación por las plantas y volatilización.	Nitrificación/Desnitrificación, asimilación por las plantas y volatilización.	Nitrificación/Desnitrificación, asimilación por las plantas y volatilización.
Fósforo	Reducción por precipitación y por asimilación por plantas y microorganismos	Reducción por sedimentación, y por asimilación por plantas y microorganismos.	Por filtración, por sedimentación, adsorción, por asimilación por parte de las plantas y los microorganismos.	Filtración, por sedimentación, y asimilación por las plantas.
Metales Pesados	Sedimentación por absorción de plantas	Absorción a las plantas, superficie de detritos y por sedimentación.	Absorción por las raíces de las plantas y los detritos, sedimentación.	Absorción por las raíces de las plantas, sedimentación y filtración.
Trazas de Contaminantes Orgánicos	Volatilización, adsorción y biodegradación.	Volatilización, adsorción y biodegradación.	Adsorción y biodegradación.	Volatilización, adsorción y biodegradación.
Patógenos	Muerte natural, radiación UV. Depredación por otros organismos.	Muerte natural, depredación, radiación UV, sedimentación, secreción de antibióticos de las raíces de las platas.	Por muerte natural, por depredación, sedimentación, secreción de antibióticos desde las raíces de las plantas.	Por muerte natural, depredación, sedimentación, secreción de antibióticos de las raíces de las plantas.

1.3 Ciclos biogeoquímicos

Un ciclo biogeoquímico es el proceso en el que un nutrientes es reutilizado en un ecosistema, juega un papel importante en el funcionamiento de los sistemas ecológicos **(Odum, 1986)**. En un ciclo el proceso se reinicia continuamente, en el que se producen, liberan y reintegran nutrientes o sustancias químicas necesarias para el funcionamiento de los seres vivos. En ellos participan factores bióticos y abióticos del medio **(Arms, 1990)**.

1.3.1 Ciclo del carbono

El 99% del carbono del planeta se encuentra presente en las rocas en forma de carbonato (normalmente, como $CaCO_3$) o como carbono orgánico disperso. El 1% restante se encuentra presente en: la atmósfera, los seres vivos, los combustibles fósiles y compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos en agua. Los organismos vivientes están compuestos principalmente de agua y de una amplia gama de compuestos orgánicos **(Agueda et al., 1983)**. El carbono acompaña estrechamente al ciclo del oxígeno en los procesos fotosintéticos y en los procesos de oxidación de materia orgánica, ya sea por la combustión o por actividad biológica **(Odum, 1986)**. El CO_2 generado por la oxidación de compuestos orgánicos se disuelve fácilmente en agua. Más del 98% del CO_2 se encuentra disuelto en los océanos (como HCO_3^- y $CO_3^=$), mientras que el 2% restante se mantiene en la atmósfera **(Arms, 1990)**.

La actividad fotosintética mantiene un fino balance en el ciclo del carbono y del oxígeno. A través de la fotosíntesis se forman los compuestos orgánicos, utilizando CO_2 como fuente de carbono. Los productores primarios en el océano son las algas unicelulares a la deriva (llamadas fitoplancton), las que sirven de alimento al zooplancton **(Turk et al., 1981)**. A su vez, ambos son el alimento de los organismos acuáticos superiores (necton y bentos). Así, el carbono se mueve continuamente desde la atmósfera hacia la cadena alimenticia, a través de la fotosíntesis, retornando a la atmósfera durante la respiración y oxidación de la materia orgánica muerta. Una pequeña parte de la materia orgánica se deposita en los sedimentos, junto con los carbonatos insolubles **(Grant & Long, 1989)**.

La acción microbiana anaeróbica sobre diversos substratos orgánicos constituye otro vehículo de destrucción de material orgánico y transformación en carbono inorgánico. Dicha actividad biológica anaeróbica ocurre en los intestinos de los mamíferos, en los sedimentos de humedales, en las profundidades marinas y otras zonas anóxicas, contribuyendo a la generación de 500-1000 millones de toneladas de CH_4 anualmente, el que es oxidado a CO_2 en la atmósfera **(Agueda et al., 1983)**.

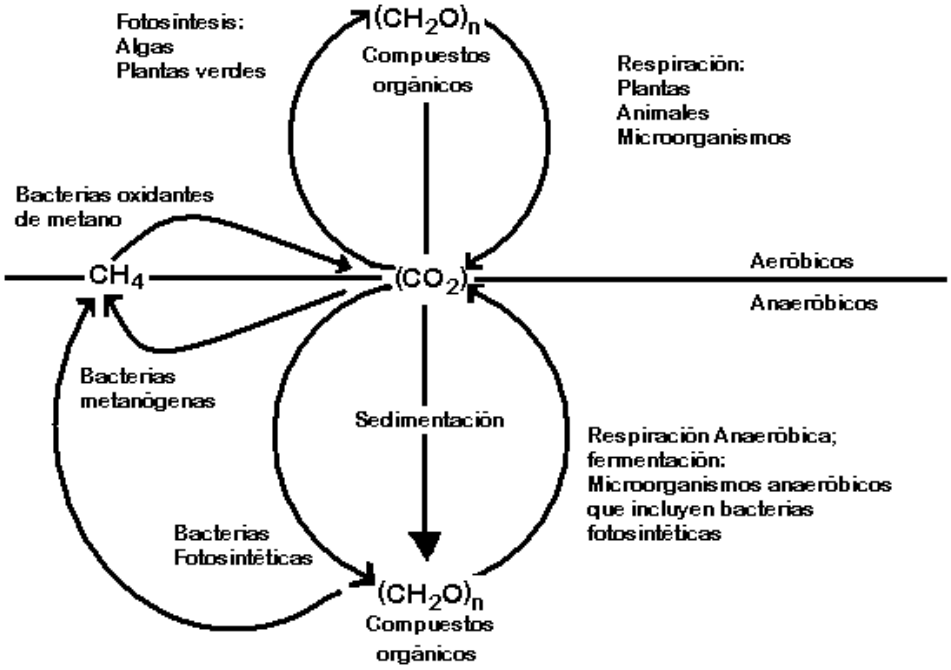


Figura 2.1 Esquema del ciclo del carbono **(Madigan et al. 1998)**.

1.3.2 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno en forma de N_2 representa el 76% en peso de la atmósfera terrestre y constituye la principal reserva de nitrógeno en el planeta; el nitrógeno presente en el suelo proviene mayormente de la atmósfera **(Agueda et al., 1983)**. El N_2 tiene una baja reactividad química y sólo se oxida a altas temperaturas. El nitrógeno es un componente importante de los organismos vivientes, estando presente como grupo amino ($R\text{-}NH_2$) en los aminoácidos y proteínas. Desde el punto de vista bioquímico, pocos organismos pueden utilizar directamente el N_2 atmosférico. Sin embargo, existen varios puentes entre la comunidad biológica y el nitrógeno atmosférico.

Las reacciones fotoquímicas en la atmósfera, las bacterias y algas fijadoras de nitrógeno del suelo y el mar, y las fábricas de fertilizantes químicos construidas por el hombre en el presente siglo, transforman el N_2 en formas utilizables para los seres vivos **(Turk et al., 1981)**. Entre estos agentes, los microorganismos juegan un papel importante en las complejas transformaciones químicas que caracterizan el ciclo geoquímico del nitrógeno, particularmente, en los procesos de asimilación, fijación, desnitrificación, nitrificación y amonificación **(Arms, 1990)**.

El N_2 atmosférico es transformado en NH_3^+ a través de la acción de microorganismos existentes tanto en el agua como en el suelo, en un proceso denominado fijación del nitrógeno (figura 2.2). Existe una comunidad de microorganismos capaces de fijar el N_2, entre ellas: bacterias aeróbicas (ej. *Azotobacter sp., Thiobacillus sp.,* algas verde-azules), bacterias anaeróbicas (ej. *Clostridium sp., Desulfovibrio sp.,* bacterias fototróficas), bacterias en asociación simbiótica con: nódulos de leguminosas (ej. *Rhizobium sp.*), líquenes (ej. Cianobacterias), etc. **(Grant & Long, 1989)**

Las formas más comunes del nitrógeno del suelo que las plantas pueden utilizar directamente son el ion nitrito (NO_2^-), el ion nitrato (NO_3^-) y el ion amonio (NH_4^+). Estos compuestos del nitrógeno son asimilados por las plantas y entran en la cadena alimenticia heterotrófica, incorporándose en los procesos biológicos, transformándose en aminoácidos y proteínas. Cuando los compuestos orgánicos nitrogenados son degradados bioquímicamente, se forman compuestos inorgánicos (principalmente NH_3 / NH_4^+), los cuales son fácilmente asimilables por las plantas y por la mayoría de los microorganismos **(Grant & Long, 1989)**.

En presencia de oxígeno, un amplio grupo de procariotas que habitan en el suelo, las aguas dulces y marinas (ej. *Nitrosomonas sp., Nitrobacter sp, Nitrosococcus sp.*), obtienen su energía oxidando el NH_4^+ a través del proceso de nitrificación**,** produciendo nitrito y nitrato **(Turk et al., 1981)**.

Muchos microorganismos poseen la capacidad de reducir los óxidos de N en condiciones anóxicas, donde dichos compuestos sustituyen al O_2 como aceptor terminal de electrones en la cadena respiratoria. Si la reducción continúa hasta la generación de gases de N_2 y N_2O, el proceso se denomina desnitrificación. Esta capacidad está difundida entre varios microorganismos que habitan en el suelo y el agua. Este proceso representa una vía a través de la cual el nitrógeno disponible en las aguas y el suelo, se pierde a la atmósfera **(Odum, 1986)**. Estas pérdidas de N se suman a los óxidos de nitrógeno generados por la combustión de combustibles fósiles, los que debido a su origen biológico, contienen N.

Además de estos procesos biológicos, el nitrógeno participa en reacciones químicas espontáneas que tienen lugar, principalmente, en la atmósfera. Aparte del N_2O suministrado a la atmósfera por las reacciones de desnitrificación y la combustión de materia orgánica nitrogenada, otros óxidos se generan por oxidación directa del N_2 a altas temperaturas, por ejemplo, debido a los relámpagos o durante la combustión de combustibles fósiles **(Arms, 1990)**.

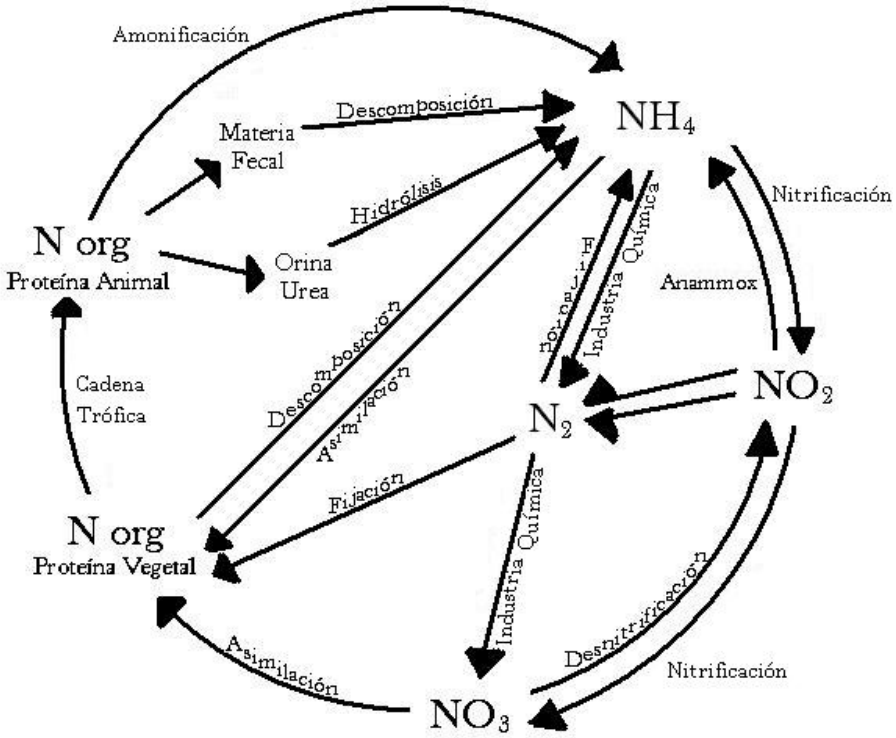


Figura 2.2 Esquema del ciclo del nitrógeno **(Campos et al. 2009)**.

1.3.3 Ciclo del azufre

El azufre tiene su principal reserva en la corteza terrestre, con una pequeña pero importante fracción en la atmósfera. Sin embargo, existe una fuerte analogía entre el ciclo del azufre y el del nitrógeno, con respecto al papel jugado por los microorganismos **(Turk et al., 1981)**. Ambos elementos están presentes en los seres vivos en su forma química más reducida (es decir, N^{-3} y S^{-2}, formando grupos amino e hidrosulfuro, respectivamente). El azufre es un importante constituyente secundario de las proteínas, debido a su habilidad para formar enlaces S-S, lo que permite formar estructuras proteicas en gran escala y de formas tridimensionales especiales **(Agueda et al., 1983)**. Cuando la materia orgánica se descompone, el azufre proteico se transforma en H_2S.

El H_2S se genera principalmente en ambientes terrestres y en marismas, donde prevalecen condiciones anóxicas **(Odum, 1986)**. Muchas especies de fitoplancton marino son capaces de producir dimetil sulfuro ($(CH_3)_2S$) y H_2S a partir de la reducción de los sulfatos presentes. Ambos compuestos son volátiles y sufren una rápida oxidación espontánea en la atmósfera, donde se transforman en SO_2 y, eventualmente,

en sulfato (SO_4^{2-}). La oxidación de los sulfuros también puede ocurrir en el suelo, los sedimentos y en medio acuático, a partir de procesos biológicos (p. e. bacterias tiobacilares).

La utilización del sulfato en las reacciones biológicas involucra un acoplamiento con el ciclo del carbono, donde el sulfato actúa como aceptor de electrones. El sulfato, al igual que el nitrato y el fosfato, son la principal forma química que es reducida por los organismos autótrofos e incorporada a las proteínas **(Grant & Long, 1989)**. El principal compuesto de azufre en la atmósfera es el SO_2, proveniente de fuentes naturales y antrópicas. El dióxido de azufre es generado durante las erupciones volcánicas y durante la combustión espontánea de biomasa forestal **(Arms, 1990; Odum, 1986)**. Las principales fuentes antrópicas son los procesos de combustión de combustibles fósiles y la refinación de minerales sulfurados, lo que constituye un flujo que permite reciclar el azufre desde las profundidades de la tierra a la atmósfera y su depositación como sulfato **(Agueda et al., 1983; Turk et al., 1981)**.

Así de manera general el azufre forma parte de algunos aminoácidos, componentes de las proteínas. Su reserva principal la constituyen los sulfatos y sulfuros presentes en la corteza terrestre, de ahí son absorbidos por los productores, pasan a los consumidores y cuando estos mueren, los desintegradores transforman el azufre orgánico en inorgánico, reintegrándolo al ambiente **(Arms, 1990)**.

