

**Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada**



**TRATAMIENTO AVANZADO Y REMOCIÓN DE BACTERIAS PATOGENAS DE  
AGUAS RESIDUALES MEDIANTE UN BIO-REACTOR HIBRIDO (acoplamiento  
de tapetes microbianos y membranas poliméricas).**

**TESIS**

**MAESTRIA EN CIENCIAS**

**Giulliana Ivette Martinez Cortes**

Ensenada, Baja California, Mexico, Abril 2010



TESIS DEFENDIDA POR

**Giuliana Ivette Martínez Cortes**

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



---

Dr. José de Jesús Paniagua Michel  
*Director del Comité*



---

Dr. Jorge Olmos Soto  
*Miembro del Comité*



---

Dr. Heriberto Márquez Becerra  
*Miembro del Comité*



---

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

*Coordinador del programa en  
ciencias con orientación en  
Biotecnología Marina*



---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Director de Estudios de Posgrado*

7 de Abril de 2010

**RESUMEN** de la tesis de **Giuliana Ivette Martinez Cortes**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación a Biotecnología Marina. Ensenada Baja California. Abril, 2010.

**TRATAMIENTO AVANZADO Y REMOCION DE BACTERIAS PATOGENAS DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE UN BIORREACTOR HIBRIDO (acoplamiento de tapetes microbianos y membranas poliméricas).**

Resumen aprobado por:



---

Dr. José de Jesús Paniagua Michel

Director de Tesis

El objetivo de este trabajo fue construir un biorreactor híbrido que combina tapetes microbianos con una membrana polimérica para bio-remediar y remover bacterias coliformes del efluente de aguas residuales municipales, El Gallo, que descarga en la Bahía de Todos Santos, Ensenada BC. Los resultados obtenidos en el concepto de Bio-reactor con tapetes microbianos en tres concentraciones diferentes de carga de  $\text{NH}_4$ : baja (10.45 ppm), media (48.44 ppm) y alta (155.22 ppm) del agua residual (5 a 10 Litros) demuestran la eficiencia de la componente de tapetes microbianos en la disminución sustantiva en coliformes, > 80 %. El acoplamiento de la membrana realiza la eliminación de coliformes ca. 100 %. Las diferencias obtenidas en las pruebas estadísticas (con tapete vs sin tapete) realizadas son altamente significativas ( $p < 0.05$ ) en la reducción de nutrientes y coliformes totales obtenidos durante la experimentación. La diferencia entre tapete microbiano y la membrana de microfiltración también fue significativa ( $p < 0.05$ ), reiterando y demostrando los resultados obtenidos. El análisis de la cinética de remoción y nitrificación realizada mediante cromatografía iónica de la carga amoniacal registro valores de remoción de amonio de 90-100 %, y de producción y remoción de nitrito y nitrato (del 30-90%) indicativo del consumo de iones terminales del proceso de nitrificación por la comunidad microbiana. Simultáneamente el oxígeno autogenerado coadyuvo en los procesos de remoción y nitrificación, las condiciones de sobresaturación aunado a la liberación potencial de sustancias tipo antibióticos, alelopáticas pudieron contribuir a inhibir y controlar el crecimiento de bacterias coliformes. El acoplamiento de la componente de membrana de microfiltración (0.1-10 micras) realizó el pulimiento del agua posterior a un tiempo de retención hidráulica de 5 horas. El biorreactor híbrido (tapete microbiano acoplado a membrana) tiene la capacidad para mitigar el nivel de coliformes del efluente de aguas residuales municipales (El Gallo-El Naranjo) a un nivel superior al 90 % a niveles bajos de energía y costos. El método desarrollado permitió mejorar la calidad del efluente en lo que respecta a la bio-remediación y aprovechamiento de nutrientes generando agua de calidad para el reúso y/o vertimiento en aguas y bienes nacionales de acuerdo a la norma oficial Mexicana sin impactar el ambiente y a un riesgo reducido para la salud humana.

**Palabras clave:** agua residual, tapete microbiano, membrana, biorremediación, coliformes.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Giuliana Ivette Martinez Cortes**, as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree, orientation in **MARINE BIOTECHNOLOG**. Ensenada Baja California, México. April, 2010.

**ADVANCED TREATMENT AND REMOVAL OF PATHOGENIC BACTERIA OF WASTEWATERS BY A HYBRID BIOREACTOR (coupling microbial mats to polymeric membrane)**

The objective of this work was to construct a hybrid bioreactor coupling microbial mats to a polymeric membrane aiming to perform a bioremediation process and removal of coliform bacteria from the municipal wastewater effluent, El Gallo, discharging at the Todos Santos, Ensenada Bay. The obtained results with the concept of Bioreactor packed with microbial mats at three different concentrations of ammonia loading: low (10.45 ppm), mean (48.44 ppm) and high (155.22ppm) of wastewater (5 a 10 Liters) shown the efficiency of the microbial mat in the substantive reductions in coliform bacteria, > 80 % (483 NMP) when compared to the control lacking microorganisms. Coupling the membrane achieved full removal of coliforms, ca. 100%. Concentring nutrients and coliform removal, the obtained differences from the statistical analysis (with and without mat respectively) are highly significative (  $p < 0.05$ ). The difference between microbial mat and microfiltration membrane was also significative ( $p < 0.05$ ), corroborating the obtained results. Analysis of the kinetics of removal and nitrification performed by ion chromatography of the ammonia load registered ammonium removal values of 90-100 % and production and removal of nitrite and nitrate (30-90%) indicative of terminal ion consumption of the nitrification process by the microbial community. Simultaneously, the self-generated oxygen contributed in the process of removal and nitrification, supersaturation conditions coupled with the potential release of antibiotic like substances, allelophatic might contribute to inhibit and control coliform bacteria. Coupling of the microfiltration membrane (0.1-10 microns) achieved the polishing of the wastewater after a hydraulic retention of 5 hours. The hybrid bioreactor (microbial mat coupled to membrane) had the ability to mitigate the level of coliform bacteria of the municipal wastewater effluent (El Gallo-El Naranjo) to a level above 90 % at low energy and costs. The developed method improved the quality of the effluent with respect to bioremediation and reuse of nutrients producing quality water for reuse and/or discharging into national waters according to the Mexican Official Norm without impacting the environment and at reduced risk to human health.

**Key words:** wastewater, microbial mat, membrane, bioremediation, coliforms

## Dedicatorias

*A Dios por permitirme acabar después de una situación tan difícil, a mi esposo por estar siempre cerca de mí y darme su apoyo incondicional y a mis padres por mostrarme todo su apoyo siempre.....*

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigación Científica y de Educación superior de Ensenada (CICESE), al departamento de Biotecnología Marina por todas las facilidades brindadas en el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Al Fondo Sectorial de Investigación En Salud-Conacyt (Fosalud) por apoyar el desarrollo de esta tesis y la beca otorgada.

A mi director de tesis, Dr. José de Jesús Paniagua Michel por su aceptación, apoyo y confianza otorgada durante la realización de esta tesis.

A mis sinodales el Dr. Jorge Olmos Soto y el Dr. Heriberto Márquez Becerra por su apoyo y asesoramiento en el desarrollo del proyecto de tesis.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria por brindarme su ayuda en el préstamo de equipo y reactivos.

A la Comisión del Agua (CESPE), por el acceso y facilidades otorgadas.

A mis amigos (Cla y Checho) por siempre darme ánimos y consejos a pesar de la lejanía.

A mis compañeros y amigos por brindarme su apoyo durante mi estancia.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
Resumen español.....	i
Resumen Ingles.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de tablas.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	6
1. Propiedades de las membranas: a nivel de patógenos.....	7
III. JUSTIFICACIÓN.....	11
IV. OBJETIVOS.....	12
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1. Muestreo de microorganismos.....	13
2. Evaluación de medios de cultivo.....	13
3. Construcción del tapete microbiano.....	15
a) Microalgal – cianobacterial.....	15
b) Nitrificantes.....	15
i. Prueba de microorganismos nitrificantes.....	16
ii. Establecimiento de bacterias oxidantes de amonio y nitrito.....	16
iii. Cinética de consumo de amonio.....	17
c) Construcción de Tapetes microbianos y empacado de reactores.....	17
4. Microscopia.....	18
A) Microscopio óptico.....	18

B) Microscopio Electrónico <b>Continuación</b> .....	<b>pag.</b>
5. Unidad Experimental.....	18
a) Concepto y Diseño del Bio-reactor Híbrido (TM-MBR).....	18
b) Acoplamiento de componentes, el Biorreactor Híbrido.....	20
6. Monitoreo de Bio – remediación.....	20
a) Análisis de Parámetros de Calidad de agua.....	21
b) Tiempo de Retención Hidráulica.....	21
c) Monitoreo de Bacterias Patógenas y Coliformes.....	22
d) Eficiencia de remoción.....	23
e) Análisis Estadístico.....	23
VI. RESULTADOS.....	25
1. Muestreo de microorganismos.....	25
2. Colecta y aclimatación de microorganismos.....	25
- Evaluación de medios de cultivo .....	26
3. Microorganismos presentes en el tapete microbiano.....	28
4. Diseño y componentes de un reactor híbrido (TM-MBR).....	30
A) Integración de componentes: Bio-reactor Híbrido.....	31
5. Pruebas de Bio-remediación.....	32
A) Efecto de la componente microalgal en la cinética de remoción y nitrificación en función del volumen (5L).....	32
a) Experimento con tapetes poblados de microalgas y un volumen de trabajo de 10L.....	38
B) Caracterización de bacterias nitrificantes aerobias. Pruebas de utilización de sustrato.....	41
C) Pruebas de Bioremediación con tapetes microbianos construidos con microalgas y bacterias nitrificantes.....	43
D) Tiempos de retención hidráulica (TRH).....	54
E) Coliformes.....	55
F) Pruebas Estadísticas.....	57
VII. DISCUSIÓN.....	59

<b>Continuación....</b>	<b>pag.</b>
A. Tapetes microbianos: Bio-remediación y reducción de Coliformes.....	59
a) Efecto de la variabilidad de carga amoniacal del agua residual.....	61
<i>i. Cinética con carga amoniacal elevada.....</i>	<i>61</i>
<i>ii. Efecto a nivel de coliformes.....</i>	<i>64</i>
<i>iii. Cinética con carga amoniacal mediana.....</i>	<i>65</i>
<i>iv. Efecto a nivel de coliformes.....</i>	<i>65</i>
b) Acoplamiento del bio-reactor Tapetes Microbianos: Membrana.....	68
i. Efecto a nivel de coliformes.....	68
VIII. CONCLUSIONES.....	69
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	71
APENDICE.....	79

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<b>Página</b>
1. Muestreo en la salida de las plantas de tratamiento el Gallo y el Naranja	25
2. Imagen del crecimiento de microalgas en medio F2 y efluente de la muestra M1.	26
3. Placas con efluente como medio para la conservación de las especies	26
4. Especies crecidas en efluente antes de la creación de los tapetes microbianos y observadas a 40-100 x.	28
5. Especies encontradas dentro del tapete microbiano vistas a un aumento 40 y 100 x.	29
6. Micrografías de las especies encontradas dentro del tapete microbiano conformado por microalgas y bacterias.	29
7. Primera etapa del biorreactor empaquetada con tapetes microbianos	30
8. Segunda etapa modulo de membrana.	31
9. Bio-reactor hibrido (TM-MBR), cuyos componentes son los siguientes A) Bio-reactor empaquetado con tapetes microbianos, B) Válvula de control para el flujo de tratamiento, C) Tanque de compensación de agua tratada, D) Válvula de control de paso de agua, E) Reactor de membrana, F) Bomba y G) Permeado.	32
10. Fotografía de los reactores con tapetes microalgales contruidos (izquierda) y sus respectivos controles (derecha). Las concentraciones iniciales del efluente con el cual se trabajo son presentadas en la tabla VI, la concentración de los aniones y cationes presentes en las muestras fue realizada en base al método de cromatografía de intercambio iónico.	33
11. Cromatografía iónica aplicada a las muestras analizadas	34
12. Concentraciones obtenidas para el Reactor experimental TM de degradación de $\text{NH}_4$ , con tapete microbiano solo con microalgas en	35

- un volumen de 5L y el control TM.
13. Concentraciones obtenidas para A) el Reactor experimental TM de degradación de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ , con tapete microbiano solo con microalgas en un volumen de 5L y B) el reactor control TM. 36
  14. Eficiencias de remoción del reactor TM en la reducción de A)  $\text{NH}_4$  y B)  $\text{NO}_2$ . 36
  15. A) Coliformes presentes antes y al final de la experimentación, con el tapete microbiano formado con microalgas y un volumen de 5L además de la B) eficiencia de remoción. 37
  16. A) Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de degradación de  $\text{NH}_4$  y K con tapete microbiano solo con microalgas en un volumen de 10L y B) Eficiencias de remoción de  $\text{NH}_4$  38
  17. Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de degradación de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ , con tapete microbiano solo con microalgas en un volumen de 10L. 39
  18. Eficiencia de remoción del reactor TM en la reducción de  $\text{NO}_2$ , con un volumen de trabajo de 10L 39
  19. A) Coliformes presentes antes y al final de la experimentación, con el tapete microbiano formado con microalgas y un volumen de 10L, además de la B) eficiencia de remoción 40
  20. Gráfica de la concentración de A) los sólidos volátiles y B) los sólidos totales determinados para la experimentación con reactores TM experimental y reactores TM control con una capacidad de trabajo de 10L 40
  21. Imágenes mediante microscopía electrónica de barrido de bacterias oxidantes de amonio (A) y de nitrito respectivamente (B) 41
  22. A) Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de consumo de  $\text{NH}_4$  en tapete de bacterias amonio – oxidantes en un volumen de 5L de agua residual, y posteriormente a la adición del sustrato amonio 42
  23. Comportamiento del A)  $\text{NO}_2$  y B)  $\text{NO}_3$  en los tapetes nitrificantes contruidos con bacterias nitrito oxidante y enriquecido con  $\text{NaNO}_2$  después de su agotamiento en el efluente original, volumen de trabajo 5 L 43
  24. A) Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de degradación de  $\text{NH}_4$  con tapete microbiano estructurado completamente 45

- (microalgas + bacterias) en concentración (155 ppm) alta de  $\text{NH}_4$
25. Concentraciones obtenidas para el Reactor TM A) experimental y B) control de degradación de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ , con tapete microbiano estructurado, en concentración (155 ppm) alta de  $\text{NH}_4$  45
  26. A) Coliformes totales presentes antes y al final de la experimentación, con el tapete microbiano estructurado totalmente (microalgas + bacterias) y en concentración (155 ppm) alta de  $\text{NH}_4$ , además de la B) Eficiencia de remoción 46
  27. Grafica de A) los sólidos volátiles y B) los sólidos totales determinados para la experimentación 47
  28. A) Concentraciones obtenidas para los Reactores TM de degradación de  $\text{NH}_4$  experimental y control con tapete microbiano completamente estructurado en concentración (48.44 ppm) media de  $\text{NH}_4$ , además de la B) Eficiencia de remoción 48
  29. Concentraciones obtenidas para A) el Reactor TM experimental y B) control de degradación de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$  con tapete microbiano estructurado y una concentración media de  $\text{NH}_4$  (48.44 ppm) 48
  30. A) Coliformes presentes antes y al final de la experimentación, con el tapete microbiano totalmente estructurado y una concentración media de  $\text{NH}_4$  (48.44 ppm), además de la B) eficiencia de remoción 49
  31. Grafica de A) los sólidos volátiles y B) los sólidos totales determinados para la experimentación 50
  32. A) Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de degradación de  $\text{NH}_4$  con tapete microbiano totalmente estructurado con concentración de  $\text{NH}_4$  de 65.79 ppm y B) Eficiencias de remoción de  $\text{NH}_4$  51
  33. Concentraciones obtenidas para A) el Reactor TM experimental y B) control de degradación de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ , con tapete microbiano estructurado y una concentración de 65.79 ppm 52
  34. A) Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de degradación de  $\text{NH}_4$  con tapete microbiano totalmente estructurado con concentración de  $\text{NH}_4$  de 10.45 ppm después de agregarle cloruro de amonio y B) Eficiencias de remoción 52
  35. Concentraciones obtenidas para A) el Reactor TM experimental y B) control de degradación de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ , con tapete microbiano estructurado y una concentración de  $\text{NH}_4$  de 10.45 ppm después de 53

- agregarle cloruro de amonio
36. Sólidos volátiles presentes durante el experimento con una concentración de  $\text{NH}_4$  de 10.45 ppm después de agregarle cloruro de amonio. 54
  37. Tiempo de retención hidráulica (TRH) para el porcentaje de remoción obtenido para coliformes. 55
  38. Imagen real del Bio-reactor Tapete Microbiano-Membrana y sus componentes. 1, alimentación; 2, Reservorio de compensación; 3, Membrana de microfiltración (sulfona polyether); 4, Bomba; 5, Agua permeada. 56
  39. Remoción de  $\text{NH}_4$  del tapete microbiano y el soporte aplicando ANOVA de una vía. 58

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Concentración promedio de los indicadores de contaminación fecal en aguas residuales. INCO (International Co-operation with Developing Countries) 2001.	4
II. Clasificación proceso de separación de membranas.	10
III. Composición de medios de cultivo usados en la evaluación.	14
IV. Método de evaluación estadístico.	24
V. Tabla de proporciones para le evaluación de los medios.	27
VI. Concentraciones obtenidas para efluente usado durante la experimentación (9/julio/2009).	33
VII. Concentraciones obtenidas para efluente usado durante la experimentación (17/ agosto/ 2009).	38
VIII. Concentraciones obtenidas para el efluente de trabajo (21/10/09).	44

IX. Concentraciones obtenidas por el cromatógrafo de intercambio iónico para el efluente de trabajo (29/10/09).	47
X. Concentraciones obtenidas por el cromatógrafo de intercambio iónico para el efluente original de trabajo (18/11/09).	50
XI. Tabla representativa de los tiempos de retención hidráulica (TRH) en la remoción de $\text{NH}_4$ .	55
XII. Coliformes totales registrados en los reactores con tapete microbiano así como con la membrana.	57
XIII. Resultados de la ANOVA de una vía, de la remoción de $\text{NH}_4$ .	57
XIV. Resultados de la ANOVA de una vía, de la remoción de coliformes.	58

## I. INTRODUCCION

Las aguas residuales son aguas de composición variada proveniente de descargas de usos municipales, industriales, comerciales de servicios agrícolas, pecuarios, domésticos incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas, las cuales contienen coliformes que están constituidos por un grupo heterogéneo de bacterias. Estas aguas se tratan mediante procesos individuales o combinados de tipo físico, químico, biológico u otros, que se han adecuado para hacerlas aptas para su reúso en servicios públicos o para evitar un impacto ambiental en ríos y costas (NOM-003-Ecol-1996). Asimismo el tratamiento de las aguas residuales es necesario para la prevención de la contaminación ambiental y del agua, para la protección de la salud pública (Reynols, 2002) así como para fines de reúso.

El manejo efectivo de aguas residuales debe dar como resultado un efluente ya sea reciclado o reusable, o que pueda ser descargado de manera segura en el medio ambiente. La meta del tratamiento de aguas residuales nunca ha sido producir un producto estéril, sin especies microbianas, sino reducir el nivel de microorganismos dañinos a niveles más seguros de exposición, donde el agua es comúnmente reciclada para el riego o usos industriales. Al escoger la tecnología apropiada de tratamiento, deben considerarse cierto número de factores, incluyendo la cantidad y composición de residuos, los estándares del efluente, opciones indicadas de uso y desecho, alternativas de pre tratamiento industrial y factibilidad de funcionamiento (aspectos económicos y técnicos) (Reynols, 2002).

El tratamiento de aguas residuales domesticas e industriales generadas en nuestro país, producto de la actividad antropogénica, requiere de especial atención por parte de la sociedad, gobierno y de los sectores productivos. La descarga inminente de las aguas residuales incide en la mayoría de los casos sobre cuerpos de agua, ocasionando serios problemas de contaminación colateral

y eutrofización e incluso la muerte de algunos sistemas acuáticos ya que las descargas de materia orgánica son superiores a la capacidad de autodepuración de los ecosistemas. Este es el principal aspecto que requiere de especial atención, lo que aunado a la recuperación reviste de gran importancia debido a su papel en el ciclo hidrológico y a los efectos dañinos que provocan en el medio ambiente (Salazar, 2006).

En áreas costeras alrededor del mundo, los ecosistemas delicados son continuamente impactados por cantidades elevadas de nitrógeno disuelto y fosforo debido al tratamiento inadecuado, llegando a ser este tipo de efluentes tóxicos para la vida marina (Zamora *et al.*, 2007), así mismo estas aguas contienen una gran cantidad de organismos patógenos provocando daño a los bañistas donde el agua es descargada.