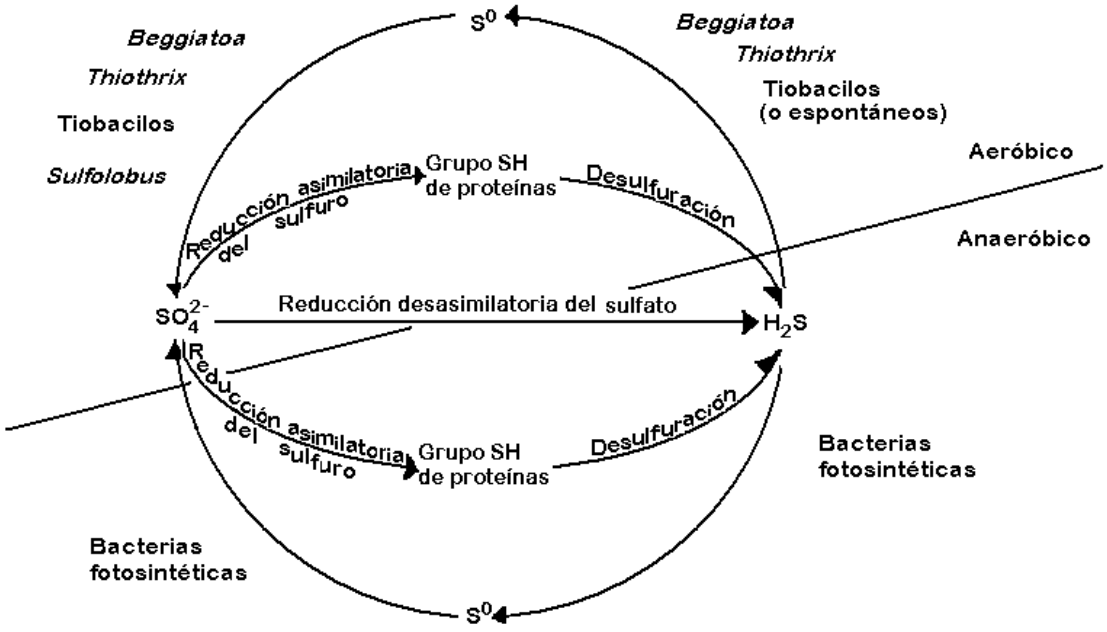


Figura 2.3 Esquema del ciclo del sulfuro **(Madigan et al. 1998)**.

1.4 Actividades microbianas en humedales artificiales

La eliminación de la materia orgánica del agua residual se debe fundamentalmente a la degradación biológica de la misma por parte de microorganismos a través de sus diferentes rutas metabólicas. Otros mecanismos de eliminación son cuantitativamente despreciables en relación a estas transformaciones biológicas **(Vymazal et al., 2006).**

La materia orgánica presente en el agua residual se puede encontrar suspendida y disuelta. En los humedales artificiales de flujo horizontal, la materia orgánica suspendida se deposita por filtración en la zona próxima al influente. En los sistemas de flujo vertical, se deposita cerca de la superficie. Los procesos de fragmentación abiótica reducen el tamaño de las partículas, permitiendo su hidrolización por enzimas extracelulares. Estas enzimas, provenientes de bacterias fermentativas facultativas y heterótrofas aeróbicas, las cuales asimilan los sustratos sencillos resultantes de esta hidrólisis. No es necesaria una hidrólisis previa para su asimilación en el caso de los sustratos sencillos existentes en el agua residual. Los ácidos resultantes son asimilados por bacterias sulfato reductoras, metanogénicas, y por heterótrofas aeróbicas **(García et al., 2004)**.

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$

La degradación anaeróbica se produce en varias etapas y en las zonas del humedal donde hay ausencia de oxígeno disuelto. El proceso es realizado por bacterias heterótrofas de tipo anaeróbico estricto o facultativo. En la primera etapa las moléculas complejas se transforman por fermentación en compuestos sencillos intermedios como:

- ácido acético

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 3\ CH_3COOH + H_2$$

- ácido láctico

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CH_3CHOHCOOH$$

- etanol

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CO_2 + 2\ CH_3CH_2OH$$

- gases como el CO_2 y el H_2.

En una segunda etapa otros grupos de bacterias degradan los productos intermedios. En función del sustrato existente se pueden dar varios procesos, los más importantes son:

a) Metanogénesis **(Ferry, 1993)**:

$$4\ H_2 + CO_2 \longrightarrow CH_4 + 2\ H_2O$$

$$CH_3COO^- + H^+ \longrightarrow CH_4 + CO_2$$

b) Sulfato reducción:

$$2\ CH_3CHOHCOOH + H_2SO_4 \longrightarrow 2\ CH_3COOH + 2\ CO_2 + 2\ H_2O + H_2S$$

$$CH_3COOH + H_2SO_4 \longrightarrow 2\ CO_2 + 2\ H_2O + H_2S$$

c) Desnitrificación:

$$C_6H_{12}O_6 + 4\ NO_3^- \longrightarrow 6\ H_2O + 6\ CO_2 + 2\ N_2$$

Se tiene en cuenta que muchas sustancias disueltas se retienen por adsorción, en la materia orgánica o en el medio granular. Estas pueden simplemente quedar allí, o desplazarse y ser reabsorbidas, o degradadas por microorganismos.

Las bacterias aeróbicas son más eficientes ya que obtienen con un mismo substrato más energía que las bacterias anaeróbicas. El oxígeno necesario para la respiración aeróbica procede de la transferencia directa del aire o del transporte convectivo que realizan las plantas. Diversos estudios indican que el transporte convectivo es de menor importancia a causa de que la mayor parte del oxigeno transportado lo utilizan las plantas para su propio consumo **(Brix, 1993)**. En los sistemas más profundos, la transferencia directa se ve afectada notablemente por la imposibilidad de mezclarse con el aire en toda la profundidad del lecho.

En ausencia de oxígeno, las bacterias heterótrofas anaeróbicas, mediante desnitrificación, consiguen degradar la materia orgánica en un medio anaerobio, usando el nitrato como aceptor de electrones **(García et al., 2004; Cisneros & Noyola, 2010)**.

Esta reacción anóxica está presente en humedales de flujo horizontal, puesto que se ha comprobado la eliminación de amoniaco y la ausencia de nitrato, evidenciando un rápido proceso de desnitrificación **(Carrera et al., 2003; Cervantes-Carrillo et al., 2000)**. No ocurre lo mismo en los humedales de flujo vertical, donde no se elimina el nitrato.

El estudio de la producción de metano en los humedales subsuperficiales es importante ya que la presencia de concentraciones elevadas indica que el proceso no está operando de manera muy eficiente debido a una anaerobiosis muy acentuada. La profundidad del agua, el pH y la temperatura son de gran importancia en la producción de metano, generado en la zona carente de oxígeno y oxidado en su migración hacia la atmósfera por la presencia de oxígeno disuelto.

En la naturaleza existe competencia por los substratos disponibles entre las bacterias metanogénicas y las sulfato reductoras, especialmente por el acetato y el hidrógeno **(Gallegos-García et al., 2010)**. Estos dos tipos de bacterias pueden contribuir a la eliminación de la materia orgánica aunque de una forma menos eficiente que las bacterias aerobias. En presencia de sulfato, y sin oxigeno molecular, resultan siempre favorecidas las bacterias sulfato reductoras, y la reacción se ve únicamente limitada por la materia orgánica presente. No obstante, las bacterias desnitrificantes también contribuyen en el consumo de materia orgánica cuando el nitrato está presente.

En el Cuadro 1.2 se observan los resultados de un trabajo de investigación para un humedal profundo, de 0,5 m, y otro somero, con una profundidad de 0,3 m donde se observa la importancia relativa de las reacciones bioquímicas involucradas en la degradación de la materia orgánica en humedales subsuperficiales **(García et al., 2004)**.

Cuadro 1.2: Porcentaje de materia orgánica eliminada en cada reacción en humedales subsuperficiales de tipo somero y profundo **(García et al., 2004)**.

PROFUNDIDAD	Respiración aerobia	Desnitrificación	Sulfato reducción	Metanogénesis
Somero	9.9%	56.9%	33.2%	0%
Profundo	5.7%	0%	89.4%	4.9%

A grandes rasgos, se concluye que la eliminación de la materia orgánica en humedales someros se produce principalmente por desnitrificación seguida de la sulfato reducción, mientras que en humedales profundos, actúa principalmente la sulfato reducción. Este hecho justifica que en humedales someros se obtengan efluentes de mejor calidad que los profundos ya que permiten una mayor oxigenación (debido al aumento de la velocidad transversal del agua y a la poca profundidad) y una mejor distribución de las raíces y de los rizomas en el medio granular.

En los humedales artificiales no se produce una eliminación completa de materia orgánica por la generación existente en los propios humedales, provocada tanto por restos de plantas como por acumulación de partículas. Se pueden considerar los siguientes valores típicos de concentraciones de fondo: de 1 a 10 mg/L para la DBO_5 y de 30 a 100 mg/L para la DQO **(Kadlec & Knight, 1996; Reed et al., 1995)**.

La eliminación de la materia orgánica en los humedales artificiales alcanza un rendimiento de entre 75 y 95 %, alcanzando fácilmente concentraciones en el efluente de 20 mg/L para la DBO y 60 mg/L para la DQO **(Kadlec & Knight, 1996; García et al., 2004)**.

2. ANTECEDENTES

En 1989 en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I) fue construido un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) de 50 m^3 (Cuadro 2.1), para el tratamiento de una fracción de las aguas residuales municipales generadas en la Unidad **(Cervantes-Zepeda et al., 2011)**.

Cuadro 2.1. Características del Reactor UASB en la UAM Iztapalapa.

PARAMETRO	UNIDAD	REACTOR UASB	
TRH	horas	5	
Productividad de CH_4	L $CH_4/L_R \cdot d$	0.016	
DQO t	mg O_2/L	320	
DQO s	mg O_2/L	70	
		INFLUENTE	**EFLUENTE**
SST	mg/L	60±8.6	45±8.7
Sulfato	mg/L	120	90
Amonio	mg/L	60	70
Ortofosfatos	mg/L	18	20

Posteriormente se instalaron dos humedales artificiales de flujo combinado que sirven como postratamiento al agua residual tratada en el reactor UASB (Cuadro 2.2). En ellos se encuentran cultivos, distribuidos al azar, de tres especies de plantas *Juncus effusus* L. (carrizo), *Cyperus papirus* L. (papiro) y *Sparaxis bulbifera* (Iridaceae), las cuales pueden tener un valor agregado adicional como materia prima o como vegetación de ornato.

Cuadro 2.2. Características de los Humedales Artificiales en la UAM Iztapalapa.

PARÁMETRO	UNIDAD	HUMEDAL 1	HUMEDAL 2
Capacidad	m^3	210	160
Porosidad	%	36	40
Área	m^2	280	200
TRH	días	1.8	4.9
Flujo de agua	m^3/días	90	40
Profundidad de lecho rocoso	m	0.75	0.8
Papiros	Unidad	12	35
Carrizos	Unidad	40	30
Iris	Unidad	60	46

El agua residual de la UAM-I proviene básicamente de la cafetería, sanitarios y laboratorios. Dentro de la unidad somos cerca de 17 000 usuarios que generamos cerca de 200 mil litros por día.

3. JUSTIFICACIÓN

Muchas transformaciones de los nutrientes y del carbono orgánico en humedales son debidas al metabolismo microbiano y están directamente relacionadas con el crecimiento de los microorganismos. Éstos incluyen, principalmente, bacterias, hongos, y protozoarios. Esta biomasa se encuentra formando una biopelícula alrededor de las partículas del lecho.

En general, los procesos microbiológicos por los cuales los microorganismos depuran el agua residual en el humedal son los mismos que en los sistemas biológicos convencionales. Los microorganismos utilizan los nutrientes y el carbono tanto como fuente de energía como para la formación de nueva biomasa microbiana. La velocidad de crecimiento de esta nueva biomasa dependerá tanto de las condiciones ambientales como de la disponibilidad del substrato. La energía es obtenida por la oxidación de compuestos reducidos (dador de electrones) con un oxidante (aceptor de electrones) a través de la cadena respiratoria. La mayoría de los procesos son llevados a cabo por bacterias heterótrofas y autótrofas.

Los microorganismos, en su crecimiento, consumen nutrientes incorporándolos a su estructura celular. Es obvio, por tanto, decir que las condiciones químicas y físicas que condicionan qué tipo de microorganismos van a existir (heterótrofos, autótrofos) influyen en la cantidad de nutrientes absorbida.

Las poblaciones microbianas se ajustan a los cambios en el agua que les llega y se pueden extender rápidamente cuando se tiene la suficiente energía. Cuando las condiciones medioambientales no son convenientes, muchos microorganismos se inactivan. La comunidad microbiana de un humedal puede ser afectada por sustancias tóxicas, como pesticidas y metales pesados, y debe tenerse cuidado para prevenir que tales sustancias se introduzcan en las cadenas tróficas en concentraciones perjudiciales. Es necesario ampliar la información sobre esta relación entre la estructura y la funcionalidad en los humedales artificiales con el fin de mejorar su capacidad de depuración, ya que son muchos los aspectos aún desconocidos o controvertidos, como el efecto del sustrato o de la vegetación (diversidad y/o biomasa) en la diversidad (diversidad de taxones y diversidad funcional) de las comunidades de bacterias.

4. HIPÓTESIS

El humedal tiene asentado en el fondo biomasa floculenta proveniente del reactor UASB, que tendrá actividad microbiana sobre la materia orgánica carbonada y nitrogenada residual, removiéndola y funcionando de una manera sinérgica con los macrófitos implantados en el humedal para llevar a cabo el pulimento del agua tratada.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del proyecto fue evaluar la actividad microbiana de los sólidos sedimentados que se pudieran encontrar en el humedal y su participación en el funcionamiento del humedal artificial 1 como sistema de postratamiento de agua residual tratada en el reactor UASB de la UAM Iztapalapa.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.1 Análisis fisicoquímico de influente y efluente para determinar las posibles actividades que hay en el humedal y su capacidad de remoción.

5.2.2 Determinar la participación de las comunidades microbianas del fondo del humedal a través de las actividades microbianas de la biomasa:

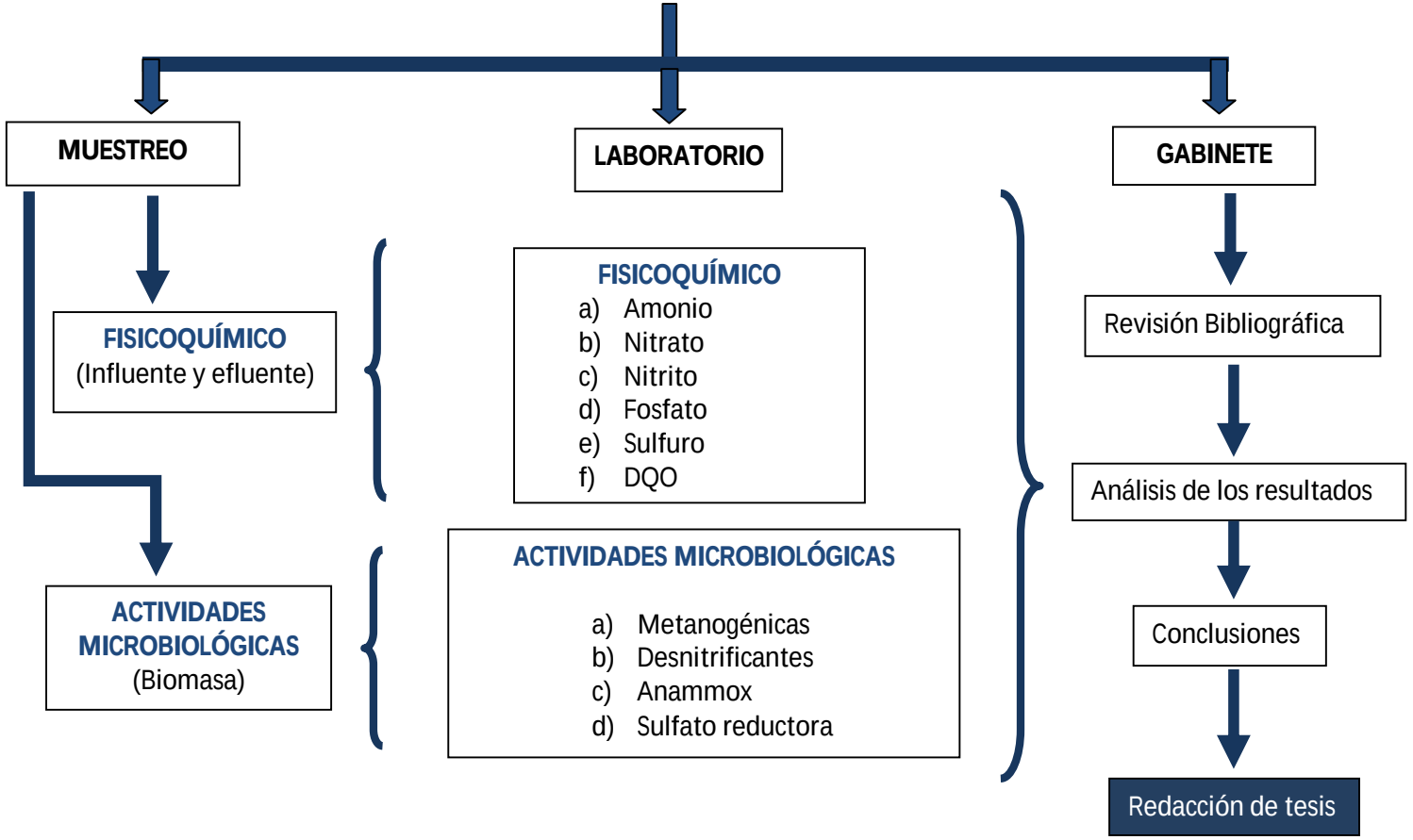
a) Metanogénica (acetoclástica, hidrogenotrófica)
b) Desnitrificante (autótrofa, heterótrofa)
c) Anammox
d) Sulfato reductora

5.2.3 Y del el análisis de los perfiles de consumo o formación de:

a) Nitrato (NO_3^-)
b) Nitrito (NO_2^-)
c) Amonio (NH_4^+)
d) Fosfato (PO_4^{3+})
e) Sulfuro (S^{2-})
f) Nitrógeno molecular (N_2)
g) Metano (CH_4)

6 METODOLOGÍA

6.1 DIAGRAMA DE FLUJO



6.2 MUESTREO

a) Microbiológico: Las muestras a analizadas consistieron de la biomasa que se encuentra en el fondo del humedal y se obtuvieron de los pozos de muestreo que llegan hasta el fondo del humedal cerca de la geomembrana (Fig. 3.1). El muestreo se llevó a cabo dos veces en el trimestre 11-O y 12-I. Tomando muestras de todos los pozos de muestreo, formando al final una muestra compuesta.

   La muestra de biomasa fue distribuida y colocada con su respectivo sustrato en un medio determinado según la actividad microbiológica a realizar, a un pH de entre 7.1 y 8.6. Se mantuvieron en frascos serológicos sellados y etiquetados, y se incubaron a una temperatura de 30 ºC (Figura 3.3).

b) Fisicoquímico: Se tomaron muestras de influente y efluente del humedal artificial 1, de dos a tres veces por semana durante los trimestres 11-O y 12-I, en botellas etiquetadas con punto de muestreo y fecha, de no analizarse inmediatamente se refrigeraban a 4 °C.

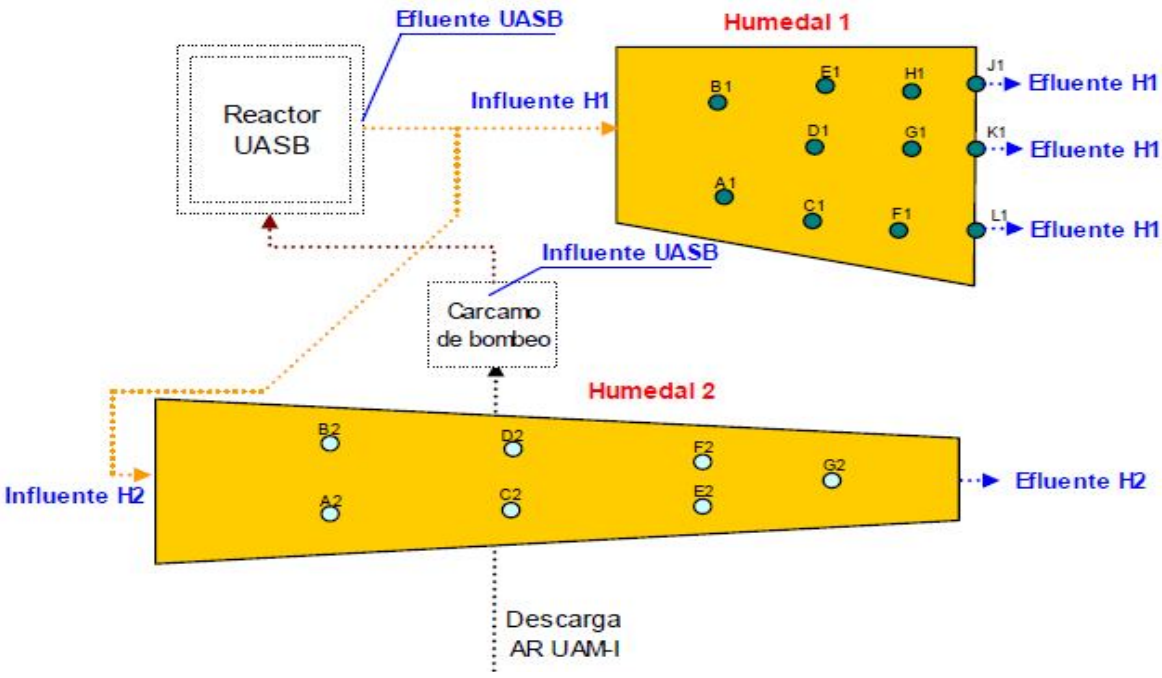


Figura 3.1 Esquema de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la UAM-I

6.3 ANÁLISIS FICOQUÍMICO

a) DETERMINACIÓN DE AMONIO

El amonio se determinó por medio de la reacción con hipoclorito de sodio en presencia de fenol (ver anexo 10.1.1), formando primero monocloramina y después un compuesto azul de indofenol a un pH alto (Figura 3.2 b) midiendo su absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro Spectronicc 20 (Figura 3.2a) **(Solórzano, 1969)**.

b) DETERMINACIÓN DE NITRATO

Para la determinación de nitrato se empleó la técnica reportada en **SMEWW, 2005** para muestras con bajo contenido en materia orgánica, haciendo reaccionar el nitrato con HCl 1N y midiendo la absorbancia a 220 y 275 nm (ver anexo 10.1.2).

c) DETERMINACIÓN DE NITRITO

Para determinar la cantidad de nitritos se utilizó el método colorimétrico basado en la reacción de Griess **(Contreras, 1994)**. A través de la diazotación de la sulfamida en un medio ácido para su acoplamiento con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina, produciéndose una coloración rosada, midiendo su absorbancia a 543 nm (Figura 3.2 c) (ver anexo 10.1.3).

d) DETERMINACIÓN DE SULFURO DISUELTO

Para calcular el sulfuro disuelto se realizó una determinación colorimétrica a 480 nm como una solución coloidal de sulfuro de cobre (color café), el cual es formado por la reacción del S^{2-} con el Cu^{2+} descrita por **Cord-Ruwisch, 1985** (ver anexo 10.1.4).

e) DETERMINACIÓN DE FOSFATO

El fosfato se determinó con molibdato de amonio con tartrato de antimonil potásico, reaccionando en medio ácido para formar ácido fosfomolíbdico que se reduce a azul de molibdeno de intenso color con ácido ascórbico y que es determinado a 885 nm (Figura 3.2 d), técnica descrita en **SMEWW, 2005** (ver anexo 10.1.5).

f) DETERMINACIÓN DE DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)

La demanda química de oxígeno (DQO) es la cantidad de oxígeno consumido por las materias existentes en el agua, que son oxidables en condiciones operatorias definidas, esta se determinó a través del método descrito en **SMEWW, 2005;** método del dicromato potásico por reflujo cerrado (ver anexo 10.1.6). La medida corresponde a una estimación de las materias oxidables presentes en el agua, ya sea su origen orgánico o inorgánico.

g) DETERMINACÍON DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES (SST, SSV)

Los sólidos suspendidos totales (SST) se determinaron por medio de la técnica descrita en **SMEWW, 2005** (ver anexo 10.1.7), la muestra homogenizada se filtró, mediante un filtro estándar de fibra de vidrio (Whatman 934-AH; tamaño de retención de partículas de 1.5 µm). El residuo retenido en el mismo se secó a peso constante a 103 – 105^{o}C. La diferencia de masa de los filtros antes y después de la filtración permite calcular el contenido de SST. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se determinaron por la pérdida de masa tras la calcinación de la muestra en una mufla a 550^{o}C. Con la masa restante después de la calcinación se calcularon los SSV.



Figura 3.2 Espectrofotómetro (a). Tres puntos de curva estándar y análisis de muestras del humedal 1 de: amonio (b), fosfato (c) y nitrito (d) por métodos colorimétricos.

6.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

6.4.1 ACTIVIDADES METANOGÉNICAS (ACETOCLÁSTICA E HIDROGENOTROFA)

FUNDAMENTO

El ensayo de actividad metanogénica consiste en evaluar la capacidad de los microorganismos metanogénicos para convertir el sustrato orgánico en CH_4 y CO_2 **(Ferry, 1993)**.

ACETOCLÁSTICA $\quad CH_3COO^- + H^+ \longrightarrow CH_4 + CO_2$

HIDROGENOTRÓFICA $\quad 9\ H_2 + 2\ HCO_3^- \longrightarrow 2\ CH_4 + 6\ H_2O$

De esta forma, a partir de cantidades conocidas de biomasa (sólidos totales volátiles STV) (Cuadros 3.1, 3.2, 3.3, 3.4; Figura 3.3 a), bajo condiciones establecidas, se puede evaluar la producción de CH_4 por unidad de biomasa a lo largo de un periodo de tiempo. Se determina la producción de CH_4 por Cromatografía de Gases (GC-TCD) (anexo10.2.1).

Cuadro 3.1 Sustratos de actividades metanogénicas.

ACTIVIDAD	sustrato	g/L
Acetoclástica	acetato	0.59
Hidrogenotrófica	H_2	0.43
Agua residual	DQO	12.18

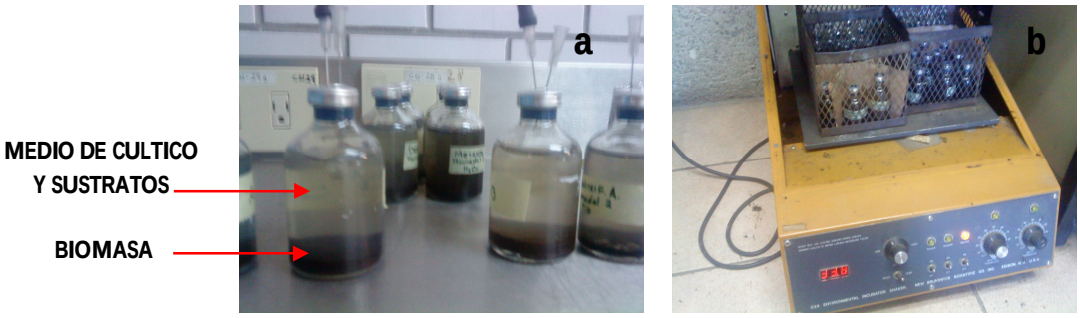


Figura 3.3 Muestras microbiológicas en frascos serológicos (a), colocados en incubadora con agitación a: 30°C y 300 rpm (b).

6.4.2 ACTIVIDADES DESNITRIFICANTES (AUTOTROFAS Y HETERÓTROFA)

FUNDAMENTO

La desnitrificación organotrófica (heterotrófica) es aquélla que obtiene su energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos. Esta oxidación, en el mejor de los casos y dependiendo de las condiciones, se puede llevar a cabo hasta la formación N_2 y CO_2. Los cuales son medidos por Cromatografía de Gases (CG-TCD) (anexo10.2.2) **(Park & Yoo, 2009)**.

AUTÓTROFA CON SULFURO

$$0.421\ H_2S + 0.421\ HS^- + NO_3^- + 0.346\ CO_2 + 0.086\ HCO_3^- + 0.086\ NH_4^+ \longrightarrow 0.842\ SO_4^{2-} + 0.5\ N_2 + 0.086\ C_5H_7O_2N + 0.434\ H_2O + 0.262\ H^+$$

AUTÓTROFA CON TIOSULFATO

$$0.844\ S_2O_3^{2-} + NO_3^- + 0.347\ CO_2 + 0.086\ HCO_3^- + 0.086\ NH_4^+ + 0.434\ H_2O \longrightarrow 1.689\ SO_4^{2-} + 0.5\ N_2 + 0.086\ C_5H_7O_2N + 0.697\ H^+$$

HETERÓTROFA CON ACETATO

$$0.082\ CH_3COOH + NO_3^- \longrightarrow 0.07\ C_5H_7\ NO_2 + HCO_3^- + 0.3\ CO_2 + 0.9\ H_2O + 0.47\ N_2$$

Cuadro 3.2 Sustratos de actividades desnitrificantes.

ACTIVIDAD	Sustrato	g/L
Autótrofa con sulfuro	Sulfuro de sodio	0.4
	Nitrato	0.9
Autótrofa con tiosulfato	Tiosulfato	1.7
	Nitrato	0.6
Heterótrofa con acetato	Acetato	0.15
	Nitrato	0.18

6.4.3 ACTIVIDAD ANAMMOX (ANAEROBIC AMMONIUM OXIDATION)

FUNDAMENTO

El proceso anammox es llevado a cabo por un grupo de bacterias autótrofas capaz de oxidar el amonio a nitrógeno gas utilizando nitrito como aceptor de electrones, sin necesidad de aportación de materia orgánica ni oxígeno. Las condiciones en las que se llevó a cabo la actividad específica se indican en el anexo 10.2.3. La estequiometria para esta reacción es **(Dapena 2007)**:

$$NH_4^+ + 1.3\ NO_2^- + 0.066\ HCO_3^- + 0.13\ H^+ \longrightarrow N_2 + 0.26\ NO_3 + 0.066\ CH_2O_{0.5}N_{0.15} + 2H_2O$$

Cuadro 3.3 Sustratos de actividad anammox.

ACTIVIDAD	sustrato	g/L
Anammox	Amonio	0.09
	Nitrito	0.23

6.4.4 ACTIVIDAD SULFATO REDUCTORA

FUNDAMENTO

El sulfato es utilizado como aceptor final de electrones por un conjunto de bacterias que utilizan materia orgánica como ácidos orgánicos, ácidos grasos, alcoholes e hidrógeno como donadores de electrones **(Madigan et al., 1998)**. En ocasiones otros compuestos como el tiosulfato, el tetrationato y el azufre elemental pueden ser también utilizados como aceptores de electrones (anexo10.2.4).

$$CH3COO^- + SO_4^{2-} + 3\ H^+ \longrightarrow 2\ H_2S + 2\ HCO_3 + 2\ CO_2 + 2\ H_2O$$

Cuadro 3.4 Sustratos de actividad sulfato reductora.