En México se registro para el año 2006, 1 593 plantas en operación en el país las cuales tratan 74.4 m<sup>3</sup>/s, es decir el 36% de los 206 m<sup>3</sup>/s recolectados en los sistemas de alcantarillado (CONAGUA, 2007). El tipo de tratamiento más usado es el secundario en 1031 plantas y un gasto de operación de 16 902 l/s, en segundo lugar queda el tratamiento primario y en tercer lugar el tratamiento terciario, el cual se lleva a cabo en 57 plantas y un gasto de 742 l/s (Pacheco, 2007).

No obstante, el efluente secundario obtenido (aguas tratadas), aún posee una alta concentración de nutrientes inorgánicos disueltos que pueden originar el fenómeno de eutrofización (crecimiento masivo de productores primarios por sobrecarga de nitrógeno y fosforo) cuando son descargados en los diferentes sistemas acuáticos sin omitir la carga de enterobacterias coliformes.

Las principales plantas de tratamiento de Ensenada representan un volumen total de tratamiento de 620 l/s, de los cuales, la planta del Sauzal (volumen de tratamiento 50 l/s), El Gallo 180 l/s y El Naranjo 450 l/s son parte del 25 plantas

de tratamiento en Baja California (total de 4930 l/s). Las plantas de tratamiento de la ciudad de Ensenada solo realizan un tratamiento secundario a las aguas residuales. El efluente principal y de mayor volumen que se descarga en la Bahía de Ensenada, recibe las aguas tratadas por las plantas de tratamiento del Naranja y del Gallo (250 L/s por la planta el Gallo y de 320 L/s por la planta del Naranja) y solo el 2% por cada planta es llevado a tratamiento terciario por lámparas UV. Aunque reportes no oficiales y oficiales indican que el agua tratada cumple con las normas oficiales para irrigación y reúso (productos agrícolas no comestibles) lo cierto es que la gran variabilidad de los efluentes limita fuertemente este aspecto.

El problema actual con respecto a los niveles de los compuestos nitrogenados y fosfatados de esa descarga de aguas residuales (389.4Kg/d y 38.8 Kg/d respectivamente (Zamora *et al.*, 2007)), es que presentan oscilaciones estacionales y diarias que llegan a ser superiores a lo establecido para su descarga en el medio marino. De igual forma las aguas son el principal foco dispersor de patógenos en ambientes acuáticos, la concentración promedio de las aguas residuales se muestra en la tabla I (Díaz *et al.*, 2003). Los indicadores patógenos (bacterianos, virales y parasitarios), son eliminados al agua a través de las heces de animales o de individuos contaminados los cuales inducen infecciones gastrointestinales (Vail *et al.*, 2003), shigelosis, cólera, Measels, y la hepatitis-A, entre otras enfermedades (Graae *et al.*, 1998). Por lo que la concentración de coliformes es un buen indicador de la concentración de las bacterias presentes en aguas residuales.

Aunque existen diferentes tipos de patógenos al humano proveniente de las aguas residuales (Tabla I), los coliformes fecales se consideran como indicadores universales.

Tabla I. Concentración promedio de los indicadores de contaminación fecal en aguas residuales. INCO (International Co-operation with Developing Countries) 2001.

CF	EC	ENT	CP	SOM	F+	RYC	GIA	CRY
6.99	7.27	6.07	5.44	6.35	5.58	4.26	3.03	2.55

Los resultados están expresados como log<sub>10</sub> de UFC / 100 ml. CF: coliformes fecales, EC: *E.coli*, ENT: enterococos, CP: *Clostridium perfringens*, SOM: fagos somáticos, F+: fagos F+, RYC: fagos de *Bacteroides fragilis*, GIA: *Giardia spp*, CRY: *Cryptosporidium spp*.

Existen actualmente diversos procesos tecnológicos empleados para la remoción de los iones inorgánicos como el amonio, nitratos, fosfatos, ciertos metales pesados y microorganismos patógenos. Pero estos sistemas de depuración por lo general son costosos y en ocasiones generan otro tipo de contaminación limitando el posible re-uso o manejo confiable del agua. En esta situación, la bio-remediación juega un papel importante en mitigar las condiciones ambientales adversas mediante la remoción y transformación de los contaminantes a formas menos nocivas en tiempos cortos y con mínimo impacto ambiental.

Entre dichos sistemas alternativos están los tapetes microbianos, que en conjunto con tecnologías de membrana (TM-MBR) ofrecerán la posibilidad de la reducción de nutrientes y de coliformes fecales sin la necesidad de adición de productos químicos o componentes físicos, que pueden reaccionar con las impurezas del agua generándose subproductos indeseables que dañen el ecosistema donde el agua de tratamiento es vertida o bien imposibiliten su re-uso.

Los tapetes microbianos naturales son comunidades relativamente estables caracterizados por su auto organización en biopelículas estratificadas que les confiere una eficiencia energética máxima. Están organizados a manera de estructuras laminadas compactadas fuertemente por secreciones viscosas

(Marshall *et al.*, 1971, Costerton *et al.*, 1981). Presentan microorganismos autótrofos dominados por cianobacterias (algas verde-azul) y por poblaciones heterótrofas, estratificadas en diferentes capas. En ambientes naturales, los procariontes fototróficos representan la mayor diversidad de especies en los tapetes microbianos, su recurrencia y su distribución están determinados por diversos factores, siendo el principal la intensidad de luz.

Debido a su particularidad de sistema de baja energía y alta capacidad de remoción de nutrientes de ambientes acuáticos es que se espera que su aplicación conserve esta función de remoción de nutrientes disueltos mixtos de las aguas residuales. Por otro lado, una membrana se define de manera general como una barrera selectiva entre dos fases homogéneas, donde el intercambio de materia es controlado, lo cual permite la transferencia selectiva entre una fase y otra (Vera *et al.*, 2000).

En este trabajo ambos sistemas se desarrollaron para realizar la bioremediación y remoción de bacterias coliformes del efluente principal de descarga de aguas residuales a la Bahía de Todos Santos, Ensenada.

## II. ANTECEDENTES

Debido a la ineficiencia e incompatibilidad ambiental que representan las plantas de tratamiento para realizar la remoción de nutrientes en niveles avanzados, se han sugerido estrategias potenciales para utilizar sistemas biológicos en el tratamiento de las aguas residuales domésticas o industriales. Los tapetes microbianos han sido utilizados en la acuicultura, bioremediación de contaminantes, agricultura y producción de energía (Bender *et al.*, 2004). Lo anterior debido a su capacidad de filtrar, absorber y transformar los compuestos orgánicos en inorgánicos, así como nutrientes para el mismo (Zamora, 2004).

La bioremediación usando tapetes microbianos es un tratamiento natural, práctico y de costo efectivo y puede ser aplicado en ambientes frágiles y sensitivos como en los ambientes costeros marinos. Los tapetes son fisiológicamente diversos y pueden realizar metabolismos heterótrofos, quimiotrotófos y fotótrofos. Esta diversidad de procesos posibilitan la absorción simultánea, la oxidación y la reducción de nutrientes (Bender *et al.*, 2004; Paniagua-Michel y García, 2003).

La capacidad de las comunidades microbianas de convertir contaminantes orgánicos en productos no perjudiciales sería útil en una escala de tiempo, mejorando perspectivas (Paniagua-Michel *et al.*, 2003). Los tapetes naturales tienen la capacidad de adaptarse y alterar ambientes hostiles a través de la comunidad y de las actividades celulares, los cuales secuestran los componentes orgánicos y algunos metales del ambiente (Bender *et al.*, 2004).

El amplio alcance puede ser representado por la presencia de variedad de microorganismos que contrastan en funciones aeróbicas y anaeróbicas, de la macroestructura del tapete, la mediación química de la columna de agua, la liberación de biofloculantes para el tapete y las cianobacterias filamentosas con una superficie cargada negativamente (Bender *et al.*, 2004).

Se ha visto que los tapetes remueven el amonio presumiblemente debido a la actividad de las bacterias nitrificantes, así mismo la fotosíntesis de las cianobacterias proveen el oxígeno para el proceso (Bender *et al.*, 2004). La remoción de nutrientes presentados en la biorremediación con tapetes microbianos artificiales presentaron una eficiencia de 79.01% amonio, 77.83%, nitrito, 82.92% nitratos y 94.03% de fosfatos (Zamora, 2004). En la acuicultura se tiene que la eficiencia de bioremediación de  $DBO_5$  fue de 74% (Paniagua-Michel y García, 2003).

El principal objetivo que se persigue con la aplicación de los tapetes microbianos es la reducción de nutrientes presentes en el efluente de la planta de tratamiento municipal después del tratamiento secundario. A pesar de este tratamiento, el efluente puede contener cantidades elevadas de microorganismos patógenos como es el caso de los coliformes, incluyendo los fecales, sobre los cuales los tapetes microbianos pueden no incidir o hacerlo solo marginalmente. Debido a lo anterior se requerirá acoplar una componente que permita eliminar patógenos del efluente una vez que se ha sometido a tratamientos avanzados como es el caso de membranas poliméricas.

### **1. Propiedades de las membranas: a nivel de patógenos**

Un proceso complementario a la remoción de nutrientes por los tapetes microbianos se requiere como una medida de eliminar patógenos y que aseguren una calidad del agua para fines de re-uso o manejo confiable. La porosidad de los tapetes microbianos permite filtración elevada y limita su uso para cribar partículas o microorganismos inferiores a 2 micras. El tamaño de partícula influye en los procesos de separación, como la sedimentación, coagulación, floculación y filtración (Chávez *et al.*, 2002). Ante esta situación, una componente de membrana facilitaría producir agua de calidad para los fines indicados.

Los sistemas de membrana (MBR) utilizan filtros especializados de poros, imperceptibles al ojo humano, que retienen los sólidos y microorganismos que se encuentran en suspensión y disueltos en el agua. Las componentes de membranas son útiles en la remoción de parásitos intestinales y bacterias dañinas para el ser humano que se encuentran en las aguas residuales. El principal factor que ha favorecido la adopción de los sistemas ha sido su bajo costo de operación y construcción. Actualmente cumplir con la normatividad requiere el uso de tecnologías de alto costo, por lo que se hace necesario un sistema de membranas de bajo costo (Noyola *et al.*, 2005).

El primer reporte de (MBR) fue en 1969 cuando una membrana de ultrafiltración fue usada para la separación de lodos activados al final de efluente de un tratamiento biológico de agua residual y los lodos fueron reciclados en un tanque de aireación (Aileen, *et al.*, 2007).

Existen dos tipos de configuraciones, la primera es una configuración de recirculación con una membrana externa y la segunda es una configuración sumergida con un modulo de membrana inmerso en agua residual, siendo esta la configuración más usada ya que gasta menos energía y reduce el colmatamiento de la membrana. El acoplar una componente de membranas en aguas municipales residuales tiene un rendimiento alto y una buena calidad de agua ya que puede incidir en la remoción de la demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y sólidos suspendidos respectivamente. Otras de las ventajas que presentan estos reactores es que opera a altas concentraciones de biomasa que aumenta el volumen y disminuye la producción de lodos, disminuyendo costos (Aileen, *et al.*, 2007).

Los sistemas de membrana son utilizados cada vez más para el tratamiento de aguas residuales porque la separación de sólidos implica una producción de un efluente de alta calidad, capaz de manejar grandes fluctuaciones en la calidad del

efluente y así como la remoción de los coliformes fecales, indicadores tradicionales de contaminación microbiológica, tienen un tamaño entre 0.7 y 1.5  $\mu\text{m}$  (Chávez *et al.*, 2002).

Sin embargo cabe mencionar que el colmatamiento de la membrana afecta las condiciones de operación incluyendo el tiempo de retención hidráulica (THR), el tiempo de residencia de sólidos (TRS) y del flujo del permeado. Por lo que dicha situación ha sido estudiada buscando el método más efectivo y económico, a través de la modificación del modulo de la membrana y del diseño del reactor, del control del flujo de permeado y la adopción de una succión intermitente para la reducción del concentrado en la superficie de la membrana (Marrot *et al.*, 2004; Hoon *et al.*, 2007). Además las tecnologías de membrana ofrecen la posibilidad de una clarificación y desinfección simultánea sin la necesidad de adición de productos químicos, que pueden reaccionar con las impurezas del agua generándose subproductos indeseables que lleguen a producir otros contaminantes. De manera general las ventajas de integrar componentes de membrana en el tratamiento biológico de aguas residuales son:

- Mejora de la calidad de agua
- Reutilización de las aguas residuales
- Baja costos
- Pocos problemas operacionales
- Reducción y/o eliminación de patógenos

Por lo anterior, no es extraño que técnicas de separación por medio de membranas, sea una de las soluciones más prometedoras para el tratamiento terciario de las aguas residuales debido a su capacidad de retención de bacterias, virus y especies macromoleculares. Es importante recalcar que existen una gran variedad de procesos de separación por membranas y los cuales se clasifican en

microfiltración, ultrafiltración, diálisis, nanofiltración y osmosis inversa, cuyos parámetros de separación se muestran en la tabla II.

La mayoría de estos procesos se diferencian en función de la fuerza impulsora responsable y el tamaño de las especies retenidas por el filtro (Vera *et al.*,2000). Así mismo los costos de dichas membranas varían de acuerdo a sus características, entre mayor sea la capacidad de retención más caro resultara el costo de esta.

Tabla II.- Clasificación proceso de separación de membranas

Proceso de separación	Alimentación	Tamaño de las especies retenidas
Microfiltración	Líquida o gas	0,02-10 $\mu\text{m}$
Ultrafiltración	Líquida	100-1000 Å
Diálisis	Líquida	>0,02 $\mu\text{m}$
Nanofiltración	Líquida	10-100 Å
Ósmosis inversa	Líquida	1-10 Å

### III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente no existen bio-reactores híbridos que integren tapetes microbianos con sistemas acoplados de membrana.

Aunque los tapetes microbianos se han evaluado que funcionan a nivel de tratamiento avanzado, no se ha evaluado su capacidad para remover patógenos ni su funcionamiento con componentes acoplados de membranas. Entre los retos que deberán atenderse sobresalen: la eficiencia de bio-remediación de nutrientes y patógenos (coliformes) en tiempos cortos de retención hidráulica (TRH).

Este proceso de bajo costo energético, puede ser incorporado continuamente a la biomasa, con la consecuente producción y generación de oxígeno. Este proceso integral genera la remoción de sales (amonio, nitritos, nitratos, ortofosfatos), el aumento del pH de los efluentes (proceso fotosintético), lo cual favorece la precipitación de ortofosfatos, la disminución de la demanda biológica de oxígeno, la oxigenación del agua, favoreciendo la oxidación continua de materia orgánica, la acción bactericida reduce y elimina la sobrevivencia de organismos patógenos como las enterobacterias coliformes.

Estas bondades pueden lograrse mediante el desarrollo de un biorreactor empacado con tapetes microbianos (TM) y una componente de membrana polimérica (MBR) cuya integración puede bio-remediar la carga de nutrientes, pulimiento y eliminación de agentes patógenos (coliformes) en tiempos cortos de retención hidráulica. Esta aplicación permitirá desarrollar una biotecnología ambientalmente compatible y de bajo costo buscando mejorar la calidad de los efluentes de aguas residuales que descargan en ambientes estuarinos y marinos sensitivos como costas, playas, bahías y al mismo tiempo tratar de conciliar la bio-remediación del efluente y evaluar su posible reúso.

## IV. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un bio-reactor híbrido empacado con tapetes microbianos acoplado a una membrana polimérica para la bio-remediación y remoción de bacterias patógenas de un efluente de aguas residuales municipales.

### 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- A. Caracterizar y construir tapetes microbianos con capacidad de remoción de nutrientes de un efluente de aguas residuales municipales.
  
- B. Seleccionar y evaluar una membrana polimérica de bajo costo para la remoción de bacterias coliformes del efluente principal de aguas residuales de Ensenada, B.C.
  
- C. Diseñar y construir un Bio-reactor híbrido empacado con tapetes microbianos acoplado a membranas para bio-remediar los niveles de amonio, nitritos, nitratos, y coliformes.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 1. Muestreo de microorganismos

Se realizaron tres muestreos para la colecta de comunidades polimicrobianas y/o consorcios microbianos del sitio de descarga del efluente conjugado de las plantas de tratamiento El Gallo y El Naranjo. Dichas muestras fueron almacenadas en recipientes estériles, para ser trasladadas al laboratorio. Las muestras se procesaron de acuerdo a Zamora-Castro *et al.* (2008) con el fin de caracterizar, identificar y generar biomasa para la construcción ulterior de los tapetes microbianos.

Una vez en el laboratorio las muestras se tamizaron en tamices de 70 y 40  $\mu$  respectivamente, posteriormente se lavaron las muestras de la siguiente manera, el filtrado se centrifugo (Chermle Z360 K) a 12000 rpm, el sobrenadante fue desechado y el pellet fue re-suspendido en agua del efluente estéril, dicho procedimiento se realizo tres veces. Los filtrados obtenidos fueron inoculados en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo (agua del efluente estéril) para conservar las mismas especies presentes en la muestra. Para el manejo de las muestras estas se clasificaron en 4 tipos, M1, M2, M3 y M4.

### 2. Evaluación de medios de cultivo

Para fomentar el crecimiento de cada uno de los grupos taxonómicos se utilizaron 4 medios de cultivo, previamente modificados: F/2 (Guillard & Ryther, 1962), el cual fomenta el crecimiento de microalgas, medio para quimio-autotróficos que denominamos "QA-N" (Abeliovich, 1987) el cual es empleado para estimular el crecimiento de bacterias amonio y nitrito oxidantes principalmente y el propio efluente el cual contendrá los componentes que en los medios no se encuentran. La composición de los medios de cultivo se muestra en la tabla IV.

Tabla IV. Composición de medios de cultivo usados en la evaluación.

Nutrientes	Medios de cultivo usados (g/L)					
	ASN III	F2	TAP	FT	QA NUEVO	NF2
NaNO <sub>3</sub>	0.75	0.075		0.075		0.75
NaCl	25	-	-	-	-	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02	-	-	-	-	
NaHCO <sub>3</sub>	-	-	-	-	0.5	
NaSiO <sub>3</sub> * 9H <sub>2</sub> O	-	0.03	-	0.03	-	0.03
KCl	0.5	-	-	-	-	
NaNH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0.005	-	0.005	-	0.005
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.02	-	0.288	0.288	-	
MgCl	2	-	-	-	-	
MgSO <sub>4</sub>	3.5	-	4	4	0.1	
CaCl <sub>2</sub>	0.5	-	2	2	0.18	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	-	13.5	
NH <sub>4</sub> ó NaNO <sub>2</sub>	-	-	-	-	0.5	
Acido Citrico	0.003	-	-	-	-	
Citrato de amonio	0.003	-	-	-	-	
EDTA	0.0005	-	0.2	0.2	-	
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	15	15	-	5mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	14.4	14.4	-	
<b>Micronutrientes</b>						
CuSO <sub>4</sub>	0.079	0.1442	0.314	0.314	-	0.1442
ZnSO <sub>4</sub>	0.222	0.022	0.22	0.22	-	0.022
CoCl <sub>2</sub>	0.39	0.01	0.032	0.032	-	0.01
MnCl <sub>2</sub>	1.81	0.18	0.1012	0.1012	-	0.18
NaMo <sub>4</sub>	0.49	1.1325		1.1325	-	1.1325
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>24</sub>	-	-	0.011	0.011	-	-
NaEDTA	-	4.36	-	4.36	-	4.36
FeCl <sub>3</sub>	-	3.15	-	3.15	0.014	3.15
FeSO <sub>4</sub>	-	-	0.0998	0.0998	-	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	7	-	0.057	0.057	-	1

Estos medios se evaluaron en su capacidad para generar cultivos específicos que fomenten diferenciación a nivel de Taxón y/o el mejor crecimiento o que combinaciones nos traen los mejores resultados, como el medio F2-N, ASN III y el efluente estéril y sus respectivas concentraciones diferentes.

### 3. Construcción del Tapete Microbiano

#### a) Microalgal-cianobacterial

Para la construcción de los tapetes microbianos, los microorganismos crecidos en el efluente fueron concentrados por centrifugación por 15 min a 20°C. El sobrenadante se desechado y los concentrados celulares se re-suspendieron en 50 ml del efluente. Posteriormente se re-suspendieron e inocularon 2 ml en una matriz de poliéster de baja densidad con el fin de inmovilizar las células. Los soportes inoculados se mantuvieron en un fotoperiodo de 12 hrs luz y 12 de oscuridad. Posteriormente el inóculo inicial fue adaptado a las condiciones de cultivo dentro del invernadero, para lo cual fue necesario un soporte de poliéster de 30 cm de diámetro sobre el cual se colocó el inóculo inicial.