ACTIVIDAD	Sustrato	g/L	Relación DQO/SO_4
Sulfato reductora	Acetato	0.59	0.67
	DQO-Acetato	0.22	
	Sulfato	0.96	

6.5 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS

El muestreo se llevo a cabo en la fase líquida de cada botella tomando como muestra 2 mL, por medio de una jeringa. Con las alícuotas extraídas se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos:

ACTIVIDAD			FASE LÍQUIDA	FASE GAS
Desnitrificantes	Autótrofa	Con Sulfuro	S^{2-}, NO_3^-, NO_2^-	N_2
		Con Tiosulfato	NO_3^-	
	Heterótrofa	Con Acetato	DQO, NO_3^-	
	Anammox		NH_4^+, NO_2^-	
Metanogénicas	Acetoclástica		DQO	CH_4, H_2
	Hidrogenotrófica			
	Agua Residual		NH_4^+, S^{2-}, DQO	
Sulfato Reductora			DQO, S^{2-}	

La concentración de los compuestos gaseosos se midió con un cromatógrafo de gases GOW-MAC serie 580 equipado con un detector de conductividad térmica y una columna empacada Carbosphere 80/100 (Figura 3.4 a, b). Las temperaturas de operación fueron de 140°C, 190°C y 170°C para la columna, detector e inyector, respectivamente.

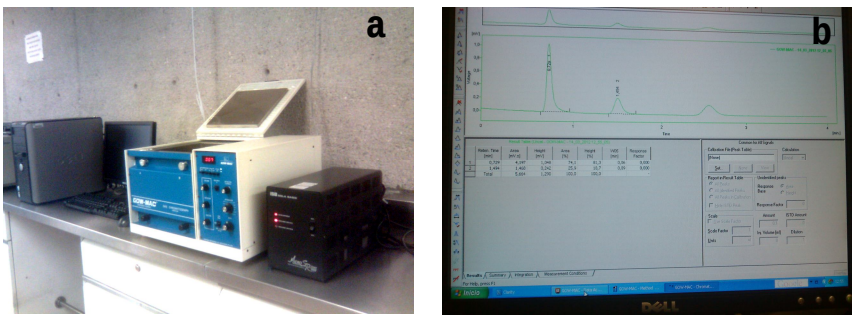


Figura 3.4 Cromatógrafo de gases (a), cromatograma (b).

7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Perfil de remoción de materia orgánica y nutrientes en el humedal artificial 1

El humedal artificial 1 se muestreó durante el trimestre 12-I (temporada de secas) y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Materia Orgánica (DQO)

La concentración promedio de materia orgánica para el humedal fue de 273.1 mg O_2/L (σ= 79.44) en el influente y de 141.1 mg O_2/L para el efluente (Fig. 4.1). Se calculó una remoción promedio del 48.3%. Se encontraron tres periodos de eliminación de materia orgánica: el primero durante los días 33 a 37 de operación con un 47.7%, el segundo comprende los días 40 y 44 con un 70% de remoción y el último periodo entre los días 51 a 52 con un 55.6% de remoción (Fig. 4.1). Esta eliminación es debida

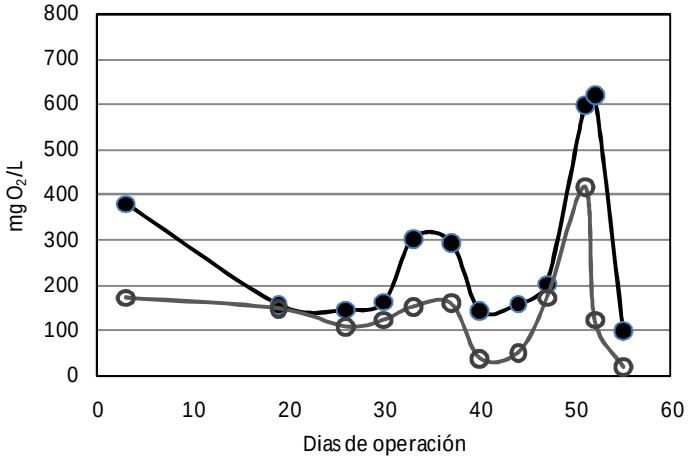


Figura 4.1 Perfil de DQO (mg O_2/L) del humedal artificial 1 UAM Iztapalapa: Influente (●), Efluente (○).

exclusivamente a la actividad bacteriana ya que las plantas no son capaces de consumir este sustrato.

Amonio

El promedio de concentración de amonio descargada al humedal artificial es de 153.4 mg NH_4^+/L como influente y de 137.2 mg NH_4^+/L para el efluente, se removieron 16.2 mg NH_4^+/L obteniéndose una eficiencia de eliminación de 10.5% por las macrófitas (Fig. 4.2). Durante los días 26, 33 y 61 se detectaron altas concentraciones de amonio en el efluente, 103, 69 y 71 mg NH_4^+/L, respectivamente, en comparación con el influente, puede deberse a la acumulación de amonio proveniente del reactor UASB.

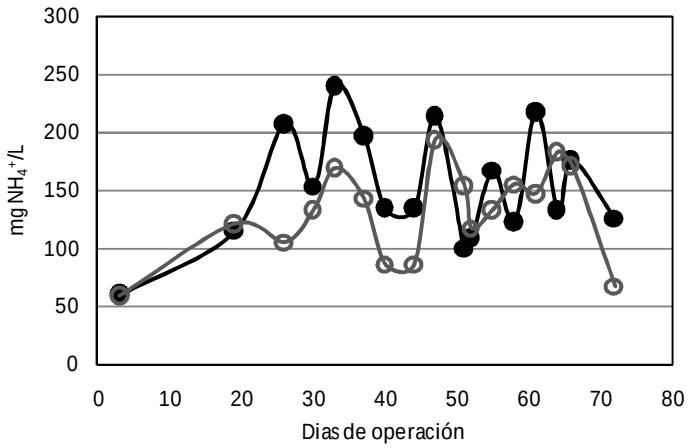


Figura 4.2 Perfil de amonio (mg NH_4/L) del humedal artificial 1 UAM Iztapalapa: Influente (●), Efluente (○).

Nitrato

Para el nitrato la concentración promedio en el influente fue de 9.8 mg NO_3^-/L y para el efluente de 8.6 mg NO_3^-/L, significando esto una remoción del 12.2% (Fig. 4.3). Durante los días 37 y 55 se registró la mayor remoción de nitrato con una eficiencia de 76.7% y 63.8%, respectivamente (Fig. 4.3).

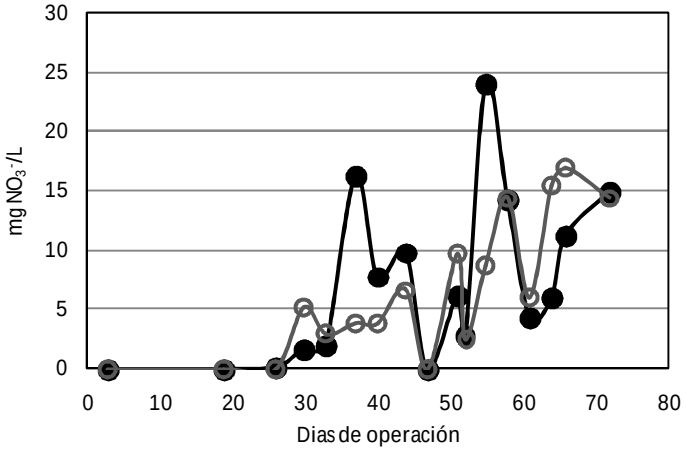


Figura 4.3 Perfil de nitrato (mg NO_3^-/L) del humedal artificial 1 UAM Iztapalapa: Influente (●), Efluente (○).

Nitrito

En promedio la concentración de nitrito descargado al humedal artificial 1 es de 4.4 mg NO_2^-/L (influente, Fig. 4.4). Para el efluente se registraron fluctuaciones en la concentración. En los días 2, 8, 14 y 22 no se detectó nitrito en el efluente lo que indicó un 100% de remoción. Sin embargo para el resto de los muestreos la concentración en el efluente fue superior a la registrada en el influente.

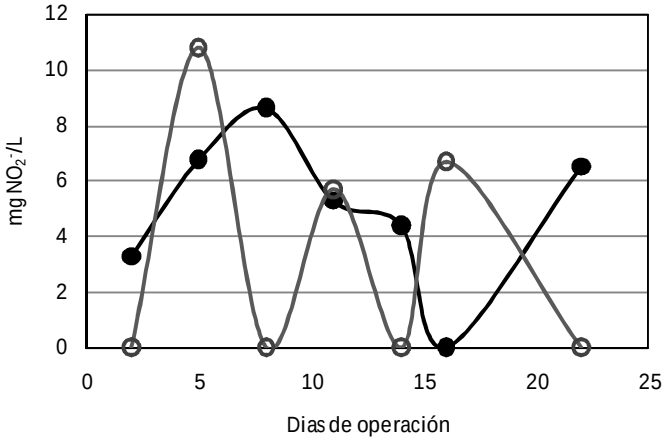


Figura 4.4 Perfil de nitrito (mg NO_2^-/L) del humedal artificial 1 UAM Iztapalapa: Influente (●), Efluente (○).

Sulfuro

La concentración promedio de sulfuro fue de 0.0118 mg S^{2-}/L en el influente y de 0.0054 mg S^{2-}/L en el efluente. La remoción de sulfuro para los días 30 y 51 fue de 56 y 100%, respectivamente, posiblemente debido a la actividad de bacterias desnitrificantes autótrofas (Fig. 4.5). En el día 61 se registró un incremento de 0.01 mg S^{2-}/L en el efluente, probablemente por actividad de bacterias sulfato reductoras en el fondo del humedal. Fecha de reinicio del reactor UASB después de un periodo de inactividad.

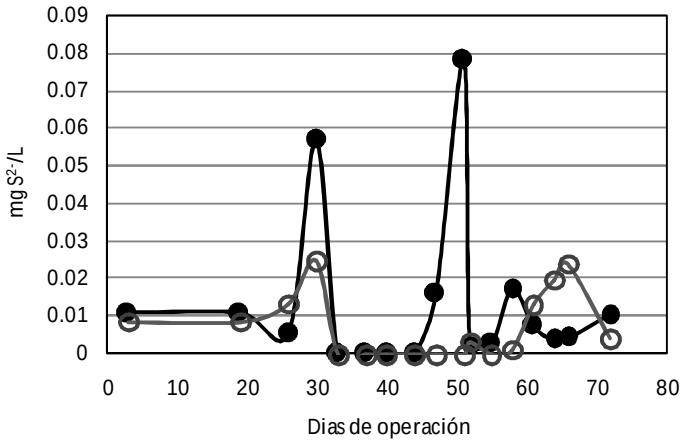


Figura 4.5 Perfil de sulfuro disuelto (mg S^{2-}/L) del humedal artificial 1 UAM I: Influente (●), Efluente (○).

Fosfato

La concentración promedio en el influente fue de 10.5 mg PO_4^{3+}/L y de 9.4 mg PO_4^{3+}/L en el efluente (Fig. 4.6). La remoción promedio fue del 10.47% (Fig. 4.6), debido probablemente a las macrófitas. Aunque no se descarta la participación de bacterias acumuladoras de fósforo (PAOS), para confirmar este hecho haría falta realizar otro tipo de análisis o actividad de bacterias PAOS.

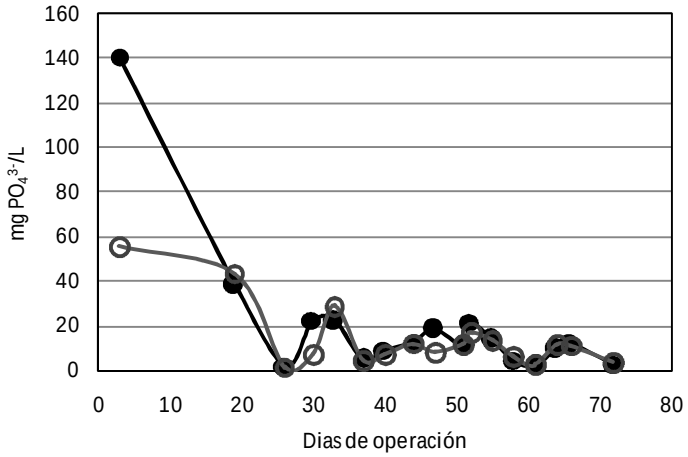


Figura 4.6 Perfil de fosfato (mg PO_4^{3+}/L) del humedal artificial 1 UAM Iztapalapa: Influente (●), Efluente (○).

El cuadro 4.1 muestra una comparación de los resultados obtenidos en este estudio con los reportados en la bibliografía para humedales artificiales de flujo sub-superficial.

Cuadro 4.1 Comparación de nutrientes (P, N) y DQO en el influente y efluente de humedales artificiales de flujo horizontal sub-superficial para tratamiento de aguas residuales municipales.

Referencia	Fósforo Total (mg PO_4^{3+}/L)		Remoción de Fosfato (%)	NTK (mg N/L)		Remoción de Nitrógeno (%)	DQO (mg/L)		Remoción de materia orgánica (%)
	Influente	Efluente		Influente	Efluente		Influente	Efluente	
En este proyecto Humedal artificial 1	13.3	12.2	**8.3**	122.8	110.9	**9.7**	273.1	141.1	**48.3**
Hench et al,. 2003.	--	--	- -	11.0	5.0	**54.5**	--	--	- -
Vymazal,, 2005.	--	--	- -	59.0	51.0	**13.6**	182.0	37.0	**79.7**
Vymazal et al, 2006.	8.7 (P)	5.1 (P)	**41.4**	38.9	20.1	**48.3**	284.0	72.0	**74.6**
Ramírez-Carrillo, 2009.	2.9	1.8	**37.9**	0.98	0.56	**42.8**	122.0	11.0	**90.9**
Fonkou et al, 2011.	14.3	1.2	**91.6**	108.6	14.6	**86.5**	1142.0	775.1	**32.1**
Otálora, 2011.	14.0	18.0	- -	70.0	53.0	**24.3**	557.0	582.0	- -

Discusión de los resultados fisicoquímicos

Los resultados obtenidos en el presente estudio se comparan con la bibliografía (tabla 4.1) encontrándose que, según **Vymazal *et al.* (2006)** los sistemas de flujo horizontal son muy eficaces en la eliminación de materia orgánica y sólidos en suspensión y por lo general cumplen con los criterios de calidad del efluente, sin embargo su baja eliminación de nutrientes se debe principalmente a la incapacidad del sistema para oxidar el amonio, la forma predominante de nitrógeno en aguas residuales domésticas y municipales, y la baja capacidad de absorción de los materiales de filtración utilizados para el fósforo. Estos autores reportan eficiencias de remoción para fosfato, nitrógeno y DQO de 41.3%, 48.3% y 74.6%, respectivamente. Resultados similares son reportados por **Ramírez-Carrillo (2009)** para un humedal artificial, acoplado a un filtro de pulimento donde la eficiencia de remoción de fosfato encontrada fue del 37.9%, para el presente estudio fue de 8.3% éste resultado se debe a la absorción de fosforo por la macrófitas y por algunas bacterias que también lo asimilan.

Según **Vymazal (2005)** los humedales artificiales de flujo horizontal sub-superficiales son una alternativa viable para el tratamiento de aguas residuales para pequeñas fuentes de contaminación, especialmente cuando la materia orgánica y los sólidos en suspensión son el objetivo del tratamiento. También concluye que la eliminación de materia orgánica (DBO_5 y DQO) y de sólidos suspendidos es muy alta y constante. Un humedal artificial de flujo horizontal sub-superficial ubicado en Zitenice, República Checa el cual tiene como pretratamiento un tanque séptico, funciona con un tiempo de retención largo (hasta 12 h), un área de 18 m^2 cubierta de arena gruesa (1-4 mm) en la cual están colocadas el *Iris pseudacorus* y el *Iris sibirica.* Tiene una concentración de materia orgánica de 182 mg O_2/L como influente y 37 mg O_2/L como efluente, lo cual refleja una eficiencia de remoción del 77.5%. **Fonkou *et al.* (2011)** en un humedal artificial de flujo horizontal sub-superficial con *Cyperus papirus*, con concentraciones de influente 1142 mg O_2/L y 175.1 mg O_2/L como efluente (ver cuadro 4.1), obtuvieron una eficiencia de remoción del 84.6%. Las eficiencias de remoción de DQO encontradas en el humedal artificial 1 de la UAM Iztapalapa, fueron inferiores a las reportados por estos autores, ya que las concentraciones de influente y efluente fueron de 273.1 mg O_2/L y 141.1 mg O_2/L, respectivamente, obteniéndose una eficiencia del 48.3%.