#### b) Nitrificantes

El cultivo y caracterización de bacterias nitrificantes se realizó de muestras de licor de lodos activados colectados de la planta de tratamiento del Gallo y cultivadas como se describe a continuación. Las muestras se adaptaron primeramente con efluente y mediante enriquecimientos con cloruro de amonio y nitrito de sodio respectivamente. Los cultivos fueron también adicionados con oxígeno y mantenidos en total oscuridad en un periodo superior a 2 semanas. Posteriormente los restos de lodos fueron separados, se continuó el programa de enriquecimiento de amonio y nitrito cuyo nivel de consumo fue evaluado mediante análisis de cromatografía iónica. Estos inóculos se transfirieron a unidades de cultivo conteniendo poliéster de baja densidad como soporte de inmovilización los cuales se mantuvieron como se describió anteriormente.

##### *i. Prueba de microorganismos nitrificantes*

La presencia de microorganismos nitrito y amonio oxidantes de los soportes en los reactores de cultivo se determinó de submuestras escindidas del soporte

colonizado de cada una de las poblaciones de nitrificantes. Las bacterias amonio-oxidantes se mantuvieron con 5ml de efluente estéril y cloruro de amonio a una concentración de 50 ppm y las nitrito oxidantes con 20 ppm  $\text{NaNO}_2$ , ambas se mantuvieron en obscuridad.

La cinética de agotamiento de cada sustrato se evaluó cada dos horas (mediante un cromatógrafo iónico marca Methrom). A su vez se determinó la disminución y/o consumo del amonio o nitrito respectivamente, lo cual corroboró la presencia de bacterias oxidantes de amonio y nitrito respectivamente. Lo anterior se realizó por triplicado.

## *ii. Establecimiento de bacterias oxidantes de amonio y nitrito*

Se colectó una muestra de licor de lodos activados de la planta de tratamiento El Gallo. La muestra se tamizó para disgregar y separar la máxima cantidad de lodos, y favorecer la separación de las bacterias nitrificantes. La muestra se dividió en partes iguales con el fin de proceder al enriquecimiento selectivo de bacterias oxidantes de amonio mediante el enriquecimiento con una concentración de cloruro de amonio (20 ppm) y nitrito de sodio (50 ppm) durante un periodo de dos semanas. Las muestras se mantuvieron en obscuridad total y con un nivel de oxígeno disuelto superior a 6 mg/l mediante la inyección de aire con un compresor. La progresión en las concentraciones en cada cultivo se determinó mediante un cromatógrafo iónico marca Methrom con el fin de determinar consumo y nitrificación.

Una vez corroborada la presencia de las bacterias oxidantes de amonio y de nitrito respectivamente, estas se mantuvieron rutinariamente en las condiciones que favorecieron su especificidad. Después de periodos de cultivo superiores a cuatro semanas, cada grupo bacteria desarrollado se inoculó en soportes colocados ex –

profeso, mismo que se destinaron para ser utilizados ulteriormente en la construcción de tapetes microbianos en combinación con la población microalgal.

### iii. Cinética de consumo de amonio y nitrito

Una vez estructuradas y caracterizadas las poblaciones en los tapetes nitrificantes, se procedió a evaluar su capacidad de consumo de amonio y nitrito mediante cinéticas cortas de nitrificación. Se colectaron 5 L del efluente de aguas residuales municipales (El Gallo, incluido El Naranjo). El agua se sometió a un tamizado de 100  $\mu\text{m}$  para eliminar sólidos y se alimento en biorreactores construido ex – profeso. El experimento no se adiciono con oxígeno.

### c) Construcción de Tapetes microbianos y empacado de reactores

Una vez concluida la cinética de nitrificación, los tapetes nitrificantes se inocularon con muestras de tapetes microalgales previamente construidos para promover el desarrollo y construcción del tapete microbiano con ambas poblaciones (nitrificantes  $4.5 \times 10^6$  y microalgales  $3.46 \times 10^6$ ).

El tapete estructurado (nitrificantes y microalgas) se empaco en reactores de plástico construidos con una capacidad nominal de 15 litros. Los reactores conteniendo los tapetes microbianos se cargaron con 5 litros de efluente filtrado a 100  $\mu\text{m}$ , y se expuso al sol para su desarrollo. Transcurridas dos semanas se evaluó la cinética de nitrificación, pH, oxígeno (2 veces por día), coliformes totales, Sólidos totales y volátiles, aniones y cationes cada dos horas.

#### **4. Microscopia**

##### **A) Microscopio óptico**

Se uso la técnica de montaje directo de cortes hechos en puntos representativos de las muestras seleccionadas del tapete, realizando la separación de los componentes del tapete por acción mecánica por medio de un imán(en el Apéndice observamos los cromatogramas de las curvas de calibración usados para el análisis de concentraciones) durante 2 horas, posteriormente la muestra obtenida fue montada en un portaobjetos y se observaron directamente en un microscopio óptico marca Olympus modelo B600 a diferentes aumentos utilizando aceite de inmersión según se indique, para su registro fotográfico.

##### **B) Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)**

Se realizaron cortes de los tapetes para el montaje directo de los microorganismos presentes. La fijación de las muestras se realizó con formaldehído al 4% (3 horas), posteriormente las muestras fueron sometidas a lavado con buffer PBS por un periodo de 10 min. La deshidratación de las muestras se realizo con etanol al 30, 40, 50, 70, 80, 90 y 100 % (v/v). Las muestras deshidratadas se mantuvieron en un desecador con dióxido de fósforo activada por un periodo de 12 horas; el metalizado de la muestra se realizo recubriéndola con filamentos de oro (Sigma). El registro micrográfico se realizo en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM5300.

#### **5. UNIDAD EXPERIMENTAL**

##### **a) Concepto y Diseño del Bio-reactor Hibrido (TM- MBR)**

El diseño del reactor: tapetes microbiano-membrana (TM-MBR) consto de dos etapas, la primera, un bio-reactor para albergar tapetes microbianos (estabilización

de nutrientes) y la segunda, una membrana para la eliminación de bacterias enteropatógenas como coliformes. Tres replicas por tratamiento se montaron para fines estadísticos. Además, se construyeron bio-reactores control (3 replicas) con la misma configuración pero sin empacar con tapetes y/o membrana según se explicara.

#### ETAPA 1: Componente de tapetes microbianos

Esta componente se conceptualizo para permitir la remoción y estabilización de nutrientes así como la nitrificación del agua residual mediante la biomasa microbiana desarrollada en los tapetes empacados. La cubeta del bio-reactor fue de plástico transparente buscando favorecer el paso de la luz requerida por los organismos fototróficos. Los bio-reactores se construyeron para un volumen funcional de agua a tratar de 5, 10 y 15 litros según se indique.

#### ETAPA 2: Componente de membrana

La integración de la componente de membrana fue concebida para la eliminación de agentes patógenos que no fueron eliminados por la componente de tapetes microbianos.

Se utilizo la membrana de microfiltración debido a su baja energía, costo, y por su capacidad de retención y/o eliminación de enteropatógenos como los coliformes. Una membrana de este tipo, de 0.1 a 10  $\mu\text{m}$  de poro es capaz de reducir eficientemente los sólidos disueltos totales (TDS) y las bacterias patógenas. Estas condiciones predispone el aporte de agua que en combinación con los tapetes microbianos puede potencialmente cumplir con los estándares y límites permisibles para el vertimiento de aguas en bienes nacionales (NOM-001-Ecol-1996) y así evitar un impacto ambiental, simultáneamente al reuso indirecto del agua residual tratada (NOM-003-Ecol-1997).

## b) Acoplamiento de componentes, el Bio-reactor Híbrido.

La componente de tapetes microbianos previamente construida se empaco el biorreactor seleccionado ex – profeso buscando privilegiar la superficie de contacto entre la componente de tapete microbiano y el agua por tratar. En esta componente se considero el numero celular (cianobacterias, bacterias y microalgas) determinado mediante conteos directos con la cámara de Neubauer, determinación de densidad óptica, y/o peso seco según se indique. El biorreactor se empaco con una superficie de tapetes el cual se determino de acuerdo al tiempo de retención hidráulica y a la cinética de retención de nutrientes.

La componente de membrana considero la superficie y el tipo de membrana (microfiltración), filtros de remoción de sólidos gruesos (>100 micras), componente de compensación, motobomba y reservorio de almacenamiento de agua permeada.

El acoplamiento entre ambos componentes se realizo alimentando el bioreactor con agua residual durante un determinado tiempo de retención hidráulica que permite la reducción del amonio y la nitrificación y pulimiento del agua residual. Esta agua tratada se alimentó al recipiente de compensación el cual a su vez se conecta con el modulo de membrana mediante mangueras de ¼ de pulgada, donde realiza la mitigación y/o eliminación de enterobacterias tipo coliformes y respectivo pulimiento complementario. El pasó y cosecha del agua por la membrana se realizo mediante una bomba de presión Aquatec ¼ HP misma que transfirió el agua tratada a nivel de microfiltración al reservorio final de reserva.

## 6. MONITOREO DE BIO-REMEDIACIÓN

El monitoreo de la bio-remediación se llevara a cabo en tres etapas, la primera será la evaluación de la parte biológica la cual está conformada por los tapetes

microbianos y donde se evaluarán la cantidad de nutrientes presentes, coliformes y los tiempos de retención hidráulica con mejor eficiencia de bioremediación. En la segunda etapa se evaluará la membrana de microfiltración en relación con el módulo de tapetes microbianos a un determinado tiempo de retención hidráulica del proceso y la cantidad de coliformes.

a) Análisis de Parámetros de Calidad de agua.

La composición iónica del agua residual colectada para los ensayos se analizará mediante cromatografía iónica en un cromatógrafo de Iones Marca Methrom, modelo 882 Plus equipado con columnas de separación de aniones y cationes e interruptor de interferencias a un nivel de precisión de partes por millón.

Cada reactor (3 experimentales y 3 controles) con tapetes microbianos se muestreará cada dos horas, al menos que se indique de otra manera, y previo a su análisis por cromatografía, el agua tratada se filtrará a través de filtros de membrana Whatman tipo jeringa de 0.45 micras de poro. Las muestras de agua también estuvieron sujetas a análisis de pH, oxígeno disuelto (dos veces al día), coliformes (al principio y final del experimento), ST, SSV. La determinación y cuantificación de aniones y cationes se realizó utilizando estándares analíticos marca Sigma. El oxígeno disuelto se evaluó mediante un potenciómetro, pH mediante electrodo Hanna de acuerdo a los métodos descritos en APHA (2001). Asimismo, se realizarán cinéticas largas (semanas/mes) para demostrar la eficiencia del biorreactor en el pulimiento del agua residual.

b) Tiempo de retención hidráulica

Es el tiempo que demorara los constituyentes del agua en recorrer la longitud del proceso desde el momento a la entrada al sistema y la cual se calcula de la siguiente manera en los biorreactores:

$$TRH = V/Q$$

Donde:

TRH.- Tiempo de retención hidráulica

V.- Volumen total del biorreactor

Q.- Flujo de trabajo de cada biorreactor

c) Monitoreo de bacterias patógenas y coliformes

La evaluación de indicadores patógenos se realizó mediante conteo de coliformes fecales en agua, con el uso de placas 3M Petrifilm, que constan de nutrientes de bilis rojo violeta (VRB), un agente gelificante en agua fría y un indicador (TTC = tri-fenilo de tetrazolio) que facilita la enumeración de las colonias. La lámina superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa de los coliformes. En dichas placas se agregó 1 mL de muestra que se incubó a una temperatura 35°C y posteriormente se realizó conteo, para *E. coli* en placas de 24 a 48 horas y para coliformes en 24 horas. El tinte rojo provee un contraste para el conteo de colonias, y la lámina superior atrapa el gas producido por los coliformes en forma de burbujas, además de un indicador de glucuronidasa que forma un precipitado azul alrededor de todas las colonias de *E. coli*. Las colonias de coliformes presentes se identifican de color rojo y se encuentran asociadas a burbujas de gas. La AOAC internacional y el Manual de Bacteriología analítica (BAM) de la US FDA definen coliformes como bacilos Gram negativos que producen ácido y gas de la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias de Coliformes en las Placas Petrifilm<sup>MR</sup> CC durante su crecimiento van generando ácido, por lo que el indicador de pH va oscureciendo el color del gel. El gas queda atrapado alrededor de la colonia confirmando la presencia de coliformes.

Dichas evaluaciones se hicieron antes de que las muestras de agua del efluente sean incorporadas al bio-reactor, al final de la etapa de tapetes microbianos (TM) y después del paso de la muestra por el bio-reactor de membrana (MBR), etapa avanzada de aguas residuales.

Este procedimiento se encuentra dentro de los métodos oficiales de análisis publicados por la AOAC, de los organismos internacionales.

#### c) Eficiencia de remoción

Se evaluará la capacidad de remoción de los bio-reactores en función del volumen de área del tapete en contacto con el agua residual. Para lo cual los reactores serán operados variando los tiempos de retención hidráulica, de acuerdo a la superficie de contacto. Con los valores obtenidos de cada uno de los nutrientes se calcularán las ppm removidas y el porcentaje de remoción.

$$\text{Remoción mg/l} = \text{control} - \text{tratamiento}$$

$$\% \text{ Remoción} = \frac{\text{control} - \text{tratamiento}}{\text{Control}} \times 100$$

Los resultados serán usados para considerar los tiempos de tratamiento con el fin de optimizar el proceso de biorremediación en las diferentes componentes del biorreactor.

#### d) Análisis estadístico

Se evaluaron los biorreactores con y sin el tapete microbiano y con o sin la membrana con ANOVA de una vía para evaluar la respuesta de los factores

(tapetes microbianos y membranas) y lo cual nos marcara la diferencia entre las causas de variación.

A continuación se presentan las formas de cómo se llevara a cabo el tratamiento para su evaluación (tabla III).

Tabla III. Método de evaluación estadístico

Tratamiento 1			Tratamiento 2	
Con Tapete microbiano			Sin Tapete microbiano	
TRH: 1, 2, 3			TRH: 1, 2, 3	
Coliformes	Nutrientes		Coliformes	Nutrientes

Tratamiento 1			Tratamiento 2	
Membrana microfiltración			Tapete microbiano	
Coliformes	Nutrientes		Coliformes	Nutrientes

## VI. RESULTADOS

### 1. Muestreo de microorganismos

Se realizaron muestreos de microorganismos del efluente y sedimento (Figura 1) de los cuales se obtuvieron especies de microalgas y cianobacterias que se fueron aislados por el tipo de medio de cultivo obteniendo los mejores resultados de crecimiento en el medio F2-N y en el efluente.

Asimismo se recolectaron lodos activados en los cuales se encuentran presentes las bacterias nitrificantes amonio oxidante y nitrito oxidante las cuales fueron requeridas para la reducción de componentes orgánicos presentes.

### 2. Colecta y aclimatación de microorganismos

Se colecto y aclimatizo a los microorganismos del grupo de las Eubacterias (cianobacterias y bacterias) y Eucarya (microalgas) que están a la salida del tratamiento secundario del efluente de las plantas de tratamientos (El Gallo y El Naranjo).



Figura 1. Muestreo en la descarga de las plantas de tratamiento el Gallo y el Naranjo

### - Evaluación de medios de cultivo

Cada uno de los medios antes mencionados, fueron probados para el desarrollo de microorganismos dando como mejor crecimiento el medio F2-N y el efluente estéril con pH de 7, en ambos medios se generaron diversas especies o consorcios de microorganismos 7. Lo anterior lo podemos observar en la figura 2 y 3 de este trabajo.

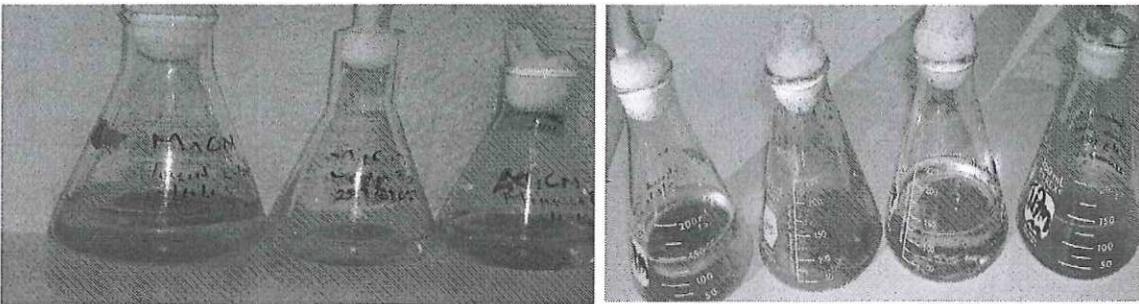


Figura 2. Imagen del crecimiento de microalgas en medio F2-N y Efluente de la muestra M1.

Sin embargo cabe señalar que en donde hubo un crecimiento significativo fue en el efluente sin esterilizar y los resultados se pudieron observar tanto en medios líquidos como en placas.

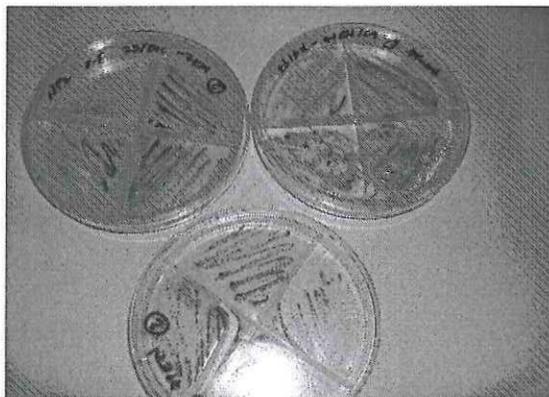


Figura 3. Placas con efluente como medio para la conservación de las especies

Tabla V.- Tabla de proporciones para le evaluación de los medios

Muestra	Medios		
	F2-N	ASN III	Efluente
M1	100%	100%	100%
M2	100%	100%	100%
M3	100%	100%	100%
M4	100%	100%	100%
Combinación 1			
M1	50%	25%	25%
M2	50%	25%	25%
M3	50%	25%	25%
M4	50%	25%	25%
Combinación 2			
M1	25%	50%	25%
M2	25%	50%	25%
M3	25%	50%	25%
M4	25%	50%	25%
Combinación 3			
M1	25%	25%	50%
M2	25%	25%	50%
M3	25%	25%	50%
M4	25%	25%	50%

Así mismo se han observado al microscopio óptico las diferentes muestras recolectadas y en las cuales han sido observados consorcios microbianos que se muestran en la figura 4.

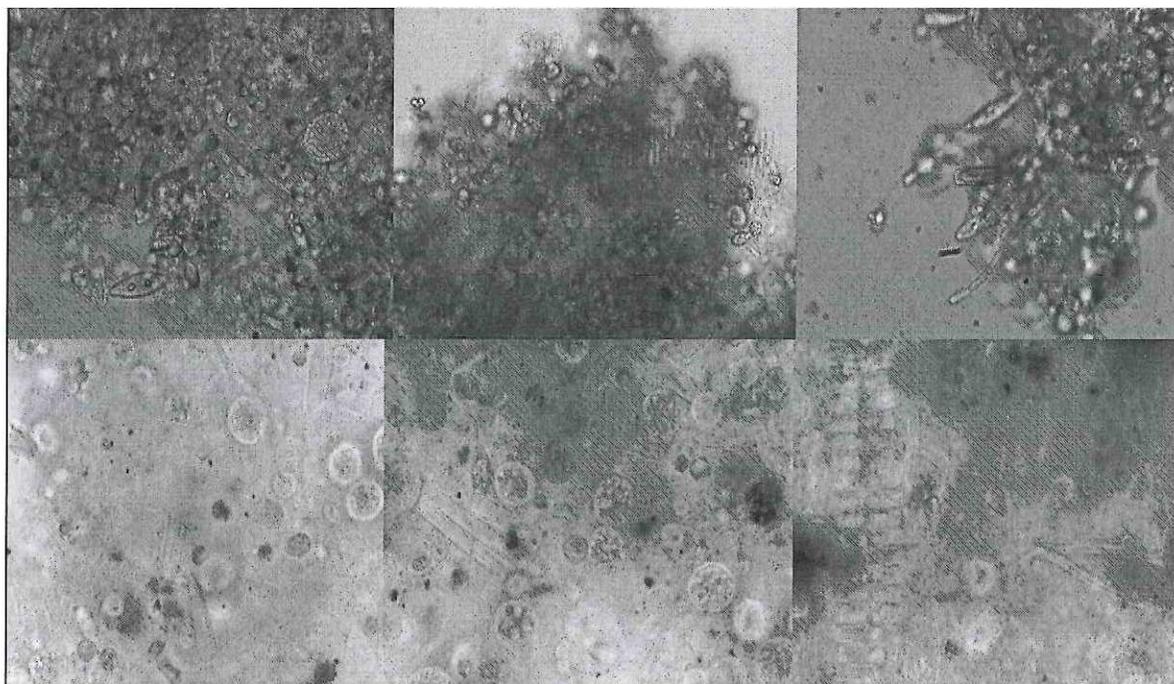


Figura 4. Especies crecidas en efluente antes de la creación de los tapetes microbianos y observadas a 40-100x.

### 3. Microorganismos presentes en tapete microbiano

El tapete se construyó con inoculos de mejor adaptación, así como bacterias nitrato oxidante y amonio oxidante. Las microalgas fueron observadas con microscopio óptico, con los objetivos de 40x y 100x (figura 5), así mismo las bacterias y microalgas presentes en los tapetes microbianos fueron observados en el microscopio electrónico de barrido (figura 6).

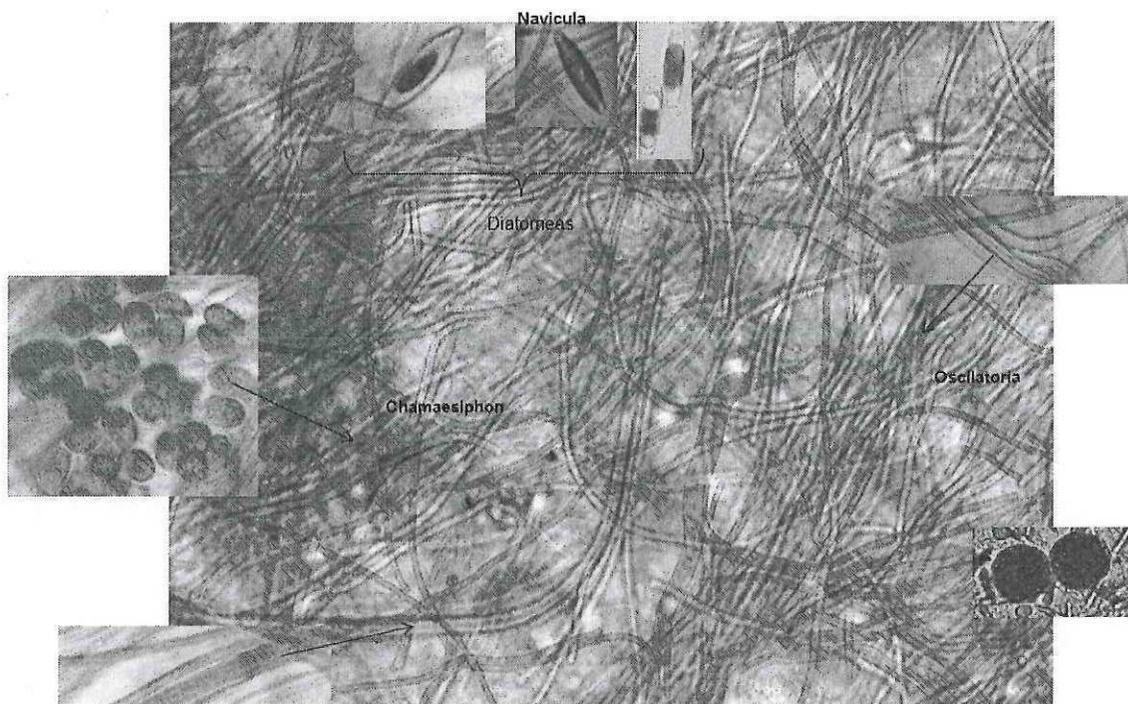


Figura 5. Especies encontradas dentro del tapete microbiano observadas al microscopio óptico (40 – 100 x).

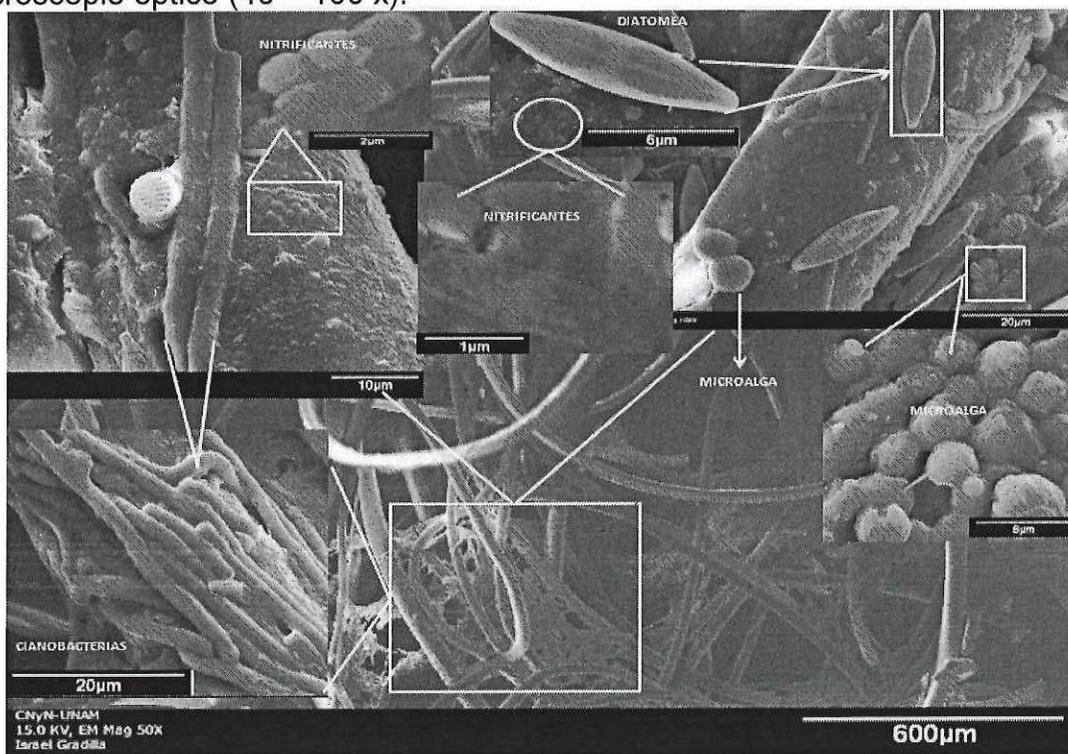


Figura 6. Micrografías (MEB) de las especies encontradas dentro del tapete microbiano conformado por microalgas y bacterias nitrificantes.

#### 4. Diseño y componentes de un reactor híbrido (TM- MBR)

##### ETAPA 1: Componente de tapetes microbianos

El bio-reactor (Fig. 7) se concibió con las siguientes características:

- Material: Plástico transparente
- Volumen funcional: 20 litros
- Volumen de trabajo: 5-10 litros
- Tiempos de retención hidráulica: determinado por la concentración estimada a remover por el tapete microbiano
- Superficie de empaque: poliéster de baja densidad. El bio-reactor se empaco con una superficie de tapetes de 30 cm de diámetro lo cual cubre la parte interna del reactor para la remoción de nutrientes.



Figura 7.- Primera etapa del biorreactor empacado con tapetes microbianos (TM).

## ETAPA 2: Componente de membrana

En esta etapa se evaluó la funcionalidad de membranas de microfiltración que se colocaran en un modulo independiente al de tapetes microbianos como se muestra en la Figura 8.

Tipo de Membranas: Micro filtración (0.1 a 10 $\mu$ m)

Disposición: Externa

Volumen de trabajo: 5 y 10 litros

Capacidad de la bomba: 1/4 de caballo

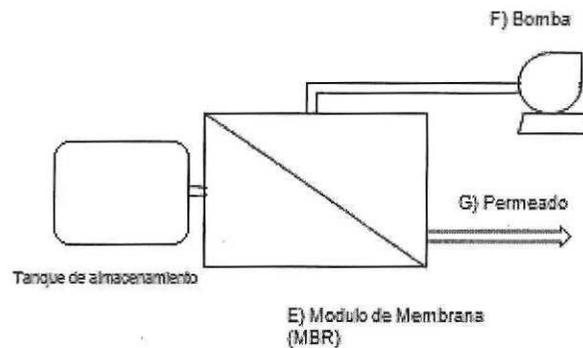


Figura 8. Segunda etapa modulo de membrana (MBR).

### A) Integración de componentes: Bio-reactor Híbrido

Las consideraciones de trabajo del bio-reactor híbrido (TM-MBR) son las siguientes:

- Flujo
- Tiempo de retención Hidráulica
- Densidad de siembra
- Capacidad de trabajo del tapete microbiano

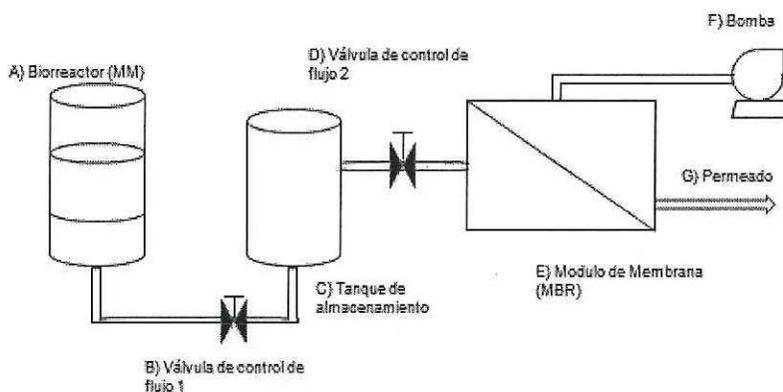


Figura 9. Bio-reactor híbrido (TM-MBR), cuyos componentes son los siguientes A) Bio-reactor empaquetado con tapetes microbianos, B) Válvula de control para el flujo de tratamiento, C) Tanque de compensación de agua tratada, D) Válvula de control de paso de agua, E) Reactor de membrana, F) Bomba y G) Permeado.

## 5. PRUEBAS DE BIORREMEDIACIÓN

### A) Efecto de la Componente microalgal en la cinética de remoción y nitrificación en función del volumen.

Las concentraciones iniciales del efluente con el cual se trabajó son presentadas en la tabla VI, así mismo se presentan algunos de los cromatogramas obtenidos durante la experimentación así como los valores y tiempos de cada una de las columnas para la determinación cualitativa y cuantitativa de los principales constituyentes iónicos, cationes y aniones en base a el método de cromatografía iónica, el cual se utilizó para la obtención de todas las concentraciones presentadas en esta investigación.

Tabla VI. Concentraciones obtenidas para efluente usado durante la experimentación (9/julio/2009).

<b>CATIONES</b>	<b>Na(PPM)</b>	<b>NH4(PPM)</b>	<b>K(PPM)</b>	<b>Ca(PPM)</b>	<b>Mg(PPM)</b>
T0	425.20	8.03	17.84	109.43	170.45
<b>ANIONES</b>	<b>Cl(PPM)</b>	<b>NO2(PPM)</b>	<b>NO3(PPM)</b>	<b>PO4(PPM)</b>	<b>SO4(PPM)</b>
T0	903.54	7.08	11.89	N/P	267.31

La evaluación del efecto de la componente microalgal en la cinética de remoción de amonio y nitrificación del agua residual así como para su correlación con la remoción de coliformes del efluente se realizo a dos volúmenes de agua residual, 5 y 10L.

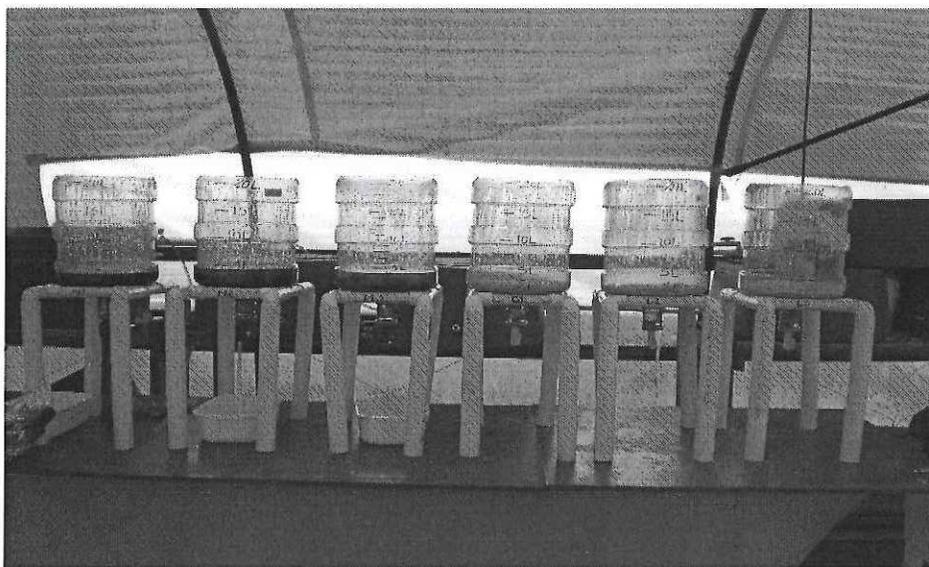
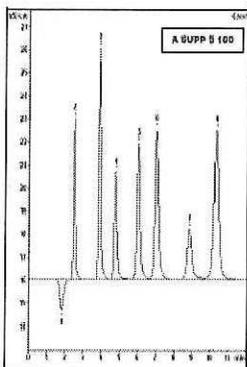


Figura 10. Fotografía de los reactores con tapetes microalgales contruidos (izquierda) y sus respectivos controles (derecha). Las concentraciones iniciales del efluente con el cual se trabajo son presentadas en la tabla VI, la concentración de los aniones y cationes presentes en las muestras fue realizada en base al método de cromatografía iónica.



Column: Metrosep A SUPP 5 100 (6.1006.510)  
 Eluent: 9.2 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.0 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>  
 Flow: 0.7 mL/min

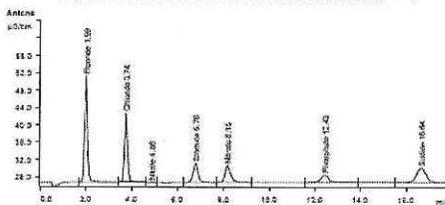
Peak	Retention time	Component	Concentration
1	1.5 min	Water peak	
2	2.5 min	Fluoride	2 mg/L
3	3.9 min	Chloride	5 mg/L
4	4.8 min	Nitrite	5 mg/L
5	8.0 min	Bromide	10 mg/L
6	7.0 min	Nitrate	10 mg/L
7	8.8 min	Phosphate	10 mg/L
8	10.3 min	Sulfide	10 mg/L

Mag Net

2008-02-19 11:38:49

**Sample data**  
 Ident: .....  
 Sample type: .....  
 Determination start: .....  
 Method: .....  
 Operator: .....

**Anions**  
 Data source: .....  
 Channel: .....  
 Recording time: .....  
 Integration: .....  
 Column type: .....  
 Eluent composition: .....  
 Flow: .....  
 Pressure: .....  
 Temperature: .....



Peak number	Retention time min	Area μS/cm x min	Height μS/cm	Concentration ppm	Component name
1	1.553	3.2515	24.451	Invalid	Fluoride
2	3.737	2.2815	16.353	Invalid	Chloride
3	4.888	0.2234	0.219	Invalid	Nitrite
4	5.762	1.2253	4.337	Invalid	Bromide
5	8.155	1.2539	3.825	Invalid	Nitrate
6	12.427	0.2797	1.585	Invalid	Phosphate
7	16.645	1.8742	3.263	Invalid	Sulfide

Page 1 of 5

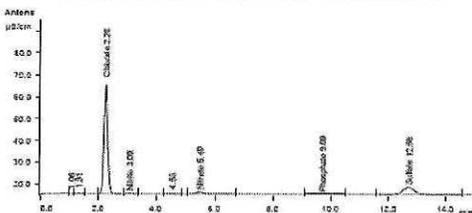
Metrohm

Mag Net

2008-11-25 02:13:08

**Sample data**  
 Ident: .....  
 Sample type: .....  
 Determination start: .....  
 Method: .....  
 Operator: .....

**Anions**  
 Data source: .....  
 Channel: .....  
 Recording time: .....  
 Integration: .....  
 Column type: .....  
 Eluent composition: .....  
 Flow: .....  
 Pressure: .....  
 Temperature: .....



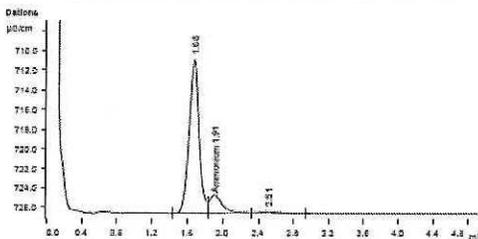
Peak number	Retention time min	Area μS/cm x min	Height μS/cm	Concentration ppm	Component name
1	1.563	0.2514	0.314	Invalid	
2	1.310	0.2243	0.130	Invalid	
3	2.243	7.3193	48.408	2744.431	Chloride
4	3.887	0.2188	0.228	18.232	Nitrite
5	4.528	0.2034	0.205	Invalid	
6	1.488	0.2336	0.218	141.107	Nitrate
7	9.935	0.2272	0.215	11.529	Phosphate
8	12.682	1.4271	3.269	714.102	Sulfide

Mag Net

2008-11-18 01:34:04

**Sample data**  
 Ident: .....  
 Sample type: .....  
 Determination start: .....  
 Method: .....  
 Operator: .....

**Cations**  
 Data source: .....  
 Channel: .....  
 Recording time: .....  
 Integration: .....  
 Column type: .....  
 Eluent composition: .....  
 Flow: .....  
 Pressure: .....  
 Temperature: .....



Peak number	Retention time min	Area μS/cm x min	Height μS/cm	Concentration ppm	Component name
1	1.576	3.2616	15.552	Invalid	
2	1.310	0.2061	1.864	65.512	Ammonium
3	0.512	0.0234	0.142	Invalid	

Figura 11. Cromatografía iónica aplicada a las muestras analizadas

Los resultados de los reactores con tapete microalgal (superficie del soporte de 30 cm de diámetro) inoculado a una densidad inicial de  $3.46 \times 10^6$  células/ml por cada  $\text{cm}^2$  se observan en la Figura 10. Un aumento significativo en la concentración de oxígeno en los reactores con tapete microalgal se observó en comparación a los reactores controles. La temperatura registrada durante la experimentación fue de  $22.6^\circ\text{C}$ .

La concentración de  $\text{NH}_4$  en los reactores con tapetes microalgales exhiben una reducción progresiva a diferencia de los valores observados en los reactores controles. Se puede observar un incremento en comparación del control sin embargo para el último tiempo se tiene una reducción del 37.67 ppm de este elemento en los reactores experimentales y para el caso contrario de los controles podemos observar que la concentración de  $\text{NH}_4$  disminuyó a 93.20 ppm, estos resultados pueden ser observados en la figura 12.

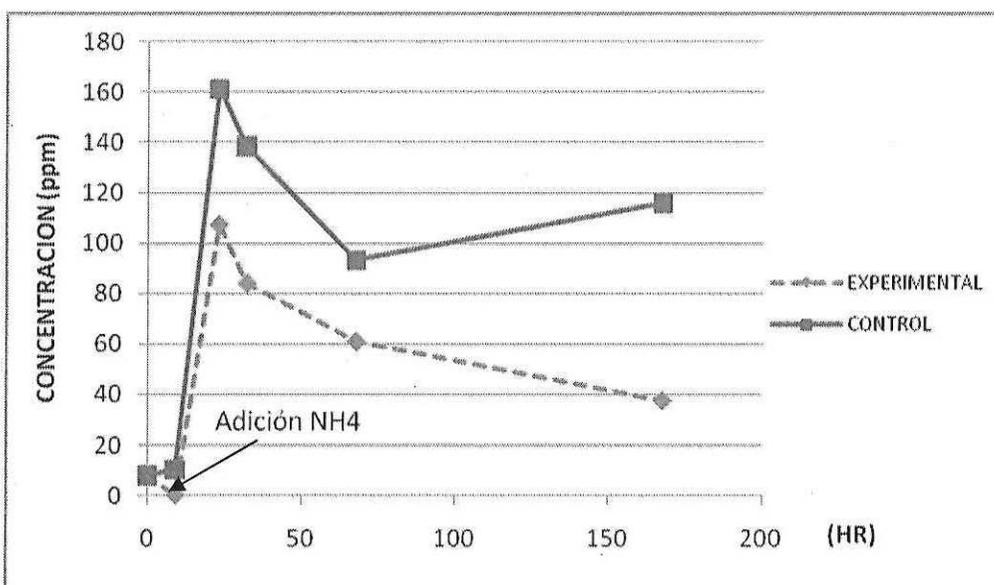


Figura 12. Concentraciones obtenidas para el Reactor experimental TM de degradación de  $\text{NH}_4$ , con tapete microalgal en un volumen de 5L y el control.