Otálora (2011) estudió un humedal artificial de alta tasa conformado por macrófitas nativas y comunes soportadas sobre sustrato de material plástico reciclado con un diseño especial de aprox. 300 m^2/m^3 de superficie específica. Obteniendo una eficiencia en la remoción de amonio del 24.2% (ver cuadro 4.1). Mientras que **Hench *et al.* (2003)** estudiaron dos humedales artificiales a dos profundidades, 45 y 60 cm y con una vegetación combinada de *Typha, Scirpus* y *Juncus sp,* la concentración de amonio en el influente y efluente fue de 11 mg/L $N\text{-}NH_4^+$ y 5 mg/L $N\text{-}NH_4^+$, respectivamente, obteniéndose una eficiencia de remoción del 54.5% (ver cuadro 4.1). En este estudio la eficiencia máxima de remoción de amonio fue inferior a la reportada por estos autores, 9.7%. Las bajas eficiencias obtenidas en el presente trabajo se deben a que el humedal trabaja con agua previamente tratada en un sistema con un tiempo de retención muy corto de 43 horas, lo cual impide una mayor formación de amonio.

Para el caso de nitrato y nitrito no se tienen reportes de eliminación, la variación en las concentraciones de estos compuestos en el influente y efluente, pueden significar ciertas actividades microbianas, no asociadas a las macrófitas.

Gonzalias et al., 2007 demostraron que la eliminación de sulfuro en humedales artificiales de flujo horizontal depende de la tolerancia que tienen las plantas hacia el sulfuro. Por ejemplo, en el post-tratamiento de efluentes de reactor anaeróbico con un humedal de flujo horizontal sub superficial se encontró que *J. effusus*, no es adecuado para el tratamiento de agua con concentraciones de sulfuro de 15 mg/L; sin embargo, la máxima remoción de sulfuro fue de 94 mg S^{2-} m^2/d, es decir, menor en comparación con la eliminación de compuestos carbonados y amonio.

7.2 Actividades microbiológicas encontradas en el humedal artificial 1

ACTIVIDAD METANOGÉNICA ACETOCLÁSTICA

Esta actividad se realizó con una concentración inicial de 60 mg DQO, después de 8 días de incubación se consumieron 46.19 mg de DQO y se produjeron 82.46 mL de CH_4. Se encontró que se forman 1.78 mL de CH_4 por cada mg de DQO a 1 atm y 30 °C. Finalmente se calculó una velocidad de producción de metano de 0.26 mL/día ó 0.85 mg/día con una biomasa de 44.5 mg/mL de SSV.

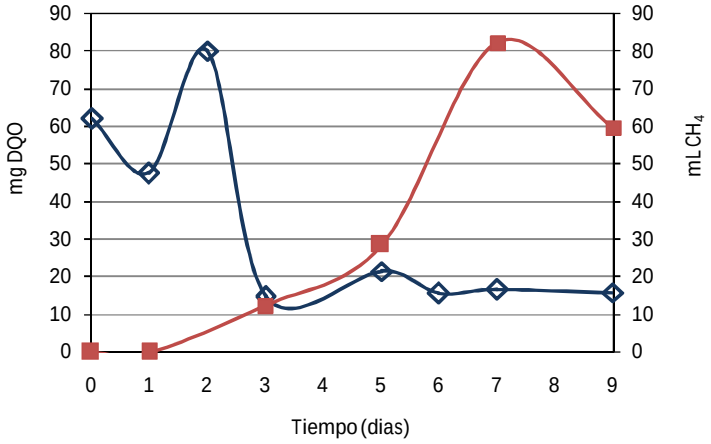


Figura 4.7 Actividad metanogénica acetoclástica de biomasa del humedal artificial 1 UAM I: DQO (◊), CH_4 (■).

ACTIVIDAD METANOGÉNICA HIDROGENOTRÓFICA

Esta actividad se inició con 21.45 mmol de H_2 y en total se formaron 0.9 mmol de CH_4, es decir que estequiométricamente sólo se transformaron 3.6 mmol de H_2, el resto del sustrato pudo disolverse en la fase líquida. Se calculó una actividad específica de 16.12 mg CH_4/g SSV•d y una velocidad de producción de metano de 0.49 mg/día con una biomasa de 30.3 mg/mL de SSV.

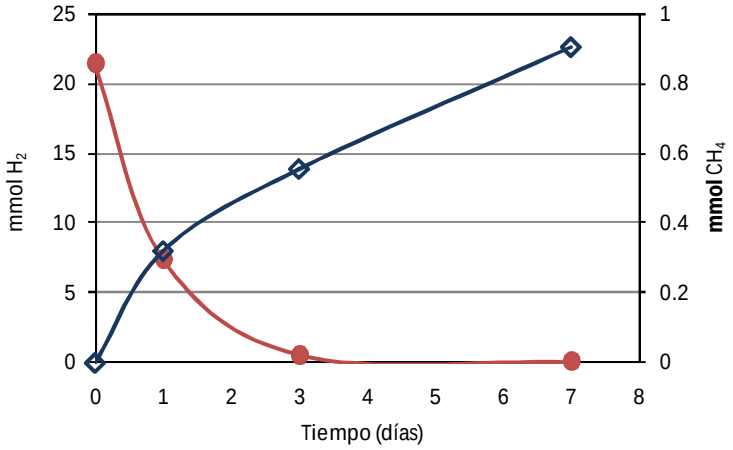


Figura 4.8 Actividad metanogénica hidrogenotrófica de biomasa del humedal artificial 1 UAM I: CH_4 (◊), H_2 (●).

ACTIVIDAD METANOGÉNICA CON AGUA RESIDUAL

Para esta actividad se utilizó agua residual cruda con una concentración inicial de 12 mg DQO con los que se esperaba obtener una producción de 24.86 mL CH_4 (1atm, 30°C) y se formaron en el ensayo 22.29 mL de CH_4 el cual es un valor cercano al teórico. La velocidad de producción de metano fue de 1.88 mg/día ó 0.12 mL/dia con una biomasa de 67 mg/mL de SSV; con estos datos se deduce que el humedal artificial 1 libera un gas de efecto invernadero a una velocidad de 5.79 L CH_4/día y que podría producir en

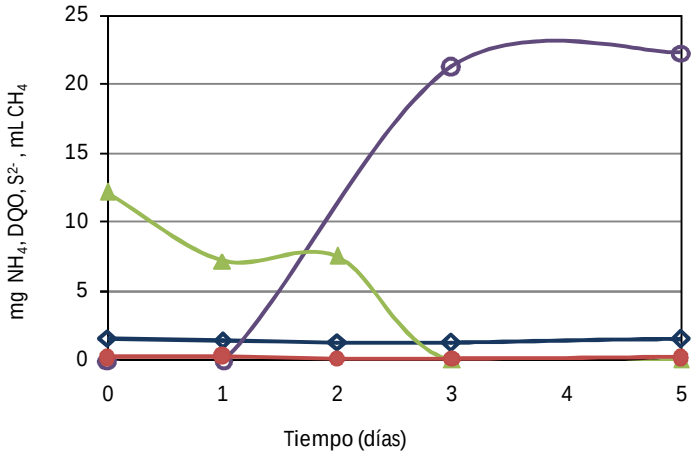


Figura 4.9 Actividad metanogénica con agua residual y biomasa del humedal artificial 1 UAM I: DQO (▲), NH_4 (◊), S^{2-} (●), CH_4 (○).

total 3.2 x 10^{-5} L CH_4/L_R•d.

ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE HETERÓTROFA CON ACETATO

En esta actividad la concentración inicial de nitrógeno fue de 6.4 mg N-NO_3^-, al final del periodo de incubación la concentración fue de 8.6 mg de N-N_2, es decir se recuperó todo el nitrógeno más un excedente de 2.2 mg. Se calcularon dos actividades específicas con una biomasa de 48 mg/mL de SSV, una en base al nitrógeno gaseoso producido 17.08 mg N-N_2/g SSV•d y la segunda en base al nitrógeno de nitrato consumido, 14.94 mg N-NO_3^-/g SSV•d y se calculó una velocidad de producción de nitrógeno de 0.81 mg N-N_2/día.

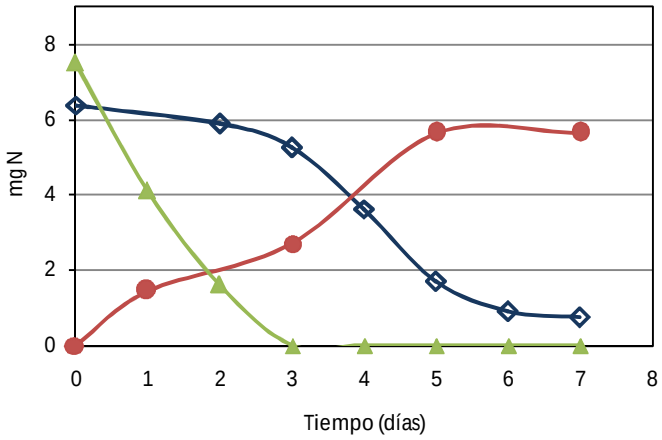


Figura 4.10 Actividad desnitrificante heterótrofa con acetato con biomasa del humedal artificial 1 UAM I: N-NO_3^- (◊), N-N_2 (●), DQO (▲).

ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE AUTÓTROFA CON SULFURO

En este ensayo la concentración de nitrógeno inicial fue de 1.0 mg N-NO_3^-, al final del periodo de incubación se obtuvo un total de 1.2 mg de N-N_2, lo cual equivale al 100 % de nitrógeno recuperado, más un excedente de 0.2 mg. Con una biomasa de 87 mg/mL de SSV se calculó una actividad específica de 15.78 mg N-N_2/g SSV•d y una velocidad de producción de nitrógeno de 1.37 mg/día.

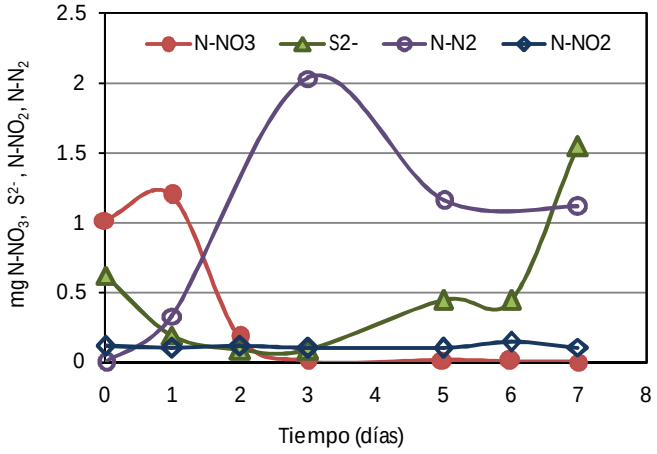


Figura 4.11 Actividad desnitrificante autótrofa con sulfuro con biomasa del humedal artificial 1 UAM I: N-NO_3^- (●), S^{2-} (▲), N-N_2 (○), N-NO_2^- (◊).

ACTIVIDAD DESNITRIFICANTE AUTÓTROFA CON TIOSULFATO

Para esta actividad la concentración inicial de nitrógeno fue de 14.6 mg $N\text{-}NO_3^-$ al final del periodo de incubación se determinaron 18.8 mg de $N\text{-}N_2$, es decir se recuperó el 100% del nitrógeno, más un excedente de 4.2 mg. Se calcularon dos actividades específicas con una biomasa de 23.1 mg/mL de SSV, 120.53 mg $N\text{-}N_2$/g SSV•d y 85.39 mg $N\text{-}NO_3^-$/g SSV•d y se obtuvo una velocidad de producción de nitrógeno de 2.78 mg/día.

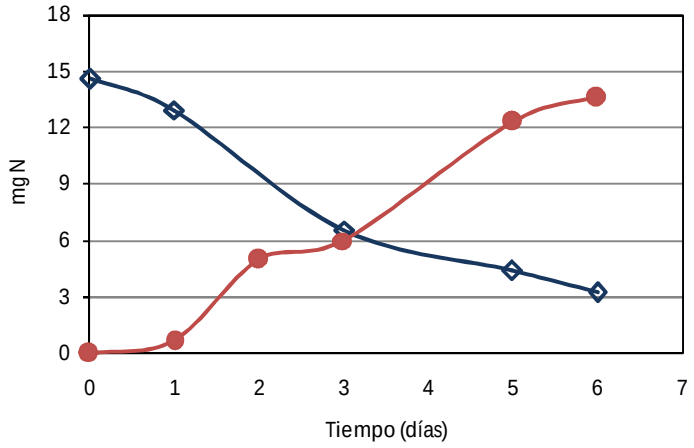


Figura 4.12 Actividad desnitrificante autótrofa con tiosulfato con biomasa del humedal artificial 1 UAM I: $N\text{-}NO_3^-$ (◊), $N\text{-}N_2$ (●).

ACTIVIDAD ANAMMOX

En este ensayo la concentración de nitrógeno total ($N\text{-}NH_4^+$ + $N\text{-}NO_2^-$) inicial fue de 6.3 mg al final del periodo de incubación, a pesar de que el consumo de amonio y nitrito fue reducido se alcanzaron un total de 4.8 mg de $N\text{-}N_2$. Se obtuvieron dos actividades específicas con una biomasa de 148 mg/mL de SSV, una de 1.26 mg $N\text{-}N_2$/g SSV•d y otra de 1.42 mg $N\text{-}NO_2^-$/g SSV•d. Se calculó una velocidad de producción de nitrógeno de 0.18 mg/día.

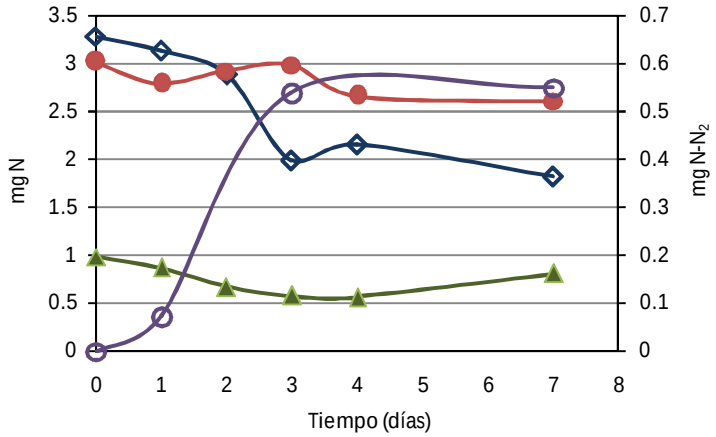


Figura 4.13 Reacción anammox con biomasa del humedal artificial 1 UAM I: N-NO_2^- (◊), N-NH_4^+ (●), N-NO_3^- (▲), N-N_2 (○).

ACTIVIDAD SULFATO REDUCTORA

En esta actividad se trabajó con una relación DQO-SO_4^{2-} de 0.67 y se calcularon las siguientes actividades específicas con una biomasa de 60 mg/mL de SSV. 2.16 mg DQO/g SSV•d y 10.23 mg DQO-S^{2-}/g SSV•d, alcanzando una velocidad de producción de sulfuro de 1.49 mg/día. En la figura 4.4 se muestra el perfil de consumo de DQO y el perfil de producción de sulfuro.