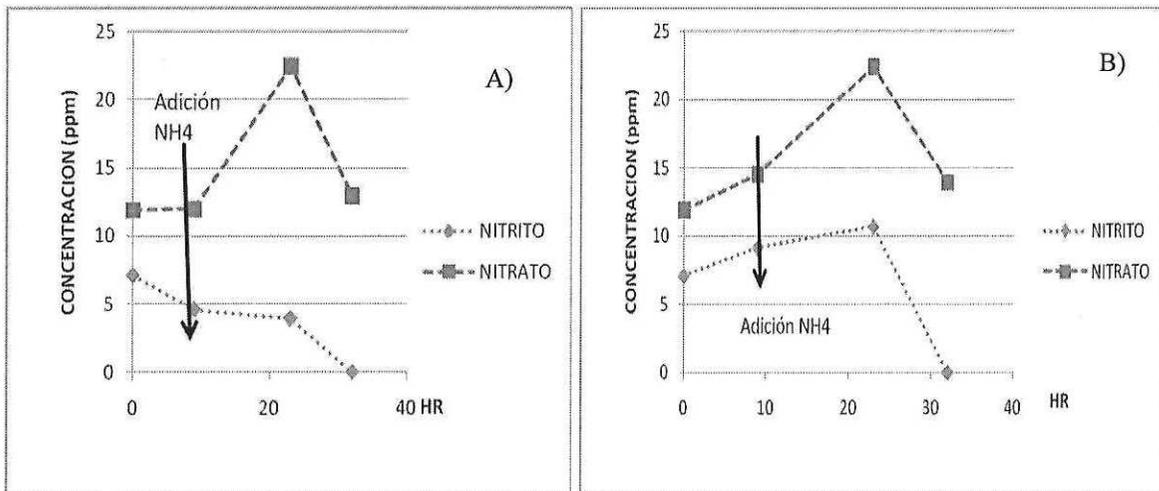


Figura 13. Concentraciones obtenidas para A) el Reactor TM experimental de NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub>, con tapete microalgal en un volumen de 5L y B) el biorreactor TM control.

Por parte del NO<sub>2</sub> podemos observar que en el reactor TM experimental disminuye sucesivamente hasta agotar el 100% de la concentración inicial (7.08 ppm), en el caso contrario el biorreactor TM control presenta un aumento desde el inicio y a las 32 horas disminuye al 100%. En el caso del NO<sub>3</sub> se observa un incremento correspondiente al nitrito consumido en concentraciones superiores en los biorreactores con tapete microalgal en comparación con los controles (Figura 13).

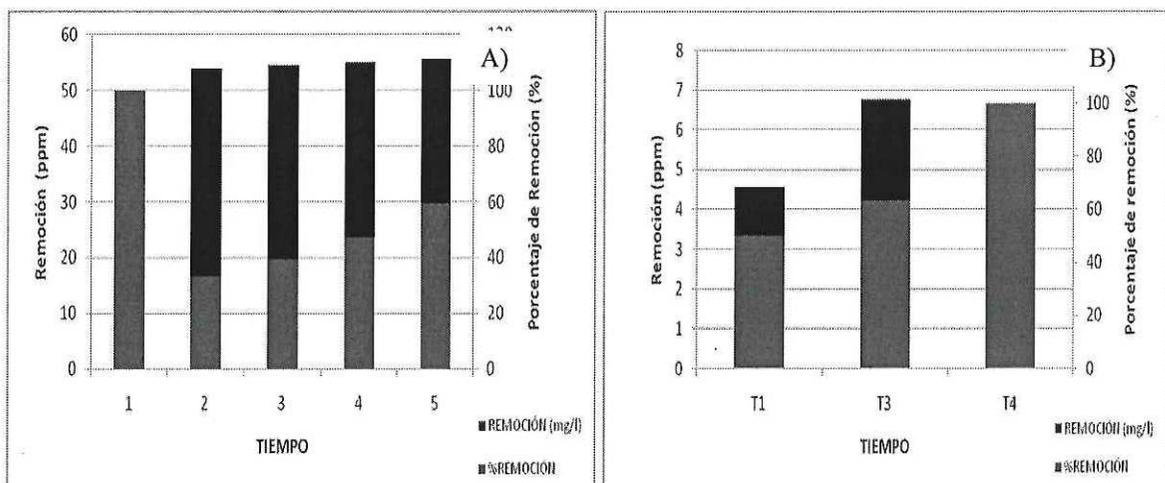


Figura 14. Porcentajes de remoción del biorreactor TM para A) NH<sub>4</sub> y B) NO<sub>2</sub>.

La reducción de  $\text{NH}_4$  del agua residual tratada (figura 14-A) fue del 100%, la adición de amonio representada en el tiempo 2 corrobora que el porcentaje de remoción así como la remoción se incrementan conforme transcurre los tiempos de retención hidráulica (Figura 14-B).

En el caso de los coliformes (figura 15-A) se observó una disminución significativa ya que al inicio el agua residual contuvo una concentración de 4800 NMP/100 mL mientras que los reactores experimentales terminaron con una concentración de 2400 NMP/100 mL y en los reactores TM control 3440 NMP/100 mL. Se puede decir que se eliminó un 50% de los coliformes iniciales. En el caso de la eficiencia de remoción (figura 15-B) el porcentaje de remoción obtenido para los reactores TM experimentales fueron del 50% y para el caso de los reactores TM controles se tiene que fue 28.22%.

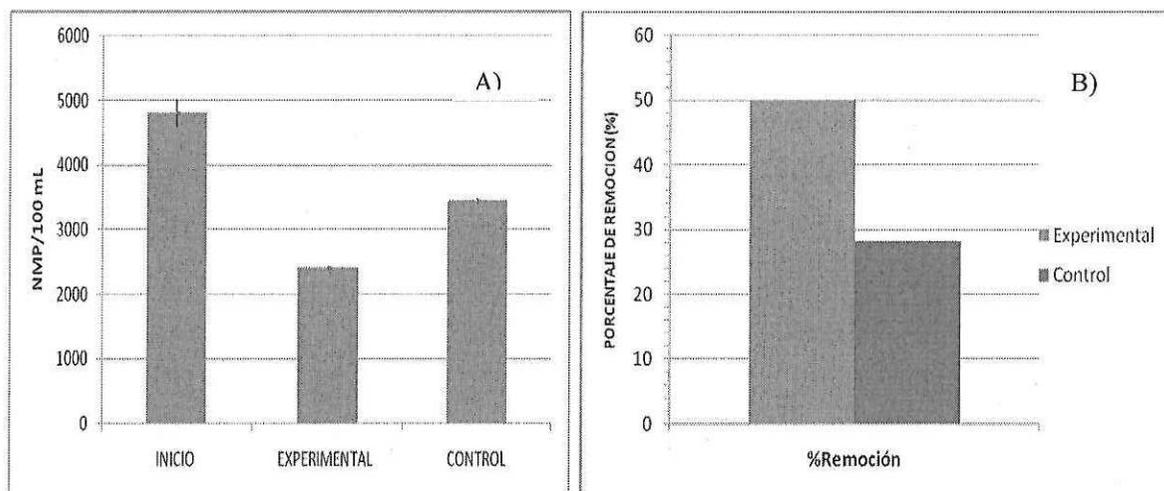


Figura 15. A) Coliformes presentes antes y al final de la experimentación, con el tapete microalgal y un volumen de 5L además del B) porcentaje de remoción.

#### a) Experimento con tapetes poblados de microalgas y un volumen de trabajo de 10L

En la tabla VII se muestran los aniones y cationes para el agua residual muestreada para la experimentación. Se obtuvo una reducción significativa (100%)

en los reactores TM experimentales a diferencia de lo registrado en los reactores TM control, no existió una disminución importante (fig 15-B) de la concentración inicial (Figura 15-A).

Tabla VII. Concentraciones obtenidas para efluente usado durante la experimentación (17/ agosto/ 2009).

CATIONES	Na(PPM)	NH4(PPM)	K(PPM)	Ca(PPM)	Mg(PPM)
T0	1405.3	121.582	536.43	0	0
ANIONES	Cl(PPM)	NO2(PPM)	NO3(PPM)	PO4(PPM)	SO4(PPM)
T0	114.19	1.13	0.73	23.28	0

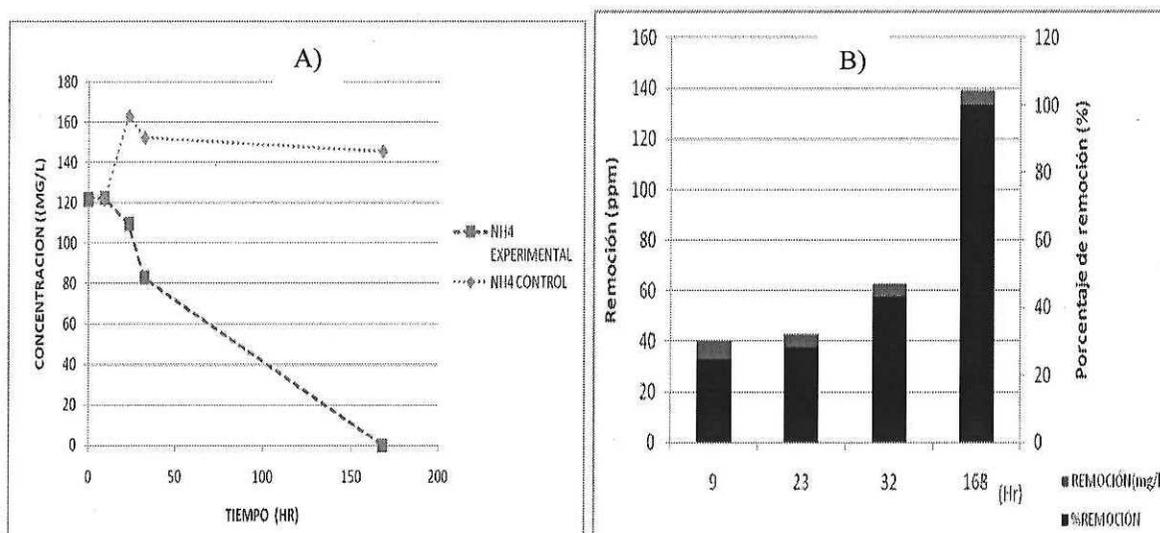


Figura 16. A) Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de reducción de NH<sub>4</sub> con tapete microalgal en un volumen de 10L y B) Porcentajes de remoción de NH<sub>4</sub>.

Para el caso de el NO<sub>2</sub> y el NO<sub>3</sub>, los reactores mostraron que conforme el nitrito reduce su concentración a niveles superiores al 50%, mantiene valores constantes de 5 mg/l durante 20 horas, reflejando consumo inconcluso por la comunidad microalgal lo cual inhibio la formación de nitrato; en los controles no se genero nitrito ni nitrato (Figura 17).

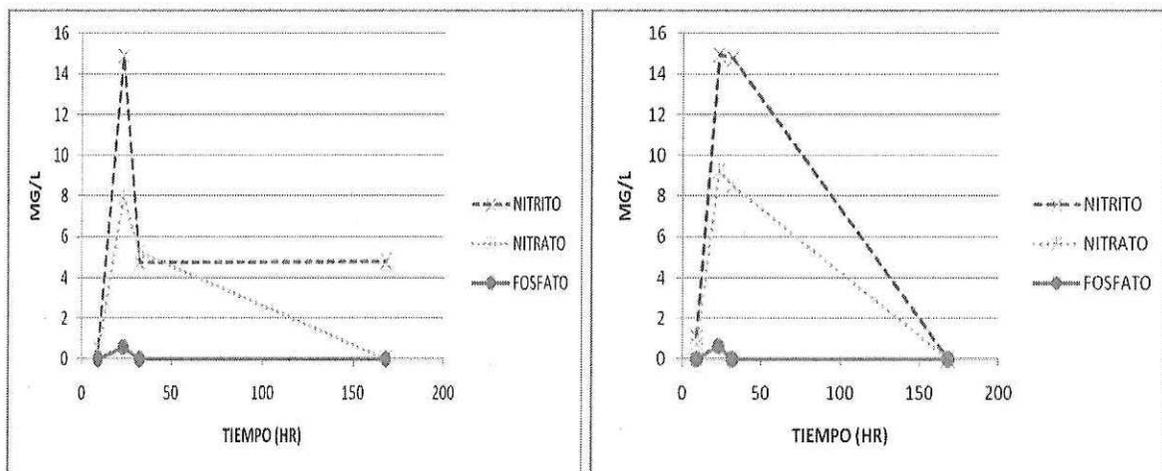


Figura 17. Concentraciones de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ , obtenidas para el Reactor TM de con tapete microalgal en un volumen de 10L.

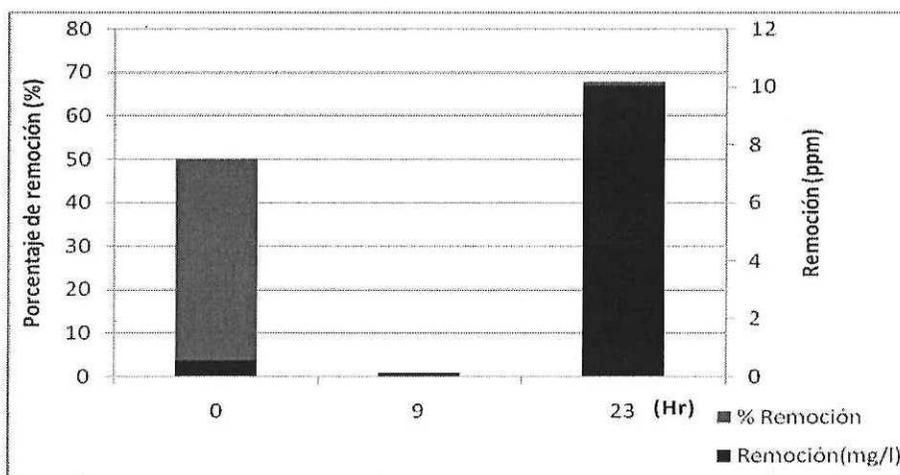


Figura 18. Eficiencia de remoción del reactor TM en la reducción de  $\text{NO}_2$ , con un volumen de trabajo de 10L.

Para el caso de los coliformes (figura 19-A) se obtuvo un conteo de 1630 NMP/100 mL al inicio del experimento, al final se pudo observar una reducción altamente eficiente por parte de los reactores experimentales ya que se removió tres cuartas partes de los coliformes iniciales quedando 440 NMP/100 mL, los controles removieron la mitad del valor inicial. En la figura 19-B se observa el porcentaje de remoción de los reactores TM experimentales fue de 73% en comparación de 45% por parte de los reactores TM control. En cuestión de sólidos (figura 20-A y B)

se observo un aumento en los sólidos volátiles totales en el reactor TM control en contraparte con los experimentales. Los sólidos volátiles aumentaron en los reactores TM experimentales y es menor en los reactores TM controles.

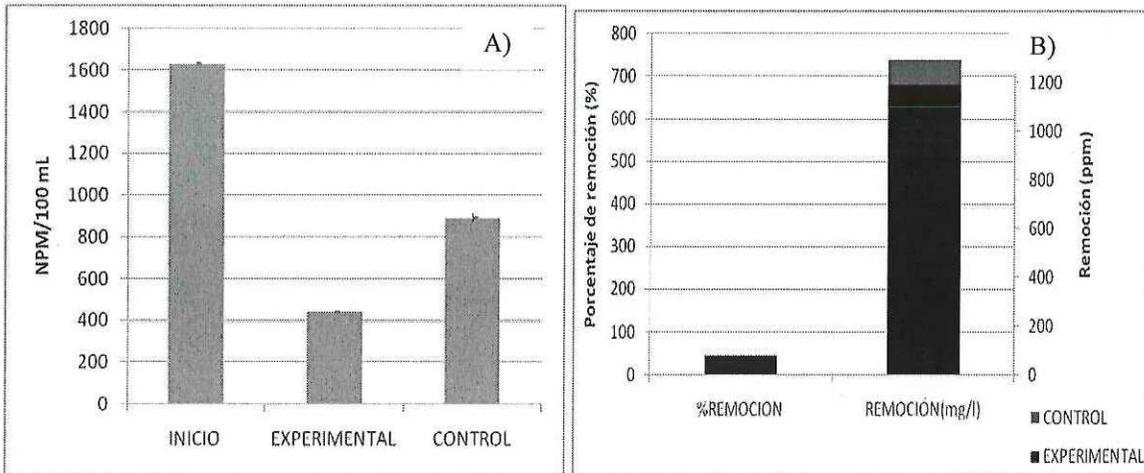


Figura 19. A) Coliformes presentes al inicio y al final de la experimentación, con el tapete microalgal y un volumen de 10L; B) porcentaje de remoción.

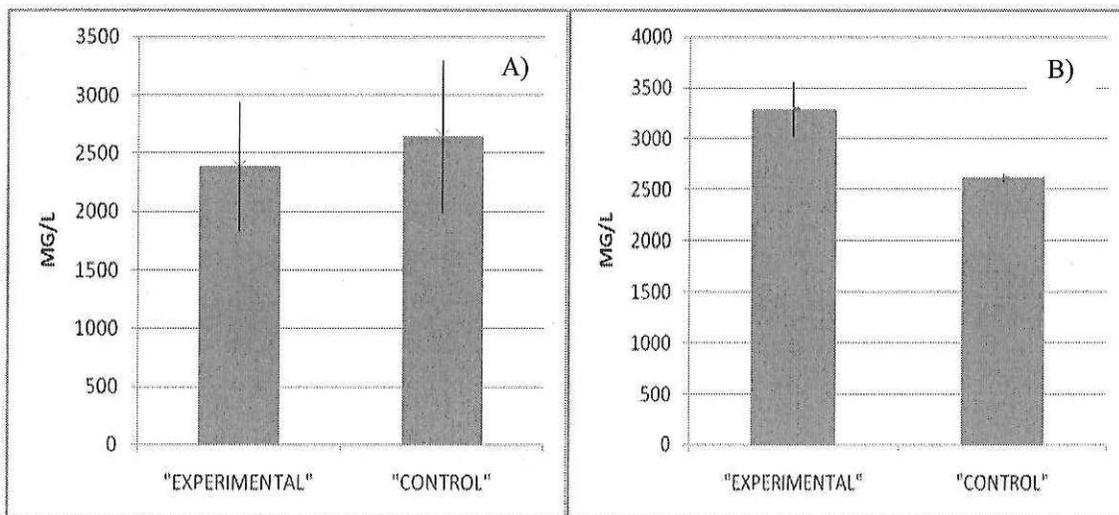


Figura 20. Grafica de la concentración de A) los sólidos volátiles y B) los sólidos totales determinados para la experimentación con reactores TM experimental y reactores TM control con una capacidad de trabajo de 10L.

## B) Caracterización de bacterias nitrificantes aerobias. Pruebas de utilización de sustrato

La evaluación de la cinética de remoción de amonio así como la respectiva formación y remoción de nitrato se utilizó para evaluar la presencia de nitrificantes bacterianos y para fines de construcción de tapetes microbianos. Esta prueba de utilización de sustrato también sirve para corroborar la presencia de bacterias nitrificantes aisladas originalmente del licor de lodos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales municipales de Ensenada BC (El Gallo). Esta prueba fue complementada mediante microscopía electrónica de barrido de los cultivos bacterianos en cada uno de los sustratos, amonio y nitrito (Figura 21).

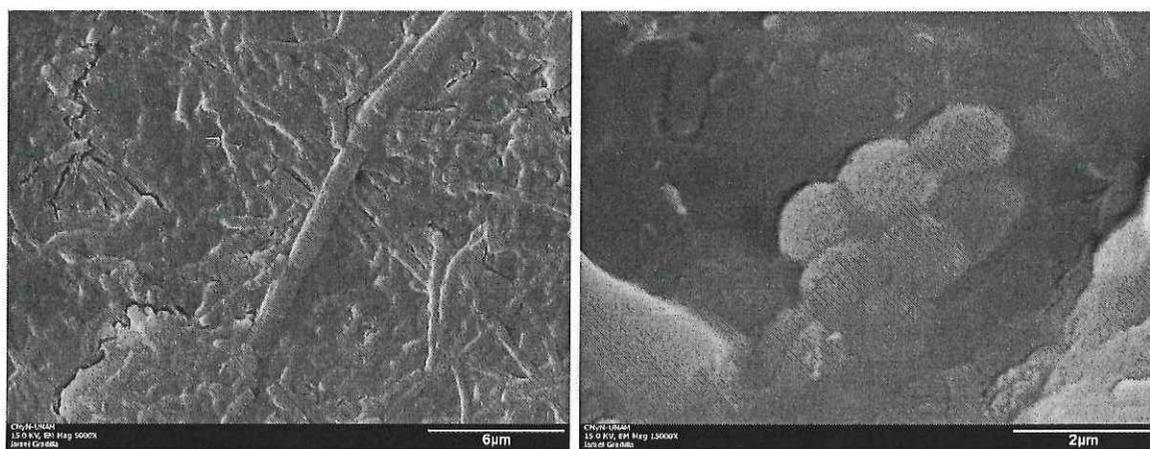


Figura 21. Imágenes mediante microscopía electrónica de barrido de bacterias oxidantes de amonio (A) y de nitrito respectivamente (B).

Las micrografías realizadas de cultivos realizados de licor de lodos activados muestran las formas típicas de las bacterias nitrificantes, oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito respectivamente, predominando las formas cocoides > de 1 micra embebidas por formaciones de exo- polisacáridos.

Los resultados de las pruebas de utilización de sustrato realizadas de los tapetes de bacterias nitrificantes así como pruebas de formación y consumo respectivo de

$\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$  y de  $\text{NO}_3$  realizadas en agua residual del efluente municipal se observa en la Figura 22.

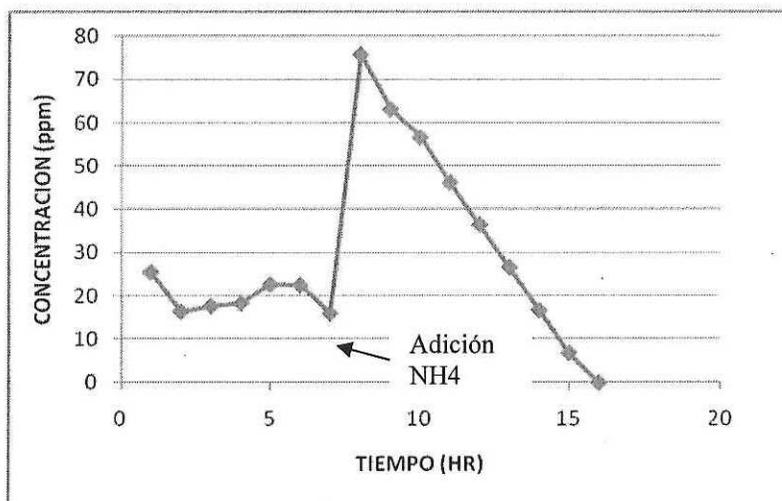


Figura 22. A) Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de consumo de  $\text{NH}_4$  en tapete de bacterias oxidantes de amonio en un volumen de 5L de agua residual, y posteriormente a la adición del sustrato amonio.

La Figura 23 muestra la cinética de utilización de nitrito en el agua residual que registro una disminución hasta 3.07 ppm, evidencia de la presencia de bacterias oxidantes del  $\text{NO}_2$ , lo cual se corrobora tanto del consumo de nitrito así como de la subsecuente formación de nitrato como se observa de la figura 23-A y B. El enriquecimiento del medio mediante la adición de nitrito (flecha), exhibe un incremento hasta una concentración 19.54 ppm esta concentración vuelve a disminuir a 0ppm. Para el caso de nitrato se mantiene en aumento constante hasta presentar un incremento considerable al final de la experimentación.

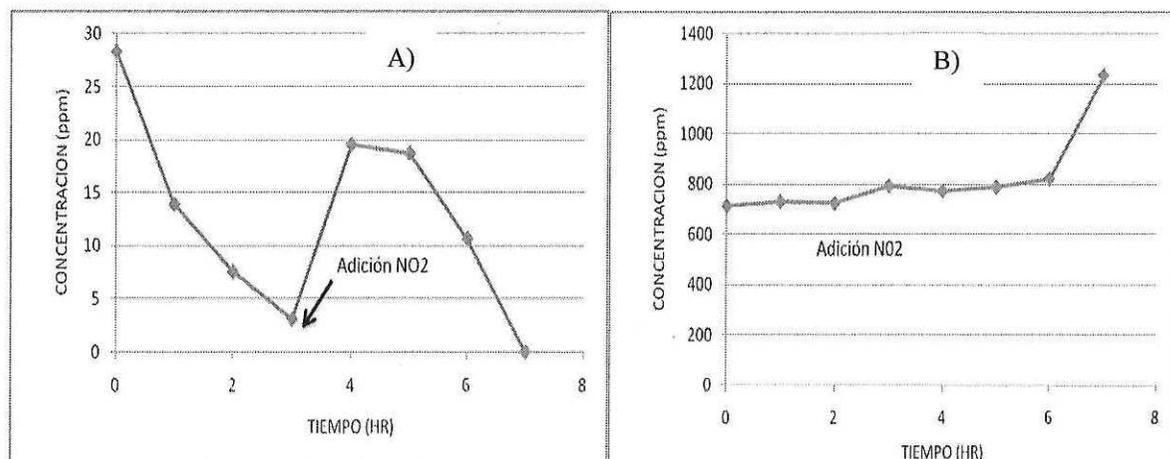


Figura 23. Comportamiento del A) NO<sub>2</sub> y B) NO<sub>3</sub> en los tapetes nitrificantes contruidos con bacterias oxidantes de nitrito e y enriquecidos con NaNO<sub>2</sub> después de su agotamiento en el efluente original, volumen de trabajo 5 L.

### C) Pruebas de bioremediación con tapetes microbianos contruidos con microalgas y bacterias nitrificantes.

La evaluación del efecto de la combinación de la componente microalgal con la de bacterias nitrificantes se realizo en tapetes microbianos contruidos *ex – profeso* así como su capacidad para bio-remediar los compuestos nitrogenados provenientes del efluente de aguas residuales municipales.

Debido a la variabilidad existente en la composición del agua residual, se procedió a realizar varios ensayos previos, lo cual permitió determinar tres intervalos de concentración de amonio en el agua residual, lo cual se utilizo para definirlos como agua residual con las siguientes concentraciones

- a) baja (10.45 ppm)
- b) intermedia (48.44 ppm)
- c) alta (155.22 ppm)

El muestreo para estos fines registro un valor representativo del intervalo elevado por lo que se procedió a utilizar el agua de este efluente cuya concentración fue de

155.22 ppm (tabla VIII). La figura 24 muestra una disminución importante de amonio a las 20 horas de reacción con el tapete microbiano construido; el agotamiento completo de la concentración de amonio se registró después de 48 hr de estadía del agua dentro del reactor, esta remoción es sensiblemente superior a la observada en los reactores control.

Tabla VIII. Concentraciones obtenidas para el efluente de trabajo (21/10/09).

<b>CACIONES</b>	<b>Na(PPM)</b>	<b>NH4(PPM)</b>	<b>K(PPM)</b>	<b>Ca(PPM)</b>	<b>Mg(PPM)</b>
T0	-	155.22	-	-	-
<b>ANIONES</b>	<b>Cl(PPM)</b>	<b>NO2(PPM)</b>	<b>NO3(PPM)</b>	<b>PO4(PPM)</b>	<b>SO4(PPM)</b>
T0	2978.14	25.22	104.78	10.616	662.26

Por parte del nitrito (Fig. 25-A) en los reactores TM experimentales, este empieza con una concentración de 25.22 ppm y disminuye constantemente hasta 17.008 ppm. En los controles, este compuesto registró inhibición y disminuye a 3.2 ppm. El nitrato no presenta concentración alguna en los reactores TM control, en caso contrario con los reactores TM experimental que solo lo detectan en el tiempo cero y en los tiempos siguientes ya no es detectado lo anterior lo podemos observar en la figura 25-B.

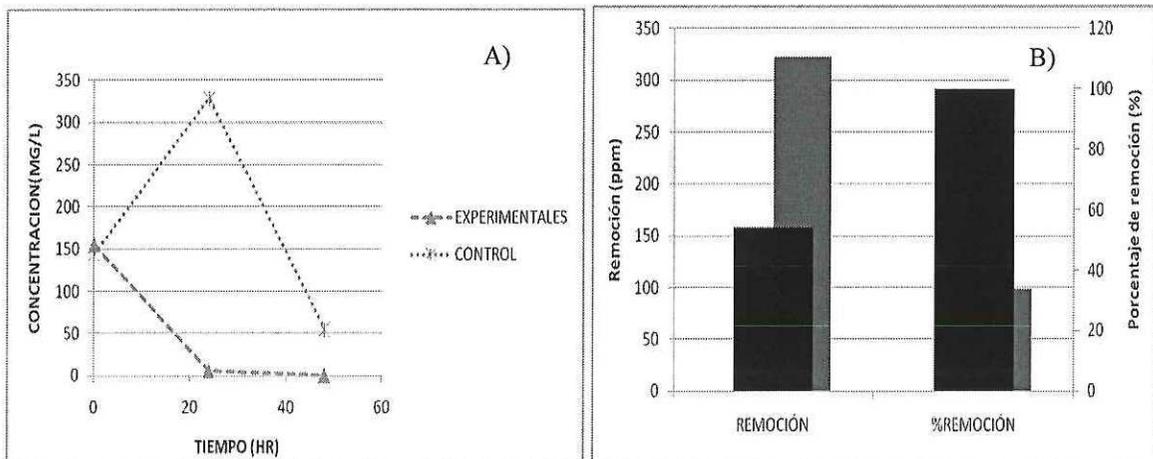


Figura 24. A) Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de degradación de  $\text{NH}_4$  con tapete microbiano en concentración alta de  $\text{NH}_4$  (155 ppm) y su porcentaje de remoción (B).

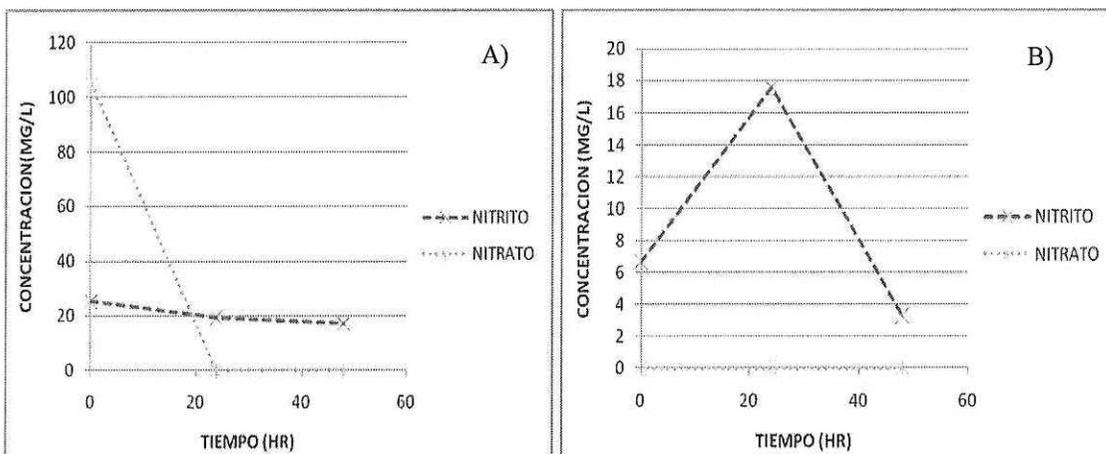


Figura 25. Concentraciones de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$  obtenidas para el Reactor TM A) experimental y B) control expuesto a concentración alta de  $\text{NH}_4$  (155 ppm).

Para el caso del pH este va en declive de 8 a 6 en los reactores TM experimentales, en el caso de los reactores TM controles este va decayendo pero no tan radical como los reactores TM experimentales. Los coliformes totales (Figura 26-A) inician con 2210 NMP/100 mL, al final de la experimentación se determinó un valor de 260 NMP/100 mL en los reactores TM experimentales y 500 NMP/100 mL en los reactores TM controles. Los coliformes disminuyen en 88.23% para el caso de los reactores TM experimentales y el 77.37% por los reactores TM controles, evidenciando la capacidad del tapete de reducir los

coliformes (Figura 26-B). Así mismo los sólidos volátiles presentan una disminución del 34.84% en los reactores TM experimentales y de 35.17% por parte de los reactores TM controles, mientras que los sólidos totales registran

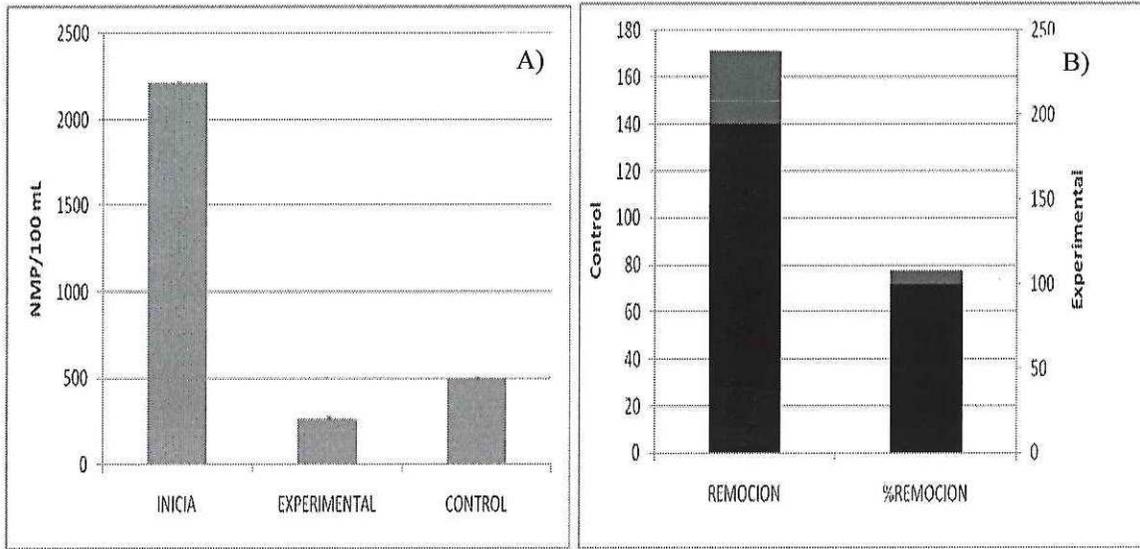


Figura 26. A) Coliformes totales presentes y removidos determinados con el tapete microbiano, en concentración alta de  $\text{NH}_4$  (155 ppm), además de los porcentajes de remoción (B).

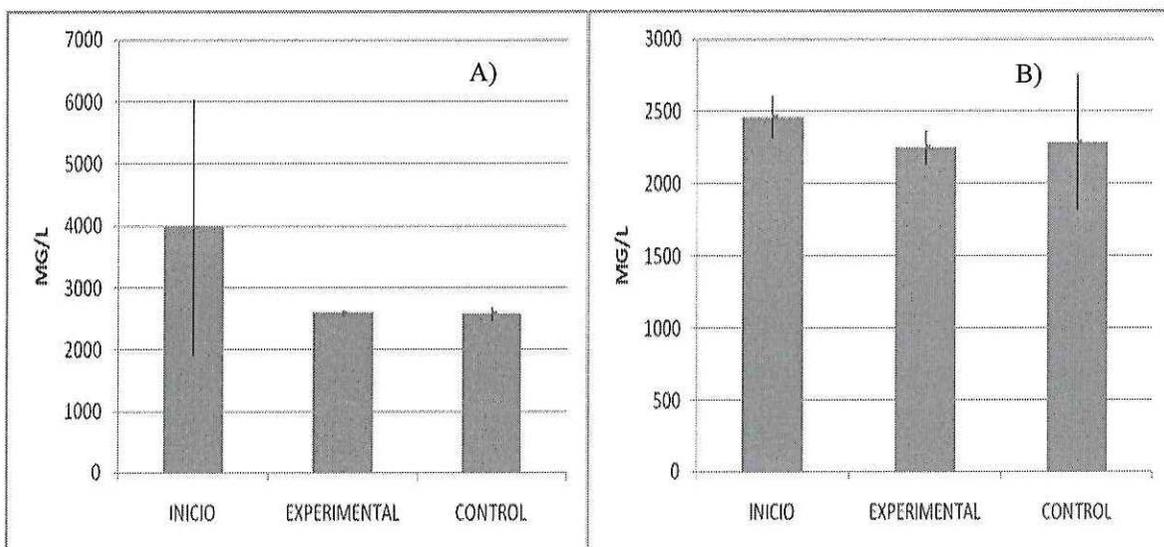


Figura 27. Grafica de A) sólidos volátiles y B) sólidos totales en los reactores con tapete microbiano y control a concentración alta de  $\text{NH}_4$  (155 ppm).

8.41% de parte de los experimentales y 7.07% en los controles, no se observó una disminución significativa, lo anterior se representa en la figura 27-A y B.

Posteriormente se realizó la evaluación del tapete microbiano en una cinética mediana, el efluente usado para esta parte de la experimentación contuvo 48.44 ppm (Tabla IX) de  $\text{NH}_4$  antes de comenzar la experimentación. Una vez colocado el efluente en los reactores, la remoción de amonio presentó una gran variación (fig. 28-A). En las primeras 10 horas este aumenta a 366 ppm posterior, a las 19 horas este disminuye a 204 ppm y se registra el mayor cambio a las 25 horas (101 ppm). La reducción completa del amonio se determinó a 48 horas (100%, (figura 28-B). En el caso del  $\text{NO}_2$  (fig. 29-A) se obtuvo un leve incremento (3.5 ppm experimental y 3.1 ppm control) a las 5 horas, posteriormente este disminuye a 0 ppm, y después de 48 horas vuelve a incrementar a 5.76 ppm en el tapete experimental y por parte del control, 0.021 ppm. En el caso del nitrato este no presenta concentración alguna al inicio del experimento, sin embargo después de 5 horas empieza haber presencia de este elemento y va en aumento hasta las 48 horas, por parte de los controles hay presencia del  $\text{NO}_3$  desde el inicio pero este se inhibe a 0 ppm, (fig. 29-B) en los reactores TM experimental y control.

Tabla IX. Concentraciones obtenidas por el cromatógrafo de intercambio iónico para el efluente de trabajo (29/10/09).

<b>CATIONES</b>	<b>Na(PPM)</b>	<b>NH4(PPM)</b>	<b>K(PPM)</b>	<b>Ca(PPM)</b>	<b>Mg(PPM)</b>
T0	-	48.44	-	-	-
<b>ANIONES</b>	<b>Cl(PPM)</b>	<b>NO2(PPM)</b>	<b>NO3(PPM)</b>	<b>PO4(PPM)</b>	<b>SO4(PPM)</b>
T0	5705.61	3.56	36.77	13.193	840.075

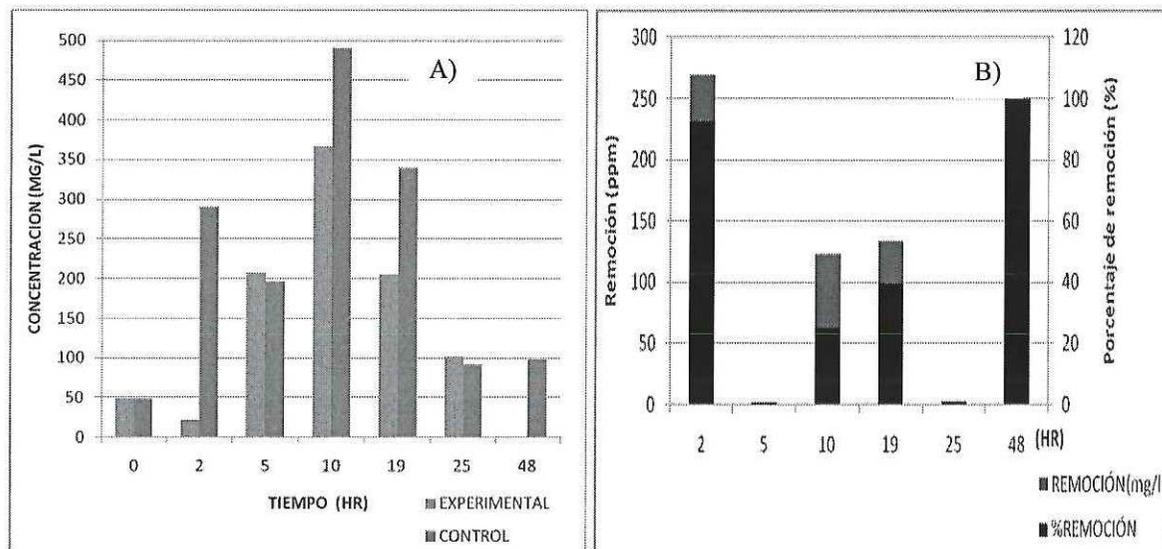


Figura 28. A) Concentraciones obtenidas de NH<sub>4</sub> en los biorreactores TM experimental y control, con tapete microbiano completamente estructurado en concentración media de NH<sub>4</sub> (48.44 ppm); B) porcentajes de remoción (B).