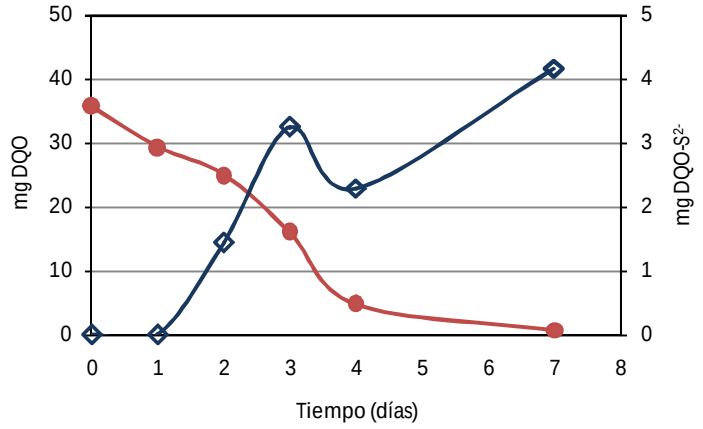


Figura 4.14 Actividad sulfato reductora con biomasa del humedal artificial 1 UAM I: DQO (●), DQO-S^{2-} (◊).

Las actividades microbianas más bajas encontradas en el humedal artificial 1 fueron la sulfato reductora: 0.29 mg DQO-H_2S/mg SSV·d y la desnitrificante anammox con un valor de 1.27 mg N-N_2/g SSV·d (ver cuadro 4.2), otras actividades desnitrificantes que se determinaron fueron la heterótrofa (17.08 mg N-N_2/g SSV·d) y la autótrofa con sulfuro como sustrato con una actividad de 15.78 mg N-N_2/g SSV·d. La actividad desnitrificante autótrofa con tiosulfato fue de 120.53 mg N-N_2/g SSV·d siendo la más alta realizada por las bacterias. Las menores actividades metanogénicas fueron la hidrogenotrófica con 16.13 mg CH_4/g SSV·d y la acetoclástica con 19.04 mg CH_4/g SSV·d (cuadro 4.2). Finalmente el resultado de la actividad metanogénica con agua residual como sustrato fue de 28.05 mg CH_4/g SSV·d.

Cuadro 4.2 Actividades microbianas encontradas en el humedal artificial 1, UAM Iztapalapa

Metanogénicas			
(mg CH_4/g SSV·d)			
Hidrogenotrófica	**Agua residual**		**Acetoclástica**
16.13	28.05		19.04
Desnitrificantes			
(mg N-N_2/g SSV·d)			
Autótrofa		**Heterótrofa**	**Anammox**
Sulfuro	*Tiosulfato*	*Acetato*	
15.78	120.53	17.08	1.26
Sulfato Reductora			
(mg DQO-S^{2-}/g SSV·d)			
10.23			

En el Cuadro 4.3 se presentan las velocidades de formación de metano calculadas para las actividades metanogénicas realizadas, se puede observar que la suma de las actividades metanogénicas acetoclástica e hidrogenotrófica es 0.54 mg, menor a la alcanzada por la actividad con agua residual.

Cuadro 4.3 Velocidad de formación de productos de las reacciones metanogénicas.

ACTIVIDAD	Velocidad de formación (mg CH_4/día)
Acetoclástica	0.85
Hidrogenotrófica	0.49
Acetoclástica e hidrogenotrófica	1.34
Agua Residual	1.88

En el cuadro 4.4 se presenta el balance molar de las actividades desnitrificantes, se pueden observar que de los principales sustratos y productos nitrogenados que intervinieron en las reacciones, el total de nitrógeno inicial y final de cada una de las actividades se acercan a los estequiométricos.

Cuadro 4.4 Balance molar de las reacciones desnitrificantes.

DESNITRIFICANTES	N total inicial (mmol)	N total final (mmol)
Heterótrofa con acetato	0.460	0.457
Autótrofa con sulfuro	0.070	0.087
Autótrofa con tiosulfato	1.040	1.200
Anammox	0.450	0.412

Discusión de los resultados microbiológicos

Las actividades metanogénicas obtenidas en el humedal fueron relativamente bajas en comparación con las reportadas por otros autores, sin embargo cabe mencionar que son actividades microbiológicas de reactores, no se han encontrado referencias de análisis de metanogénicos en humedales artificiales (ver cuadro 4.5). **Jawed & Tare (1999)** analizaron la biomasa obtenida de un filtro anaerobio de flujo ascendente el cual fue alimentado con alimentación sintética a 35ºC con una velocidad de carga de materia orgánica de aproximadamente 5 kg DQO/m^3·d. Los resultados de sus pruebas de actividad metanogénica acetoclástica y actividad metanogénica total fueron de 211.6 y 212 (mg CH_4/g SSV·d), respectivamente. **Gallegos-García et al. (2010)** estudiaron la competencia entre microorganismos metanogénicos y sulfato reductores utilizando un reactor anaerobio de lecho de lodo granular de flujo ascendente (UASB) a escala laboratorio, el reactor se alimentó con una mezcla de etanol y acetato, con una carga orgánica 2 g de DQO/L·d a pH de 7.0. Obtuvieron una actividad sulfato reductora de 290 mg DQO-H_2S/g SSV·d y una actividad metanogénica de 116.6 mg CH_4/g SSV·d, comprobaron que los organismos metanogénicos no fueron desplazados por las bacterias sulfato reductoras ya que ambos tipos de microorganismos coexisten en el lodo granular anaerobio.

Para las actividades desnitrificantes heterótrofas, las obtenidas en el humedal artificial 1 no fueron inferiores a las determinadas por **Yabroudi et al. (2010)** quienes emplearon lixiviado proveniente de un relleno sanitario con una DQO de 5829 mg/L con menos de 5 μg NO_3/L y obtuvieron una actividad desnitrificante de 8500 mg N-NO_2^-/g SSV·d. Asimismo **Carrera et al., (2003)** utilizaron lodos hidrolizados como fuente de carbono para el proceso de desnitrificación con alta carga de amonio y una relación DQO/N de 4.9, en aguas residuales de tipo industrial, sugieren una actividad desnitrificante de 60-380 mg N/g SSV·d.

La actividad desnitrificante depende de una adecuada relación DQO/N. **Cisneros & Noyola (2010)** propusieron y demostraron que el metano puede ser una fuente de carbono y energía para la desnitrificación biológica bajo condiciones anóxicas. Durante 152 días operaron un reactor con capacidad de 2.5 L que contenía agua sintética (medio desnitrificante) y una concentración de 35 mg/L de N-NO_3^-. Obtuvieron una actividad desnitrificante de 0.0146 mg N-NO_3^-/g SSV·d con una relación DQO/N de 1.5, muy baja en comparación con las encontradas para el humedal artificial 1 de 17.08 mg N-N_2/g SSV·d con acetato como sustrato y 15.78 mg N-N_2/g SSV·d con sulfuro. La desventaja es que utilizan un biocombustible, el metano, para llevar a cabo este proceso.

Cuadro 4.5 Comparación de actividades microbianas reportadas en varios artículos con las encontradas en el Humedal Artificial 1 de la UAM Iztapalapa.

Referencias	Biomasa	Actividad			
		Metanogénica (mg DQO-CH_4/g SSV·d)	Desnitrificante (mg N-NO_3/g SSV·d)	Anammox (mg N-N_2/g SSV·d)	Sulfato Reductora (mg DQO-S^{2-}/g SSV·d)
En este proyecto UAM Iztapalapa, 2012.	*Biomasa humedal artificial 1 (postratamiento de un reactor UASB)*	19.04 (acetoclástica) 16.13 (agua residual)	15.78 (N-N_2, sulfuro *) 17.08 (N-N_2, acetato*) 120.53 (N-N_2, tiosulfato*)	1.26	10.23
Gallegos-García, et al., 2010.	*Reactor UASB*	116.6 (acetoclástica)	--	--	290 (DQO-H_2S*)
Jawed & Tare, 1999.	*Filtro anaeróbico de flujo ascendente*	212 (agua residual) 211.6 (acetoclástica) 0.4 (hidrogenotrófica)	--	--	
Cisneros & Noyola, 2010.	*cilíndrico de vidrio cerrado herméticamente (capacidad nominal de 2.5L)*	--	0.0146 (metano*)	--	
Carrera et al., 2003.	*Lodos activados*	--	60-380	--	
Yabroudi et al., 2010.	*Lodos activados*	--	8500 (N-NO_2)	--	
Misiti et al., 2011.	*Agua y suelo subterráneos.*	--	1.2 (N-NO_3) 0.7 (N-NO_2)	-- --	
Dapena-Mora et al., 2007.	*Lodos anammox*	--	---	140 (N-NO_2)	
Dapena-Mora et al., 2010.		--		320 (N-NO_2)	

*sustrato

Misiti et al. (2011) proponen el uso de un humedal artificial para tratar aguas subterráneas contaminadas con nitrato; los autores investigaron el efecto de la temperatura, tiempo de retención hidráulica, carga de nitrato y carbono en la desnitrificación utilizando el suelo y el agua subterránea de la zona de aplicación de biomasa. Encontró a un rango máximo específico de reducción de la concentración de nitrato de 70 a 400 mg N/L, y obtuvo de nitrato y nitrito a 22ºC 1.2 y 0.7 mg N/mg SSV·d, respectivamente, además demostró que la tasa de reducción de nitrato no se ve afectada por la concentración de nitrato inicial.

Para la UAM Iztapalapa en el humedal artificial 1 se determinó un actividad anammox de 1.26 mg N-N_2/g SSV·d. **Dapena-Mora et al. (2007)** trabajaron con lodos anammox a unas condiciones iníciales de: 30°C, pH 7.8, a constante agitación de 150 rpm, y 1 g VSS L-1, obtuvieron una actividad de 180 mg de N-NO_2 /g SSV·min.

Para la actividad sulfato reductora **Gallegos-García et al. (2010)** estudiaron la competencia entre microorganismos metanogénicos y sulfato reductores utilizando un reactor anaerobio de lecho de lodo granular con flujo ascendente (UASB) a escala laboratorio, el cual fue enriquecido con biomasa sulfato reductora a partir de un lodo granular de origen metanogénico trabajaron con una carga orgánica de 1 a 3 g DQO/L-d con una relación DQO/Sulfato de 0.67 a un tiempo de retención hidráulico de un día. Y encontraron una actividad sulfato reductora de 290 g DQO-H_2S/g SSV·d. Para la UAM-I fue de 10.23 mg DQO-S^{2-}/g SSV·d.

8 CONCLUSIONES

A partir de los perfiles de contenido de materia orgánica, amonio, nitrato, nitrito y sulfuro se concluye que existen las actividades microbianas en el humedal y se encontraron:

- Actividades metanogénicas: acetoclástica e hidrogenotrófica. La velocidad de producción de metano con agua residual fue 4 veces mayor a la más baja, hidrogenotrófica. Y como los humedales naturales, este humedal artificial produce metano, que es un gas de efecto invernadero (GEI). También se observó en la actividad con agua residual como sustrato que la biomasa no es capaz de producir más amonio.

- Actividades desnitrificantes: heterótrofa (acetato), autótrofa (sulfuro y tiosulfato) y anammox, siendo superior la velocidad de producción de N_2 de la actividad autótrofa con tiosulfato, hasta 14 veces mayor que la actividad anammox (la más baja registrada en el humedal).

- Actividad sulfato reductora: el humedal produce 0.27 g de sulfuro por día y es de actividad baja comparada con un reactor UASB, debido a su tiempo de retención y a su condición de postratamiento.

Se confirmó la hipótesis de que los sedimentos contenidos en el humedal artificial 1 presentan diversas actividades bacterianas, que contribuyen a la eliminación de materia orgánica nitrogenada, carbonada y azufrada, trabajando junto con los macrófitos para el pulimento.

9 BIBLIOGRAFÍA

SMEWW: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005). 21st Ed., American Public Health Association, Washington, DC., USA. APHA, AWWA and WPCF.

Agueda J.A., Anguita F., Araña V., López J., Sánchez L. (1983) "Geología", 2a. edición, Editorial Rueda, Madrid. 448 pp.

Arias, C. y Brix, H. (2003) "Humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales". *Ciencia e Ingeniería Neogranadina.* Núm. 013, 17-24.

Arms K. (1990) "Environmental Science". Saunders College Publishing, Philadelphia. 468 pp

Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R. and Wolfe, R.S. (1979) "Methanogens: reevaluation of a unique group". *Microbiological Reviews*. 43(2):260-296.

Brix H. y Schierup H.H., (1989). "The use of aquatic macrophytes in water pollution control". *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 18, 100–107.

Brix H. (1993) "Macrophyte-mediated oxygen transfer in wetlands: transport mechanisms and rates". *In: Constructed Wetlands for Water Quality Improvement. Moshiri G.A. (ed.), Lewis Publishers, Boca raton, Florida*, 391-398 pp.

Brix H., (1993). "Wastewater treatment in constructed wetlands: system design, removal processes, and treatment performance". En: *Moshiri G.A. (ed.), Constructed wetlands form water quality improvement*, 9-22 pp.

Campos, J. L.; Vázquez-Padín, J. R.; Fernández, I.; Fajardo, C.; Seca, I.; Mosquera-Corral, A.; Pampín, R. (2009) "Tecnicas para el tratamiento de aguas residuales" *Ed Anuska Mosquera Coral Novedar Consolider.* 128-156 pp

Carrera, J; Lafuente, F. J. y Vicent, T. (2003) "Tratamiento biológico de aguas residuales industriales con alta carga de nitrógeno" *Ingeniería Química. Tratamiento de aguas residuales. www.alcion.es* 130-142 pp.

Cervantes-Carrillo, F; Pérez, J. Y Gómez, J. (2000) "Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales" *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:73-82.

Cervantes-Zepeda, A. I; Cruz-Colín, M. R; Aguilar-Corona, R; Castilla-Hernández, P; y M. Meraz-Rodríguez (2011) "Caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua tratada en un reactor UASB escala piloto" *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* Vol. 10, No. 1 67-77.

Cisneros Ortiz, M. E. y Noyola Robles, A. (2010) "Metano como fuente de carbono y energía para la desnitrificación biológica de aguas residuales" *REVISTA AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica.* Vol. 3, No. 1, 74-85.

Coleman, J; Hench, K; Garbutt, K; Sexstone, A; Bissonnette G. & Skousen J. (2001) "Treatament of demestic wastewater by three plant species in constructed wetlands". *Water, Air, and Soil Pollution* 128:283-295.

Contreras E. F. (1984). "Manual de Técnicas Hidrobiológicas". *Ed Trillas, México*. D.F., 149 p

Cord-Ruwisch R. (1985). "A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria". *J. Microbiol. Methods* 4:33-36.

Dapena-Mora, A., Fernández, I., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., Jetten, M. S. M. (2007) "Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production" *Enzyme and Microbial Technology* Volume 40, Issue 4:859-865

Dapena-Mora, A., Vázquez-Padín, J. R., Campos, J. L., Mosquera-Corral, A., Jetten, M. S. M., Méndez, R. (2010) "Monitoring the stability of an Anammox reactor under high salinity conditions" *Biochemical Engineering Journal* Volume 51, Issue 3: 167-171

Davis M., Cornwell D. (1991) "Introduction to Environmental Engineering". *2ªed. McGraw Hill International Editions, Singapore.* 7-39 pp.

Eilbeck W.J., Mattock G. (1987) "Chemical Processes in Waste Water Treatment". *Ellis Horwood. New York.* 39-89 pp.

Ferry, J. G. (1993) "Methanogenesis. Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics". *Ed. Chapman & Hall*

Fonkou, T; Ivo, B. S; Lekeufack M; Mekontso T. F. and Amougou A. (2011) "Potential of Cyperus Papyrus in Yard-Scale Horizontal Flow Constructed Wetlands for Wastewater Treatment in Cameroon" *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, Volume 1, Issue 2: 160-168.