En el caso del pH no se observa variación tanto en los reactores TM experimentales ni en los los controles, se mantiene entre 7.15 y 8.47 durante toda la experimentación. En el caso del oxígeno disuelto (O.D.) se observó una gran variación entre los reactores experimentales y controles. Los tapetes microbianos emitieron una gran concentración de oxígeno disuelto, al inicio del experimento fue de 6.05 mg/l y al concluir fue 12.89 mg/l. En los reactores

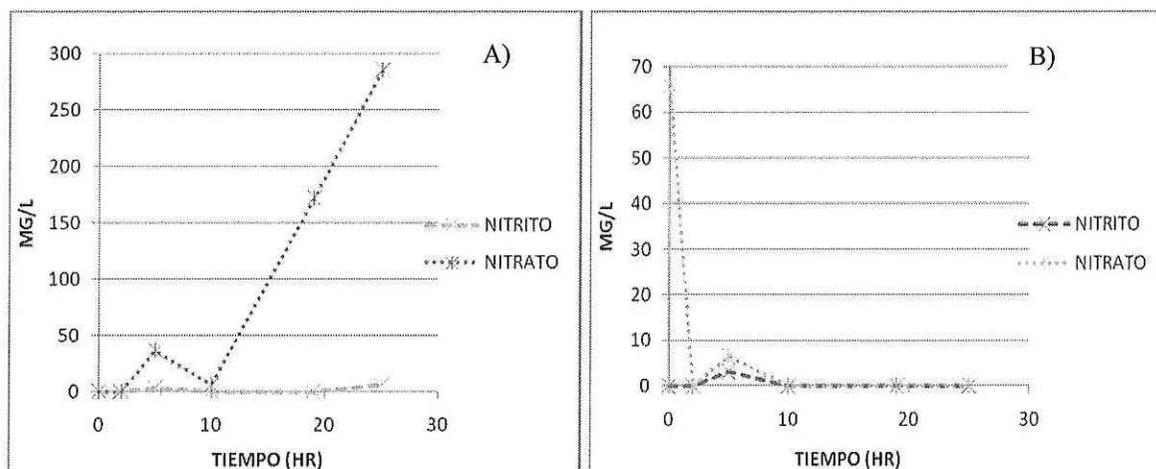


Figura 29. Concentraciones obtenidas para A) el Reactor TM experimental y B) control de NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub> con tapete microbiano estructurado y una concentración media de NH<sub>4</sub> (48.44 ppm).

TM controles a la baja hasta 5.83 mg/l. Los coliformes totales (Fig. 30-A) determinados en el efluente con concentración media de amonio registraron en los reactores experimentales (3680 NMP/100 mL) presentando una reducción del 51.35% y por parte de los reactores controles 39.67% (Fig. 30-B) por lo que se muestra que por parte de los tapetes microbianos está habiendo una mayor reducción de estos.

En la parte de sólidos volátiles se observó un aumento moderado del 3% de estos en los reactores con tapete microbiano y los controles a comparación del agua de inicio. Los sólidos totales no muestran gran cambio de estos entre el agua inicial y experimental, lo cual no sucede con los controles y eso lo podemos observar en la grafica 31.

En la última parte experimental que se realizo es conveniente hacer las siguientes observaciones, se observo una diferencia de concentración de células en los tapetes que contenían los reactores experimentales, inferida de la turbidez del agua debido al desprendimiento de células ( $M3 > M2 > M1$ ).

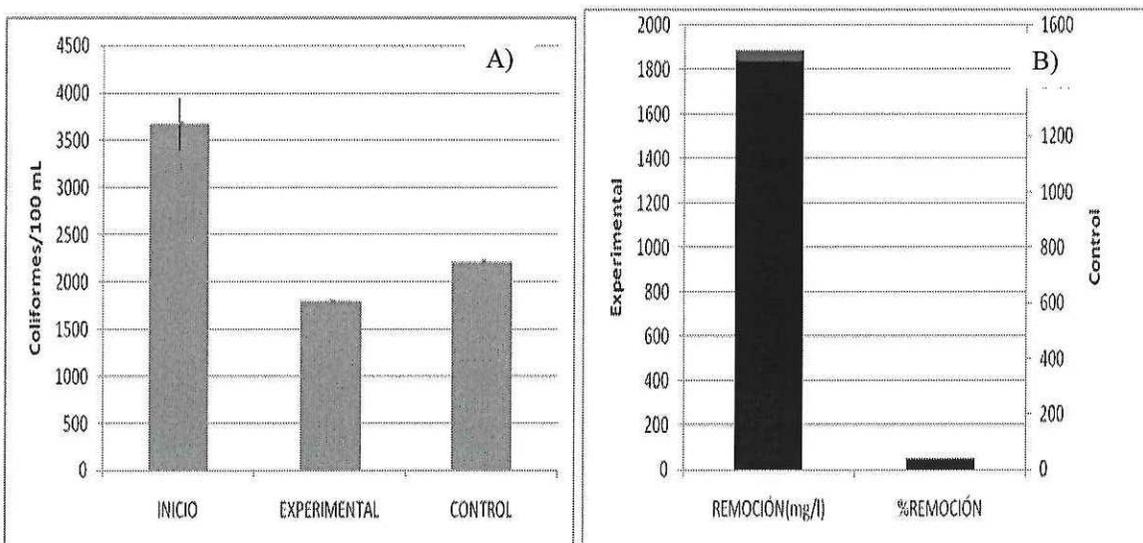


Figura 30. A) Coliformes presentes antes y al final de la experimentación, con el tapete microbiano totalmente estructurado y una concentración media de  $\text{NH}_4$  (48.44 ppm); B), porcentajes de remoción.

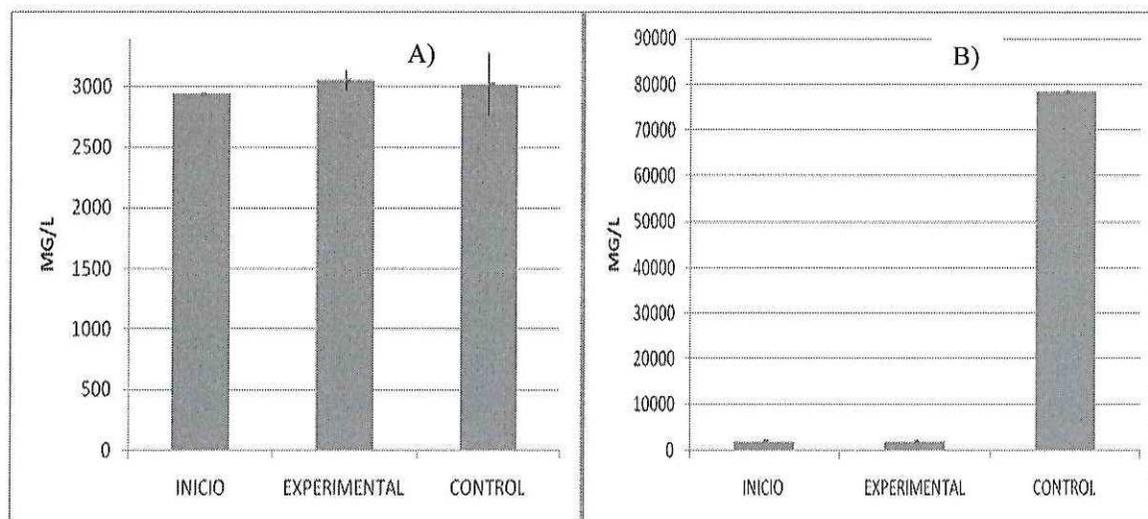


Figura 31. A) sólidos volátiles y B) los sólidos totales determinados en los tapetes construidos a una concentración intermedia de amonio..

Una optimización de los resultados obtenidos en esta parte se determino como producto de la elevada activación del tapete microbiano, cuya exposición previa a los sustratos del agua residual genero la disminución del 100 % (Fig. 32-B) del amonio en tan solo 5 horas (concentración inicial de 65.79 ppm) y lo cual podemos observar en la figura 32-A. El nitrito formado fue de 29.59 ppm en los reactores TM experimentales, el cual disminuye a 2.3 ppm y finalmente este vuelve a aumentar, evidenciando la acción de la nitrificación, en comparación con el control que disminuye de 26.28 ppm a 2.6 ppm. En el caso del nitrato este se acumula a concentración alta y disminuye lentamente en la parte experimental y de forma radical en el control todo esto se puede observar en la figura 33.

Tabla X. Concentraciones obtenidas por el cromatógrafo de intercambio iónico para el efluente original de trabajo (18/11/09).

<b>CACIONES</b>	<b>Na(PPM)</b>	<b>NH4(PPM)</b>	<b>K(PPM)</b>	<b>Ca(PPM)</b>	<b>Mg(PPM)</b>
T0	-	65.79	-	-	-
<b>ANIONES</b>	<b>Cl(PPM)</b>	<b>NO2(PPM)</b>	<b>NO3(PPM)</b>	<b>PO4(PPM)</b>	<b>SO4(PPM)</b>
T0	4307.43	29.593	253.36	11.08	1779.18

El ensayo a concentración baja de amonio se realizo mediante la adición de 10.45 ppm de cloruro de amonio en los reactores con tapete microbiano que agotaron previamente su concentración de este elemento. El control mantuvo la cantidad de amonio del agua residual, 68.27 ppm. El muestreo a las 2 horas registro una disminución del 100 % (Fig. 34-B), el control solo disminuyo 4 ppm (Fig. 34-A). El nitrito presento una concentración oscilante y disminuyo repentinamente reflejando nitrificación y consumo microbiano (Fig. 35-A). El nitrato formado en este lapso disminuyo a 21.27 ppm de manera similar a lo determinado en los reactores control.

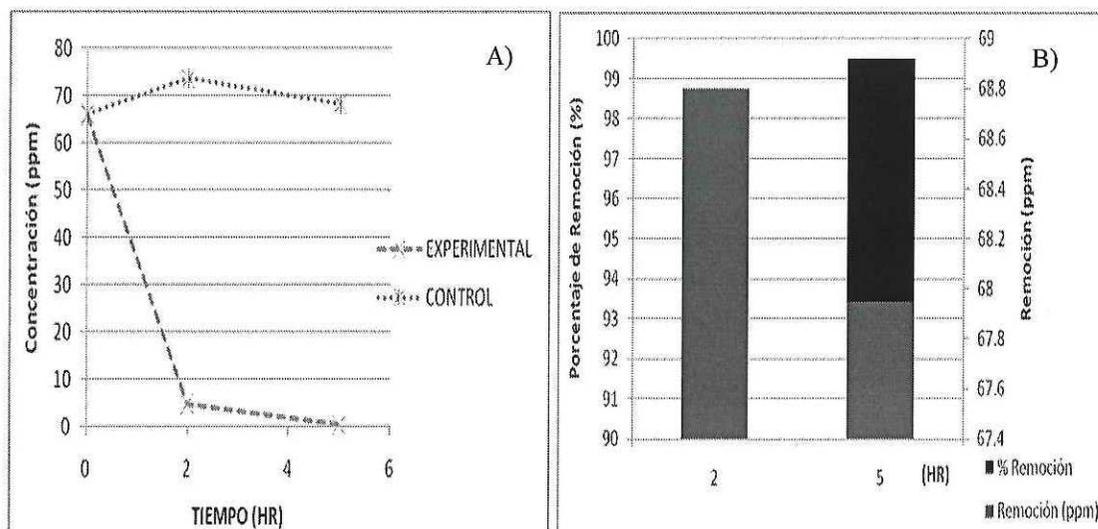


Figura 32. A) Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de NH<sub>4</sub> con tapete microbiano totalmente estructurado con concentración de NH<sub>4</sub> de 65.79 ppm y B) Eficiencias de remoción de NH<sub>4</sub>.

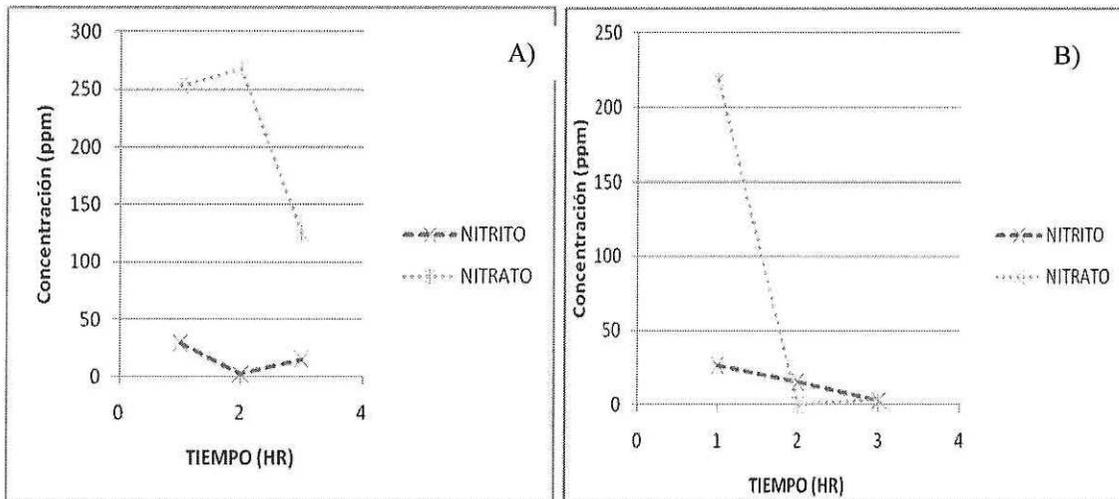


Figura 33. Concentraciones obtenidas para A) el Reactor TM experimental y B) control de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ , con tapete microbiano estructurado y una concentración de 65.79 ppm.

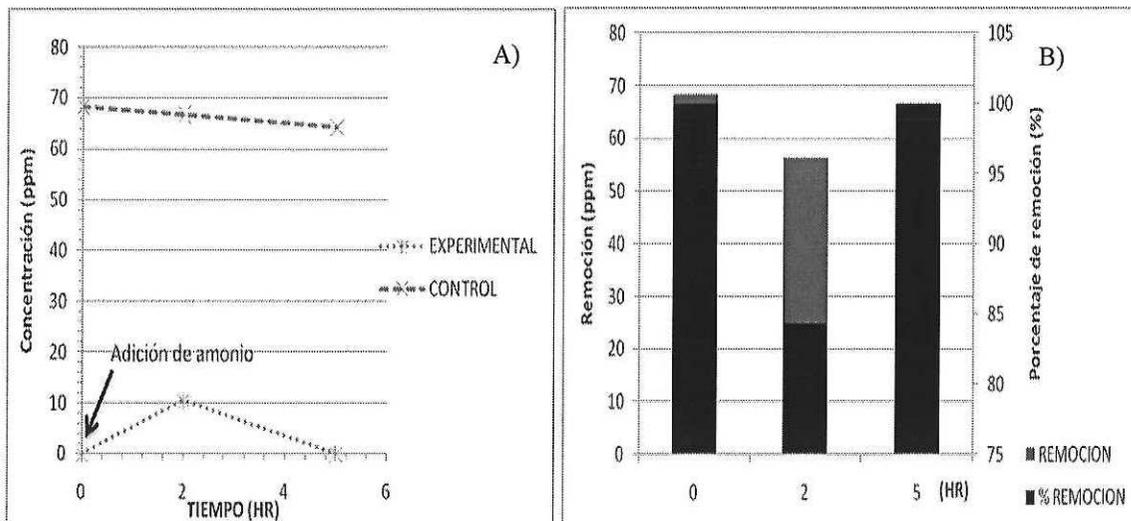


Figura 34. A) Concentraciones y remoción de  $\text{NH}_4$  obtenidas para el Reactor TM con tapete microbiano totalmente estructurado con concentración de  $\text{NH}_4$  de 10.45 ppm y porcentaje de remoción (B).

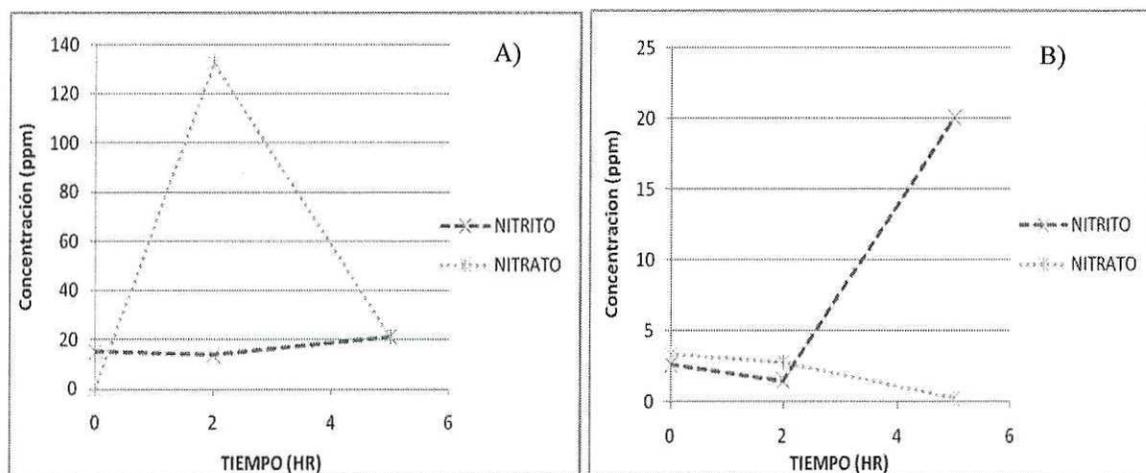


Figura 35. Concentraciones obtenidas para el Reactor TM de  $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ , con tapete microbiano estructurado y una concentración de enriquecimiento  $\text{NH}_4$  de 10.45 ppm. A), reactor con tapete microbiano; (B) control.

El pH permaneció constante en 7.87 durante el tiempo de experimentación, el O.D. nuevamente aumenta en los reactores con tapete microbiano (21.75 mg/l) en un orden de magnitud superior a 13 mg/l al compararse con los controles como resultado de la liberación de oxígeno de la actividad fotosintética de las microalgas. El número elevado de coliformes no permitió su enumeración (MNPC) ya que los valores estimados estaban por arriba de  $10^4$ .

Por parte de los sólidos volátiles observamos que no hay gran variación, ya que de la concentración inicial aumentaron en un 25.65% en los tapetes microbianos y 11.52% en los controles (figura 35).

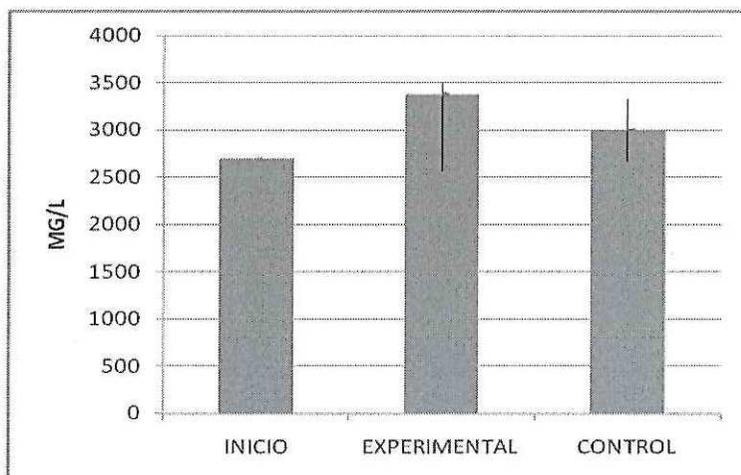


Figura 36. Sólidos volátiles presentes durante el experimento con una concentración de  $\text{NH}_4$  de 10.45 ppm.

En general el proceso de remoción y nitrificación obedece al tiempo de activación de la comunidad microbiana como resultado de la superficie de contacto del sustrato con el tapete microbiano. El resultado de este periodo se manifiesta en el incremento en las razones de remoción y transformación de los nutrientes. Este tipo de reactor una vez conciliado aspectos de capacidad de carga amoniacal con tiempos de retención hidráulica puede ser escalado considerando la disponibilidad de una comunidad de microorganismos seleccionados y activados, su estructura y soporte, así como el inoculo y el volumen que estos pueden trabajar.