Gallegos-García, M; Celis, L. B; Razo-Flores, E. (2010) "Competencia por sustrato durante el desarrollo de biomasa sulfatorreductora a partir de un lodo metanogénico en un reactor UASB" *Rev. Int. Contam. Ambient*. 26 (2) 109-117.

García J; Aguirre P; Mujeriego R; Huang Y; Ortiz L. Y Bayona, J.M. (2004) "Initial contaminant removal performance factors in horitzontal flow reed bedsused for treating urban wastewater" .*Water Research.* 38:1669-1678

García J., Bayona J.M. y Morató J., (2004). "Depuración con sistemas naturales: humedales construidos". *IV Congrés Ibèric de Gestió i Planificació de l'Aigua, Diciembre, Tortosa, España.*

García, J; Morató, J; Bayona, J.M. (2004) "Nuevos criterios para el diseño y operación de humedales construidos" *Ediciones CPTE, UPC*. 100 pp

Gonzalias, A.E.; Kuschk, P.; Wiessner, A.; Jank, M.; Kastner, M. y Koser, H. (2007) "Treatment of an artificial sulphide containing wastewater in subsurface horizontal flow laboratory-scale constructed wetlands" *Ecological Engineering*, 31:259–268

Grant W.D. Long P.E., (1989) "Microbiología Ambiental". Editorial Acribia S.A., Zaragoza.

Hammer, D.A; Bastian R.X; (1989) "Wetlands ecosystems: Natural water purifiers". *In: Hammer, D.A. (Ed.) Constructed Wetlands for Wastewater Treatment. Chelsea, Lewis*, pp 5-19.

Hench, K. R; Bissonnette, G. K; Sexstone, A. J; Coleman, J. G; Garbutt, K. y Skousen, J. G. (2003) "Fate of physical, chemical, and microbial contaminants in domestic wastewater following treatment by small constructed wetlands". *Water Research* 37: 921–927.

Jawed M. and Tare, V. (1999) "Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests" *Water SA* Vol. 25 No. 3 July.

Kadlec, R.H., Knight, R.L. (1996) "Treatment Wetlands". *CRC Press, Florida*, 893 pp.

Kelly G. (1998) "Environmental Engineering". *McGraw Hill International Editions., Singapore.*

Kivaisi, A.K. (2001) "The potential for constructed wetlands for wastewater treatment and reuse in developing countries: a review". *Ecological Engineering* 16:545-560.

Knobelsdorf Miranda J., (2005). "Eliminación biológica de nutrientes en un ARU de baja carga orgánica mediante el proceso VIP". *Tesis doctoral, Escola Técnica Superior d'enginyers de camins canals i ports de Barcelona, Universidad Politécnica de Cataluña. España.*

Madigan M.T, Martinko J.M. y Parker J., (1998). "Brock Biología de los microorganismos". *Octava edición. Prentice Hall, United Kingdom,* 986 pp.

Martel G., Vera L., Salas J.J. y Sardón N. (2006) "Gestión sostenible del agua residual en entornos rurales". *Cap. 1. Proyecto DEPURANAT, cofinanciado por el programa INTERREG IIIBESPACIO ATLÁNTICO. Ed. Instituto Tecnológico de Canarias. España*, 300 pp.

Metcalf y Eddy. (2003) "Wastewater engineering. Treatment and reuse". *4a. edición. Ed. McGraw-Hill. New Cork, Estados Unidos*, 1819 pp.

Misiti, T. M; Hajaya, M. G; Pavlostathis, S. G. (2011) "Nitrate reduction in a simulated free-water surface wetland system" *Water Research* 45:5587-5593.

Odum E.P. (1986) "Fundamentos de Ecología", *Nueva Editorial Interamericana, México.*

Otálora Rodríguez, A. P. (2011) "Evaluación del sistema de tratamiento de aguas residuales domésticas mediante humedales artificiales de alta tasa en la locación petrolera de caño Gandúl". *Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingenieria Química, Bogotá.*

Park, J. Y. y Yoo, J. Y. (2009) "Biological nitrate removal in industrial wastewater treatment: which electron donor we can choose" *Appl Microbiol Biotechnol* 82:415–429

Pérez-Olmedilla, M. y C. Rojo. (2000) "Función depuradora de los humedales I: una revisión bibliográfica sobre el papel de los macrófitos" *Boletín SEHUMED* Año IV – Número 14

Ramahlo R.S. (1991) "Tratamiento de Aguas Residuales", *Editorial Reverté SA, Barcelona*.

Ramírez-Carrillo, M. F; Luna-Pabello, V. M. y J. L. Arredondo-Figueroa (2009) "Evaluación de un humedal artificial de flujo vertical intermitente, para obtener agua de buena calidad para la acuicultura" *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 8, No. 1:93-99

Reed S. C; Crites R.W. Y Middlebrooks E.J. (1995) "Natural systems for Waste Management and Treatment". *2nd edition. McGraw-Hill. New York,* 431 pp.

Rivas Mijares G., (1978). "Tratamiento de aguas residuales". *Ed. Vega. Madrid, España,* 20:534.

Rodriguez-Monroy, J. & Durán-de-Bazúa, C. (2006) "Remoción de nitrógeno en un sistema de tratamiento de aguas residuales usando humedales artificiales de flujo vertical a escala de banco". *Tecnología, Ciencia, Educación. (Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos)* 21(1): 25-33

Rodríguez-Roda I., Comas J. y Poch M. (2008). "Contaminación del agua: origen, control y monitoreo. En: Evaluación y prevención de riesgos ambientales en Centroamérica". *Eds. Andrés P. y Rodríguez, R. Documenta Universitaria. Gerona, España.*

Romero, J. (2004) "Tratamiento de aguas residuales teoría y principios de diseño". Bogotá. *Editorial Escuela Colombiana de Ingeniería*. 4:1248.

Solórzano, L. (1969) "Determination of ammonia in natural wáter gy the phenol-hypochlorite method". *Limnology and Oceanography* 14: 799-801

Turk A., Turk J., Wittes J., Wittes R. (1981) "Tratado de Ecología". *Nueva Editorial Latinoamericana, México.*

Vaillant-Gaveau, N; Monnet, F; Sallanon, H; Coudret, A; and Hitmi, A. (2010) "Removal of organic load from wastewater by using Datura innoxia Mill". *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Mendez-Vilas* (Ed.) 1328-1336pp

Vymazal, J. (2005) "Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment", *Ecological Engineering* 25: 478–490

Vymazal, J; Greenway, M; Tondersky, K; Brix, H; Mander, Ü. (2006) "Constructed Wetlands for Wastewater Treatment" *Ecological Studies* Vol. 190: 69-96.

Yabroudi, Suher C; Alem Sobrinho, P; Morita, Dione M; Matos Queiroz, L; Amaral, M. (2010) "Aplicabilidad del proceso de nitritación/desnitritación en el Tratamiento de lixiviado de relleno sanitario" *Interciencia*, vol. 35, núm. 12, pp. 921-926.

10 ANEXO

10.1 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

10.1.1 AMONIO, MÉTODO ESPECTROTOMÉTRICO

REACTIVOS

- Solución de Fenol (C_6H_5OH): disolver 100g de fenol en 1L de alcohol etílico.
- Solución de Nitroprusiato de Sodio (Na_2 Fe $(CN)_5$ NO*$2H_2O$): disolver1 g de nitroprusiato de sodio se en 200 mL de agua destilada, guardar en botella ámbar. Esta solución es estable más o menos por un mes.
- Reactivo alcalino: pesar 100 g de citrato de sodio ($Na_3C_6H_5O_7$ * $2H_2O$) y 5g de NaOH y disolver en 500 mL de agua destilada. Este reactivo es estable por varios meses.
- Solución de Hipoclorito de sodio (NaOCl): se uso directamente del envase.
- Solución oxidante fresca: Se mezclan 10 mL del reactivo alcalino + 3 mL de hipoclorito de sodio.
- Disolución Patrón de Amonio I (1 g NH_4^+/L): disolver 2.97 g de cloruro de amonio en 1 L de agua destilada.

PROCEDIMIENTO

Curva de calibración: se realizan diluciones por duplicado a partir de la disolución patrón de amonio, para obtener concentraciones de 0.2 a 1.0 mg/L (figura 10.1).

Muestras: Antes del análisis las muestras se filtrar con filtros de 0.45 µm, se realizan las diluciones correspondientes.

Es obligatorio el uso guantes y adicionar los reactivos en campana de extracción.

El procedimiento tanto para los estándares como las muestras es el siguiente:

1. Se colocan 5 mL de muestra o de estándar en un tubo de ensaye con tapa.
2. Se agregan 0.2 mL de fenol y 0.2 mL de nitroprusiato de Sodio y se agitan.
3. Se adicionan 0.5 mL de solución oxidante fresca.
4. Se deja reaccionar por 2 horas en la oscuridad.
5. La lectura se efectúa en un espectrofotómetro a 640 nm.
6. La coloración es generalmente azul-verde.

NOTA: *Los residuos se almacenan en un recipiente etiquetado para su disposición.*

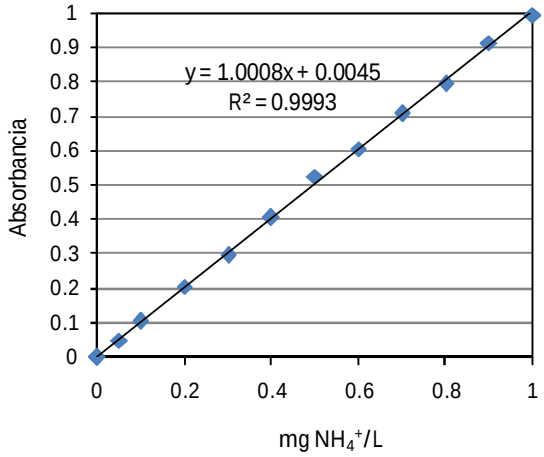


Figura 10.1 Curva de calibración de Amonio por el método espectrofotométrico a 640nm.

10.1.2 NITRATO (SMEWW, 2005)

REACTIVOS

- Ácido Clorhídrico 1 M (HCl):disolver 1.96 mL de HCl en 1L de agua destilada
- Disolución patrón de nitrato: disolver 0.274 g de $NaNO_3$ en 1L de agua destilada (esta disolución es igual a 0.2 gNO_3^-/L).

PROCEDIMIENTO

Curva de calibración: se realizan diluciones por duplicado a partir de la disolución patrón de nitrato, para obtener concentraciones de 2 a 10 mg/L (figura 10.2).

Muestras: Antes del análisis las muestras se filtrar con filtros de 0.45 µm, se realizan las diluciones correspondientes.

Es obligatorio el uso guantes y adicionar los reactivos en campana de extracción.

El procedimiento tanto para los estándares como las muestras es el siguiente:

1. Se colocan 5 mL de muestra o de estándar en un tubo de ensaye con tapa.
2. Agregar 100 µL de HCl 1 M y agitar.
3. La lectura se efectúa en un espectrofotómetro a 220 nm y 275 nm y anotar los valores de cada absorbancia.

4. La absorbancia final es igual a: Abs= $Abs_{220\ nm}$ – (2 $ABS_{\ 275\ nm}$)

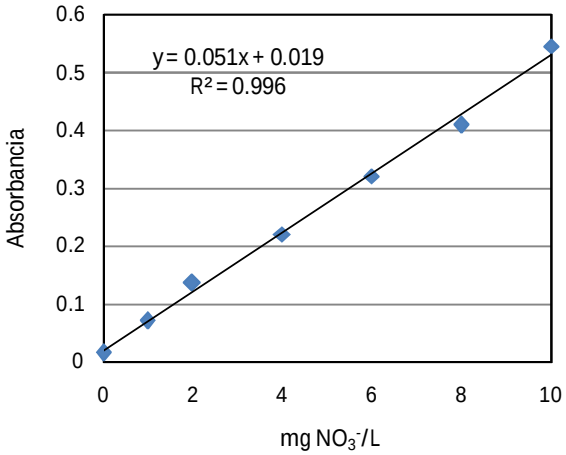


Figura 10.2 Curva de calibración de Nitrato (APHA, 4500 NO_3^- -B)

10.1.3 NITRITO (REACCIÓN DE GRIESS)

REACTIVOS

- Sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$): disolver 10 g de sulfanilamida en 100 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl) aforar a 1 L con agua destilada.
- N-Naftil-Etilendiamina NED ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$): disolver 0.5 g de NED en 500 mL de agua destilada.
- Disolución Patrón de Nitrito: disolver 1.5 g $NaNO_2$ en 1L de agua destilada (esta disolución es igual a 1.0 gNO_2^-/L).

PROCEDIMIENTO

Curva de calibración: se realizan diluciones por duplicado a partir de la disolución patrón de nitrito, para obtener concentraciones de 0.05 a 0.8 mg/L (figura 10.3).

Antes del análisis las muestras se filtran con filtros de 0.45 µm, se realizan las diluciones correspondientes.

Es obligatorio el uso guantes y adicionar los reactivos en campana de extracción.

El procedimiento tanto para los estándares como las muestras es el siguiente:

1) Se colocan 5 mL de muestra o de estándar en un tubo de ensaye con tapa.

2) Adicionar 0.1 mL de solución de sulfanilamida.
3) Esperar 2 min.
4) Adicionar 0.1 mL de solución de N-Naftil-Etilendiamina NED.
5) La lectura se efectúa en un espectrofotómetro a 543 nm.

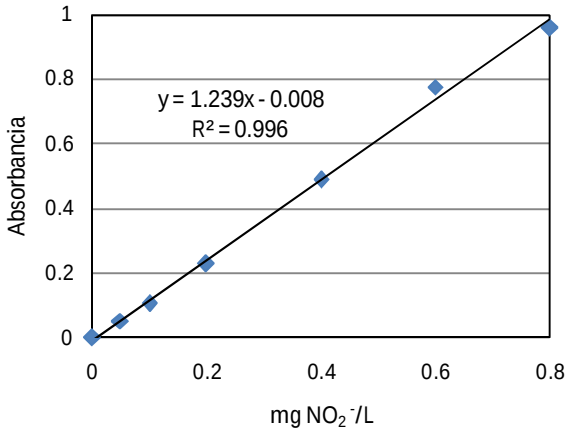


Figura 10.3 Curva de calibración de Nitrito (Reacción de Griess)

10.1.4 SULFURO DISUELTO (CORD-ROWISCH)

REACTIVOS

- Reactivo de cobre: disolver 0.0797 g de sulfato de cobre ($CuSO_4$) en 100 mL de HCl (50 mM)
- Disolución patrón de sulfuro (50-100 mM): pesar aproximadamente 4.8036 g de $Na_2S{\cdot}9H_2O$ y disolverlo en 200 mL de agua libre de oxígeno

PROCEDIMIENTO

Curva de calibración: se realizan diluciones por duplicado a partir de la disolución patrón de nitrito, para obtener concentraciones de 0.05 a 0.5 mg/L (figura 10.4).

Antes del análisis las muestras se filtran con filtros de 0.45 µm, se realizan las diluciones correspondientes.

Es obligatorio el uso guantes y adicionar los reactivos en campana de extracción.
El procedimiento tanto para los estándares como las muestras es el siguiente:

1) Se colocan 4 mL de reactivo de cobre en tubos con tapa.
2) Adicionar 0.1 mL de muestra o estándar y agitar.
3) Adicionar 0.1 mL de solución de N-Naftil-Etilendiamina NED.
4) La lectura se efectúa en un espectrofotómetro a 480 nm

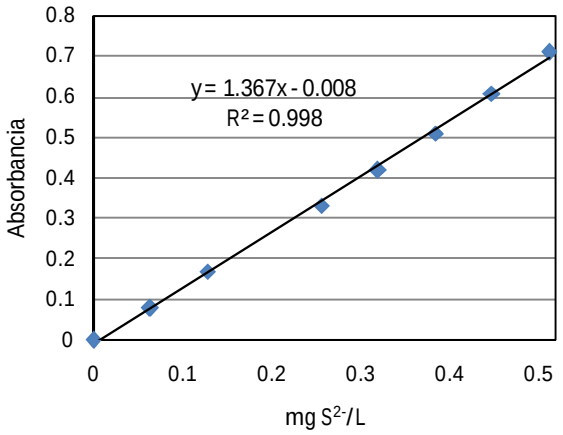


Figura 10.4 Curva de calibración de sulfuro (Cord-Ruwisch)

10.1.5 FOSFATO (MÉTODO DE ACIDO ASCORBICO)

REACTIVOS

- Preparación de Molibdato de amonio: disolver 4 g $(NH_4)_6MoO_{24}\cdot 4H_2O$ en 100 ml de agua destilada, conservar a 4°C.
- Ácido sulfúrico (14 %): Adicionar 140 mL H_2SO_4 concentrado a 1 L de agua destilada.
- Ácido ascórbico (0.1 M): disolver 1.76 g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) en 100 ml de agua destilada. La solución es estable por una semana conservando a 4°C.
- Tartrato antimonil: disolver 0.3 g $K(SbO)C_4H_4O_6\cdot \frac{1}{2}H_2O$ en 100 mL de agua destilada, guardar en botella ámbar a 4°C.
- Disolución patrón de fosfatos: disolver 439.3 mg KH_2PO_4anhidro en 1 L de agua destilada.
- Solución "digestora": Mezclar 2 mL de solución de Molibdato de amonio, 5 mL de solución de ácido sulfúrico, 2 mL de solución de ácido ascórbico y 1 mL de solución de tartrato antimonil.

PROCEDIMIENTO

Curva de calibración: se realizan diluciones por duplicado a partir de la disolución patrón de fosfato, para obtener concentraciones de 400 a 6000 µg/L (figura 10.5).

Antes del análisis las muestras se filtran con filtros de 0.45 µm, se realizan las diluciones correspondientes.

Es obligatorio el uso guantes y adicionar los reactivos en campana de extracción.

El procedimiento tanto para los estándares como las muestras es el siguiente:

1. Adicionar 5 mL de la muestra o estándar a un tubo de ensaye.
2. Adicionar 800 µL de la solución digestora
3. Esperar 10 min y leer.
4. La lectura se efectúa en un espectrofotómetro a 885 nm.

NOTA: Los residuos se almacenan en un recipiente etiquetado para su disposición.

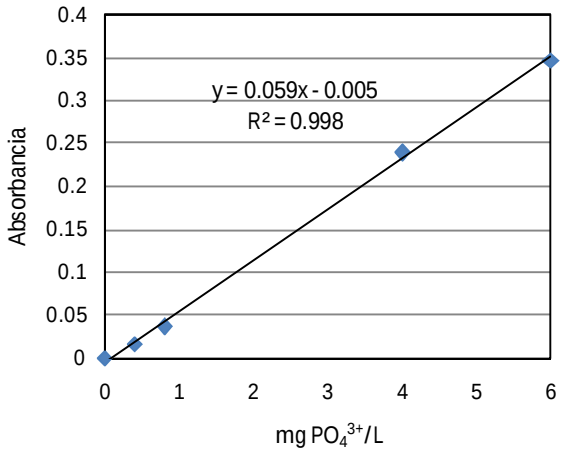


Figura 10.5 Curva de calibración de fosfatos (método del ácido ascórbico)

10.1.6 DEMANDA QUIMICA DE OXÍGENO (DQO) (SMEWW, 2005)

REACTIVOS

- Solución digestora: Secar durante 2 hrs. a 103°C 50 g de $K_2Cr_2O_7$, enfriar en desecador y pesar 42.255 g y 33.3 g de $HgSO_4$. Estos reactivos deberán pesarse en material de vidrio. En un matraz aforado, disolver el dicromato de potasio en 500 ml. de agua destilada. Añadir el sulfato

mercúrico. Adicionar en baño de hielo y muy lentamente 167 ml. de H_2SO_4 puro. Cuando haya enfriado la mezcla, aforar a 1 L.

- Solución de Ácido Sulfúrico puro con sulfato de plata:
  - Disolver 5.5 g Ag_2SO_4 en 300 ml del ácido sulfúrico
  - Dejar en reposo uno o dos días para que se disuelva y aforar a 1L con ácido sulfúrico.
  - Debido a las proporciones en que se utilizan los reactivos, deberán prepararse 2 L de la solución por cada litro de la solución de dicromato.
  - Vaciar cada reactivo preparado en los frascos dispensadores respectivos.

PROCEDIMIENTO

Curva estándar (figura 10.6) con biftalato de potasio en concentraciones de 0 a 1500 mg/L.
Preparar el reactivo de digestión en tubos con tapa de rosca, añadiendo 1.0 ml de la solución digestora.
Añadir lentamente 2.0 ml de solución de ácido de plata.
Tapar perfectamente y homogenizar la mezcla mediante agitación suave.
Guardar los tubos en oscuridad

1. Encender la parrilla para DQO y dejarla calentando por 30 min. para alcanzar la temperatura adecuada.
2. A los tubos con el reactivo agregar lentamente 2.0 ml de la muestra a analizar o 2.0 ml. de agua destilada para el blanco o 2.0 ml. de estándar para verificar la curva. Tapar perfectamente y homogenizar la mezcla mediante agitación suave.
3. Colocar los tubos en la parrilla para digestión a 150°C durante 2 hrs.
4. Transcurrido el tiempo sacarlos de la parrilla y dejar enfriar.
5. Encender el Espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda a 620 nm. Verificar que el filtro correspondiente este instalado.
6. Ya fríos los tubos, calibrar con el blanco preparado y leer las muestras.
7. Desechar las muestras ya leídas en tanque destinados para estos residuos.

NOTA: La muestra representará la DQO total, mientras que el sobrenadante centrifugado de la muestra será la DQO soluble.

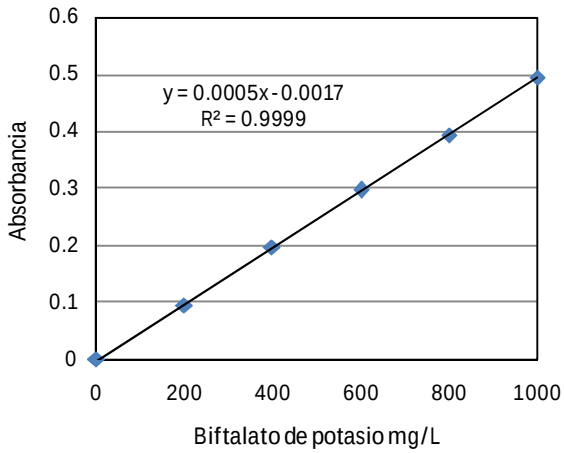


Figura 10.6 Curva de calibración de DQO por método colorimétrico.

10.1.7 SÓLIDOS SUSPENDIDOS TOTALES (SST)

PROCEDIMIENTO

Se taran individualmente en cápsulas de porcelana los filtros estándar necesarios y se anota el peso inicial seco, determinado a 103-105°C.

Se filtra un volumen determinado de muestra homogeneizada a través de un filtro tarado, con una bomba de vacío.

Se seca en estufa a 103- 105°C hasta peso constante (B).

• Cálculo:

SST (mg/litro) = [(A-B)*1000]/Volumen de muestra (ml)

A: peso de residuo seco + filtro (mg)

B: tara del filtro (mg)

Se seca a 500°C hasta calcinar, por 30 minutos. Nuevamente se seca a 103-105°C para templar las capsulas y evitar que se quiebren, una vez que se hayan enfriado en desecador se pesan (C).

• Cálculo:

SSV (mg/litro) = [(A-C)*1000]/Volumen de muestra (ml)

A: peso de residuo seco + filtro (mg)

C: tara del filtro calcinado (mg)

• Cálculo:

SST-SSV= SSF

10.2 MICROBIOLÓGICO

10.2.1 ACTIVIDADES METANOGENICAS:

REACTIVOS

- Buffer fosfatos: disolver 1.43 g/L de KH_2PO_4 y 7.47 g/L de en 1L de agua destilada, conservar a 2ºC.
- Medio basal para actividades metanogénicas **(Balch et al., 1979)**:

Cuadro 5.1 Medio basal

Compuesto	Por L
Solución mineral I	50 ml
Solución mineral II	50 ml
Oligoelementos	10 ml
Solución de Vitaminas	10 ml
Resarzurina	1 g
Extracto de levadura	0.1 g
Peptona de caseína	0.1 g
Bicarbonato de sodio	2.0 g
Solución $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1 ml
Solución de NaCl	10 ml (0.005%)
Cisteína	0.5 g

SOLUCIÓN MINERAL I:

Compuesto	g/L
KH_2PO_4	6
$(NH_4)_2SO_4$	6
NaCl	12
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.6
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.16

SOLUCIÓN MINERAL II:

296g de KH_2PO_4/L

SOLUCIÓN DE VITAMINAS

Compuesto	mg/L
Biotina	2
Ácido fólico	2
PiridoxinaHCl	10
Tiamina HCl (B1)	5
Riboflavina (B2)	5
Ácido nicotínico	5
DL-pantotenato Ca	5
Cianocobalamina (B12)	0.01
Ácido p-aminobenzóico	5
Ácido lipoico	5

SOLUCIÓN DE OLIGOELEMENTOS

Compuesto	g/L
Ácido nitriloacético	1.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	0.5
NaCl	1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1
$ZnCl_2$ ó $ZnSO_4$	0.1
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.01
$AlK(SO_4)_2$	0.01
H_3BO_3	0.01
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0.01

- Sustratos para actividades metanogénicas

Actividad	Sustrato	g/L
Acetoclástica	acetato	0.6
Hidrogenotrófica	H_2	0.45
Agua residual	DQO	12.0

PROCEDIMIENTO

-Se lava la biomasa 3 veces con solución buffer fosfatos

-Se resuspende en suficiente medio basal y distribuye en botellas serológicas de 60 mL, agregando 50 mL en cada una. Se realiza un control sin sustratos. Para el caso de la cinética con agua residual la biomasa se resuspende en ésta.

-Se sellan las botellas y se intercambia la atmosfera con N_2/CO_2 para las actividades acetoclásticas y agua residual, con hidrógeno para las actividades hidrogenotróficas, y con helio el control de hidrógeno.

-Se adiciona 0.1 mL de Na_2S (20%) únicamente a las botellas de la actividad acetoclástica y con agua residual.

-Se adiciona el sustrato correspondiente a cada cinética (acetato, hidrógeno)

-Se incuban a 30ºC y con agitación constante a 100 rpm.

- Se realizan muestreos, a distintos intervalos de tiempo, de la fase gaseosa y fase líquida.

- Los análisis a realizar son: producción de metano por cromatografía de gases y DQO en la fase líquida.

- Se calcula la actividad específica a partir de la pendiente máxima y el contenido de STV en cada botella.

10.2.2 ACTIVIDADES DESNITRIFICANTES AUTÒTROFAS Y HETERÓTROFAS:

REACTIVOS

- Medio mineral

Cuadro 5.2 Medio mineral

Compuesto	g/L
$NaHCO_3$	1.5
Na_2HPO_4	1.5
KH_2PO_4	0.3
NH_4Cl	0.1
Micronutrientes	1 mL

Micronutrientes

Compuesto	g/L
$Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$	1.0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	30.0
$ZnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.0
$CaCO_3$	2.0
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.5
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.25
HCl (32%)	50.00
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.25
H_2BO_3	0.50

- Sustratos para actividades desnitrificantes

Actividad	Sustrato	g/L
Autótrofa con sulfuro	Sulfuro de sodio	0.4
	Nitrato	0.2
Autótrofa con tiosulfato	Tiosulfato	1.7
	Nitrato	0.6
Heterótrofa con acetato	Acetato	0.15
	Nitrato	0.18

PROCEDIMIENTO

-Se lava la biomasa 3 veces con solución buffer fosfatos

-Se resuspende en suficiente medio basal y distribuye en botellas serológicas de 60 mL, agregando 50 mL en cada una. Se realiza un control sin sustratos.

-Sellar y cambiar atmosfera con helio

-Adicionar los sustratos correspondientes a cada cinética, sulfuro/nitrato, tiosulfato/nitrato.

-Se incuban a 30ºC y con agitación constante a 100 rpm.

-Se realizaron muestreos, a distintos intervalos de tiempo, de la fase gaseosa y fase líquida.

- Se calcula la actividad específica a partir de la pendiente máxima y el contenido de STV en cada botella.

-Mantener en agitación constante (100 rpm) y a 30ºC

-Se realizaron muestreos, a distintos intervalos de tiempo, de la fase gaseosa y fase líquida.

- Los análisis a realizar son: producción de nitrógeno por cromatografía de gases; DQO, nitrato, nitrito en la fase líquida.

- Se calcula la actividad específica a partir de la pendiente máxima y el contenido de STV en cada botella.

10.2.3 ACTIVIDAD ANAMMOX

REACTIVOS

- Medio mineral anammox

Cuadro 6.3 Preparación de medio anammox

Compuesto	g/L
$KHCO_3$	0.5
KH_2PO_4	0.027
$MgPSO_4{\cdot}7H_2O$	0.3
$CaCl_2$	0.18
Micronutrientes I	1 mL
Micronutrientes I	1 mL

MICRONUTRIENTES I

Compuesto	g/L
EDTA	5
$FeSO_4$	5

MICRONUTRIENTES II

Compuesto	g/L
EDTA	15.0
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.43
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.24
$MnCl_2 . 4H_2O$	0.99
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.25
$NaMoO_4{\cdot}2H_2O$	0.22
$NaSeO_4{\cdot}10H_2O$	0.21
$NiCl_2 . 6H_2O$	0.19
H_3BO_4	0.014

- Sustratos para actividad anammox

Actividad	sustrato	g/L
Anammox	Amonio	0.09
	Nitrito	0.23

PROCEDIMIENTO

-Se lava la biomasa 3 veces con solución buffer fosfatos

-Se resuspende en suficiente medio basal y distribuye en botellas serológicas de 60 mL, agregando 50 mL en cada una. Se realiza un control sin sustratos.

-Sellar y cambiar atmosfera con helio

-Adicionar los sustratos, amonio y nitrito.

-Se incuban a 30ºC y con agitación constante a 100 rpm.

-Se realizaron muestreos, a distintos intervalos de tiempo, de la fase gaseosa y fase líquida.

- Los análisis a realizar son: producción de nitrógeno por cromatografía de gases; amonio, nitrato, nitrito en la fase líquida.
- Se calcula la actividad específica a partir de la pendiente máxima y el contenido de STV en cada botella.

10.2.4 SULFATO REDUCTORA

REACTIVOS

- Medio basal

El medio mineral es el utilizado en la actividad metanogénica.

- Sustratos para actividad sulfato reductora

Actividad	sustrato	g/L	Relación DQO/SO_4^{2-}
Sulfato reductora	Acetato	0.59	0.67
	DQO-Acetato	0.22	
	Sulfato	0.96	

PROCEDIMIENTO

Se lava la biomasa 3 veces con solución buffer fosfatos
-Se resuspende en suficiente medio basal y distribuye en botellas serológicas de 60 mL, agregando 50 mL en cada una. Se realiza un control sin sustratos.
-Sellar y cambiar atmosfera con helio
-Adicionar los sustratos correspondientes sulfato y acetato.
-Se incuban a 30ºC y con agitación constante a 100 rpm.
-Se realizaron muestreos, a distintos intervalos de tiempo, de la fase gaseosa y fase líquida.
- Los análisis a realizar son: producción de metano por cromatografía de gases; sulfuro en la fase líquida.
- Se calcula la actividad específica a partir de la pendiente máxima y el contenido de STV en cada botella.