#### D) Tiempos de retención hidráulica

En cuanto al tiempo de retención hidráulica es necesario mencionar que esta varia conforme el tapete microbiano va tomando actividad de degradación por parte de los microorganismos presentes y por lo cual la remoción en un inicio se llevo a cabo en 168 y 48 horas posteriormente a estos tiempos los tapetes microbianos ya activados realizaban la remoción de  $\text{NH}_4$  (65.79 ppm) en 5 horas, lo anterior lo podemos corroborar en la tabla XI. Para el caso de los coliformes se tiene que el volumen de trabajo no importo sino la actividad de trabajo que tenía el tapete microbiano lo cual se observa en la figura 37, con lo cual observamos que a 5

horas se tuvo una remoción de coliformes tan eficiente como a 48 horas esto debido al periodo de trabajo en el cual se encontraba el tapete microbiano.

XI. Tabla representativa de los tiempos de retención hidráulica (TRH) en la remoción de NH<sub>4</sub>.

Horas	Concentración media-baja de NH <sub>4</sub> (ppm)	
	Experimental	Control
0	65.79	66.15
2	4.78	73.58
5	0.33	68.28

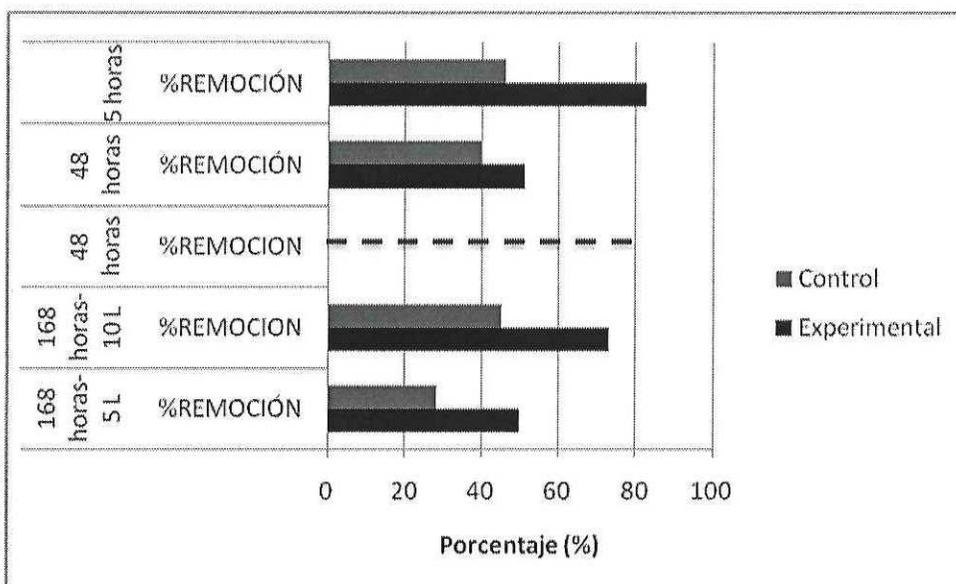


Figura 37. Tiempo de retención hidráulica (TRH) para el porcentaje de remoción obtenido para los coliformes.

## E) Coliformes

### i. Acoplamiento del Biorreactor Tapetes Microbianos: Membrana.

Una vez caracterizada la cinética de nitrificación y la bio-remediación de los componentes nitrogenados del agua residual, así como su nivel respectivo de

coliformes en los biorreactores empacados con tapetes microbianos, se procedió a acoplar la componente de membrana de microfiltración (Figura 38).

Los resultados de remoción de bacterias coliformes al acoplarse la membrana, se muestran en la tabla XII. La caracterización del agua residual se realizó considerando las diferentes condiciones que puede presentar el efluente. Así se preparó un agua tipo mezclando en partes iguales (v/v) el agua residual sin clorar con el agua clorada. El análisis registró valores que diferencian el efecto del tapete microbiano y la membrana. Después de 5 horas (tiempo registrado para la remoción de nutrientes), se obtuvieron valores de remoción de coliformes alrededor del 80 % en los reactores con tapete microbiano, mientras que una remoción del 100% se registró al acoplarse la membrana (Tabla XII). El reactor TM-MBR puede recomendarse para el reúso del agua residual, y/o la descarga en bienes nacionales sin riesgo ambiental y mitigando el impacto en la salud humana. Los niveles obtenidos cumplen con la norma oficial Mexicana NOM-03-096.

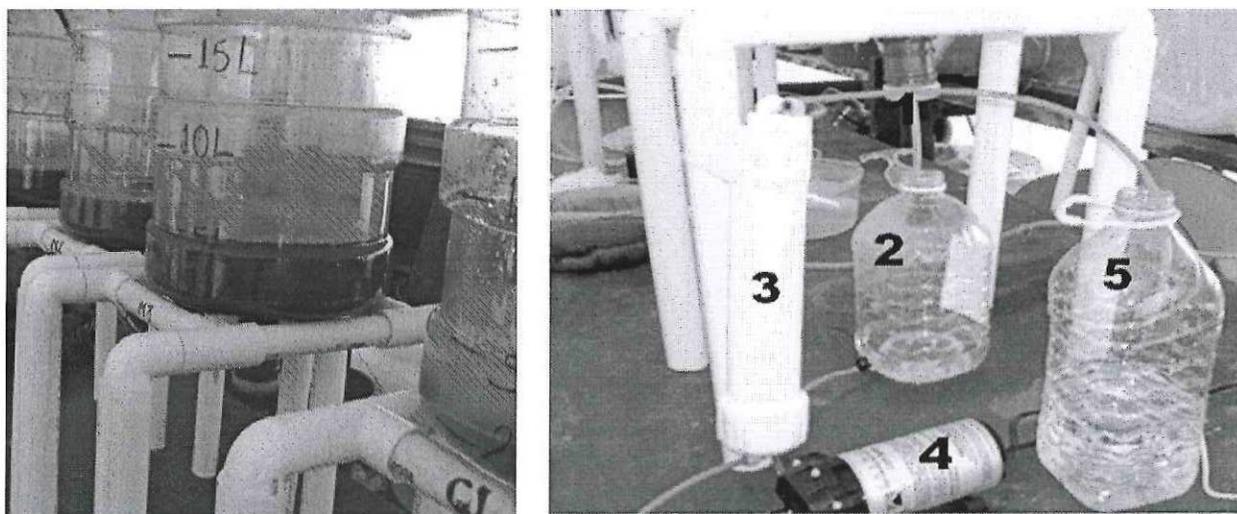


Figura 38. Imagen real del Bio-reactor Tapete Microbiano-Membrana y sus componentes. 1, alimentación; 2, Reservorio de compensación; 3, Membrana de microfiltración (polisulfona); 4, Bomba; 5, Agua permeada.

Tabla XII. Coliformes totales registrados en los reactores con tapete microbiano así como con la membrana.

Antes de la experimentación			Después de la experimentación			
	Coliformes Totales	Coliformes fecales		Coliformes Totales		Coliformes Totales
Efluente sin clorar	4435	-	Tapete microbiano	483	Membrana microfiltración	0
Efluente clorado	165	10	Soporte	1513	Membrana microfiltración	13
Mezcla	2815	-				

## F) Pruebas Estadísticas

Las pruebas estadísticas se aplicaron para determinar las diferencias y validez estadísticas de los resultados obtenidos en los tratamientos con tapete microbiano y sus respectivos controles. La remoción de  $\text{NH}_4$  registrada fue de  $t = -2.30$  ns( $P=0.025$ ) demostrando que no hay diferencia significativa con el 95% de confianza entre las variables con este resultado. La aplicación del análisis de varianza (ANOVA) de una vía posterior a la prueba de normalidad se muestra en la tabla XIII, indicando diferencias estadísticamente significativas en los resultados lo cual demostró diferencias de los resultados obtenidos con el tapete microbiano al compararse con el control.

Tabla XIII. Resultados de la ANOVA de una vía, de la remoción de  $\text{NH}_4$  con tapete microbiano y el control en función de la carga amoniacal y del volumen de la carga residual.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
TM vs. Control	54791.0	1	54791.0	5.29487	0.025970
Error	476004.7	46	10347.9		

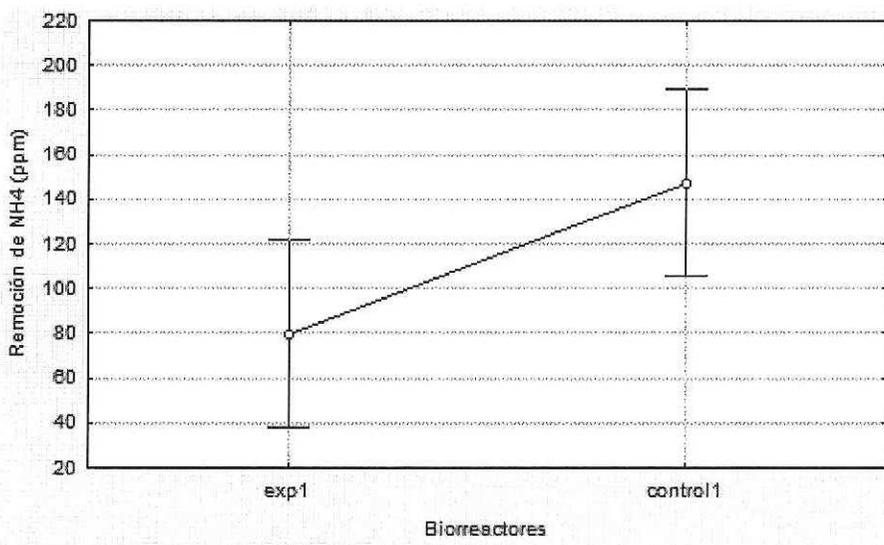


Figura 39. Desviación estándar de los valores obtenidos en el tapete microbiano en relación con los controles Remoción de NH<sub>4</sub> del tapete microbiano y el soporte aplicando ANOVA de una vía.

El análisis en los coliformes se realizó previamente mediante prueba de Kolmogorov-Smirnov para un ajuste a la normalidad ( $p < 0.05$ ), por lo que se realizó. Al aplicar el ANOVA de una vía, donde se obtuvo una diferencia significativa entre el tapete microbiano y el soporte para la remoción de coliformes (tabla XIV).

Estos resultados corroboran que el sistema de remediación propuesto realiza el tratamiento de las aguas residuales municipales (El Gallo y el Naranjo) en condiciones adecuadas para el reúso y/o el vertimiento al medio marino con mínimo impacto para el ambiente y la salud humana.

Tabla XIV. Resultados de la ANOVA de una vía, de la remoción de coliformes en función de la carga amoniacal y del volumen de la carga residual.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
<b>Soporte</b>	573788	1	573788	0.39867	0.551056
<b>Error</b>	8635448	6	1439241		

## VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el biorreactor híbrido conteniendo tapetes microbianos acoplado a una membrana, principalmente en lo que respecta a la remoción de nitrógeno y bioremediación para el pulimiento final como en la remoción de bacterias coliformes. Actualmente existe escasa información de este tipo para el tratamiento avanzado de aguas residuales, aspecto que requiere especial atención si se considera que por lo general los cuerpos de agua son los principales receptores de las descargas de aguas residuales municipales. El pulimiento del agua residual con fines de reutilización requiere complementar la componente de tratamiento biológico con sistemas de remoción de microorganismos patógenos, de lo cual no existen iniciativas que utilicen tapetes microbianos acoplados a membranas. La bio-remediación de efluentes de aguas residuales, así como la remoción de patógenos son estrategias necesarias para el reúso y/o vertimiento del agua residual en cuerpos de agua receptores con mínimo impacto en el ambiente y la salud humana.

### A. Tapetes microbianos: Bioremediación y reducción de Coliformes

Basándose en los resultados encontrados para un proceso de tapetes microbianos y bioremediación como primera iniciativa para evaluar el nivel de coliformes en el agua residual biorremediada, se obtuvo que este proceso disminuyó de un 30-40% el nivel de coliformes en el agua residual bio-remediada en comparación con los biorreactores control carentes de tapete microbiano. El papel de la componente microbiana se considera un proceso para mejorar desinfección en flujo descendente. Se observó que las bacterias declinan conforme progresa el proceso de bio-remediación lo cual pudiera indicar un cierto control de la población de patógenos mediante los componentes estructurales del tapete microbiano. El resultado se asoció al papel de las componentes microalgales predominante en el control e inhibición de las bacterias coliformes. Las propiedades antimicrobianas de ciertas microalgas pueden tener su origen en los mecanismos celulares

defensivos contra bacterias y hongos como lo señalado por Wang *et al.* (2003). Esta situación se ha observado en ciertos procesos de biopelículas durante el tratamiento de aguas residuales. Otro factor que influye en el abatimiento de patógenos es la secreción de sustancias tóxicas de las microalgas para los microorganismos, de manera similar como ocurre con los antibióticos (Moreno *et al.*, 2006). En este aspecto se considera que existe una complementariedad positiva de funciones entre microalgas y bacterias nitrificantes que entre microalgas y bacterias patógenas como es el caso de los coliformes.

En relación a la bioremediación mediante los tapetes microbianos construidos, estos evidencian la acción de los constituyentes microbianos en la remoción de nutrientes, cuya estructuración de microalgas y bacterias nitrificantes actúan. Uno de los principales aspectos que se observaron en esta etapa fue el aumento significativo en la concentración de oxígeno en los reactores con tapete microalgal en comparación con los reactores control, lo cual significó un incremento que osciló de 2 a 6 mg/l de oxígeno. Este efecto de emisión de oxígeno fotosintético microalgal ha sido reportado en los tapetes microbianos por varios autores (Bender *et al.*, 2004; Paniagua-Michel y García, 2003). Simultáneamente el oxígeno disponible coadyuva en los procesos de nitrificación en comparación con los biorreactores TM control. La acción de depuración por las microalgas en el tratamiento de aguas residuales ha sido reportada por varios autores desde 1940 (Salazar, 2006) como microorganismos purificadores de las aguas residuales. Esta capacidad se basa en el aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos de las aguas residuales que favorecen el crecimiento y auto-regeneración de estas incrementando su biomasa. Estas bondades de las microalgas integradas en los sistemas de tratamiento biológico avanzado se prefieren debido a su bajo costo, y a su versatilidad para crecer en aguas residuales significando procesos ambientalmente compatibles con factibilidad de reuso y reciclado constante. Así la reducción y remoción de  $\text{NH}_4$  en los tapetes microbianos se corroboró al compararse con los reactores control (sin tapete microalgal) evidenciando la

acción de la nutrición microalgal y nitrificación mediante las bacterias aerobias en la incorporación del amonio y transformación de amonio en nitrito. En relación al  $\text{NO}_2$  se observa que el reactor mineraliza desde 30% hasta 100% de la concentración inicial en comparación al control al igual que el  $\text{NO}_3$  lo cual es indicativo del consumo de este ion terminal del proceso de nitrificación por la comunidad microalgal que se ve favorecida con este anión (Figura 13).

La función de esta componente nitrificante así como la microalgal y las especies registradas ha sido señalada por varios autores como captadores de los aniones y cationes nitrogenados en la generación de biomasa microbiana a partir de los nutrientes en exceso en las aguas residuales (Reeves, 1972; Helmer *et al.*, 1999; Röske *et al.*, 1998).

La factibilidad de denitrificación bacteriana inconclusa pudiera estar complementada a través de las microalgas presentes. En este trabajo no se evaluó la reducción desasimilatoria de nitrato en amonio (RDNA), de acuerdo a los resultados y a las condiciones experimentadas (temperatura, acumulación de nitrato y niveles de oxígeno disuelto), no favorecen la desnitrificación por ninguna de las vías del RDNA la cual puede considerarse como inhibida.

La evaluación del efecto de la combinación de la componente microalgal con la de bacterias nitrificantes se realizó en tapetes microbianos contruidos *ex – profeso* así como su capacidad para bio-remediar los compuestos nitrogenados provenientes del efluente de aguas residuales municipales.

## **a) Efecto de la variabilidad de carga amoniaca del agua residual**

### *i. Cinética con carga amoniaca elevada*

La variabilidad registrada en la composición del agua residual, se concilio mediante varios ensayos previos, así se determinaron tres tipos de agua basado

en los rangos de concentración de amonio en el agua residual definiéndose como agua residual con concentración baja (10.45 ppm); intermedia (48.44 ppm) y concentración alta (155.22 ppm).

El resultado obtenido al estudiar el intervalo alto de concentración de amonio (155 ppm) observado en la Tabla VIII y figura 24 muestra una disminución importante de amonio a las 20 horas de reacción con el tapete microbiano construido (microalgas + bacterias); el agotamiento completo de la concentración de amonio se registro después de 48 hr de estadía del agua dentro del reactor, esta remoción es sensiblemente superior a la observada en los reactores control. El inicio del proceso de nitrificación inicia con la formación de nitrito, 25.22 ppm, el cual disminuye constantemente hasta 17.008 ppm; en el caso de los reactores TM controles registran un valor mínimo de 3.2 ppm, lo cual podría indicar una menor nitrificación debido a la carencia de la componente de nitrificantes en estos sistemas control. Este resultado podría corroborarse con los valores obtenidos en el caso del nitrato que no se registra concentración alguna en los reactores TM control. Las concentraciones bajas registradas en los tratamientos con tapete microbiano, indican consumo por la componente microalgal a diferencia de los biorreactores TM control (Figura 25). Los efectos de este tipo reportados en este trabajo para el tratamiento de aguas residuales mediante microalgas y tapetes microbianos así como en biopelículas han sido registrados por Pinckney ., 1995; You, 2002; Zamora- Castro *et al.*, 2008.

Simultáneamente, el pH disminuye menos durante el proceso en los controles que en los reactores con tapetes microbianos (5.5), evidenciando la acción de nitrificación en los tapetes microbianos como lo reportado por Zamora–Castro *et al.* (2007) Larsdotter *et al.*, (2010), pues la nitrificación se considera la principal contribuyente en esta situación debido al consumo de cationes como el amonio.

Las cianobacterias juegan un importante papel en el desarrollo de tapetes microbianos y son las principales en la estructuración de los microorganismos. Son predominantemente organismos fototróficos productores de oxígeno. Las microalgas predominantes encontradas y estructuradas en los tapetes construidos, han sido reportadas como cosmopolitas en sistemas de aguas residuales en climas templados, como *Oscillatoria sp.*, *Anabaena sp.*, *Chaetoceros sp.*, *Chlamydomonas sp.*, *Chlorella sp.*, *Chlorococcum sp.* y *Rhodomonas* como las más abundantes (Stal & Krumbein., 1986, Salazar, 2005). Esta especie aislada es interesante debido a su capacidad de sintetizar nitrogenasa (Stal & Krumbein, 1986), además de que el oxígeno generado por *Oscillatoria* soporta la nitrificación (Bender *et al.*, 2004). Las diatomeas fueron también un grupo dominante en nuestro tapete microbiano, los cuales se caracterizan por contribuir a la productividad primaria en ecosistemas costeros (Valiela., 1995). Se ha registrado que los géneros de mayor abundancia en la Bahía de Todos los Santos son las diatomeas (Zamora *et al.*, 2004), dentro de las que se encontraron a *Nitzschia* y *Navicula* especies dominantes dentro de nuestros tapetes. Seguida de *Chroococcus* como reportado por Zamora-Castro *et al.* 2007.

El sistema de Zamora (2004) mostro una remoción eficiente de amonio (28 - 79%), nitritos (54-77%) y nitratos (50-82%). Lo cual demuestra que no existe un efecto inhibitorio por las altas concentraciones de amonio sobre el consumo de nitrato (Syrett y Morris., 1963; Ullrich, 1981).

La eliminación de coliformes fue buena después de mantener el efluente con el tapete microbiano por un periodo de tiempo de 5 horas. Esta eliminación total de coliformes considerando que es el resultado de la acción de las algas que proliferan durante todo el proceso en el reactor, conjuntamente con la acción de la radiación solar. La radiación posibilita la realización de la función fotosintética por parte de las algas, con la consiguiente generación de O<sub>2</sub>. La sobresaturación de O<sub>2</sub> que llega a producirse puede considerarse uno de los factores responsables de la eliminación de coliformes. La producción de oxígeno generada por el tapete

microbiano es alta durante la fotosíntesis, ayuda a la denitrificación por las bacterias nitrificantes que rápidamente hacen la conversión de amonio a nitrito. Este proceso se activó debido a la cantidad de oxígeno que se generaba dentro de los reactores y lo cual fue reflejado en los resultados obtenidos. Otro factor fue el pH ligeramente alcalino que se mantuvo dentro de los reactores (8.5 y 7.15) que pudiera fomentar los procesos de volatilización del amonio (Suceder y Hegewarld, 1998).

Los resultados obtenidos en relación a la disminución de bacterias coliformes indican un papel preponderante de los tapetes microbianos cuya estructura de organismos pudiera estar controlada por la población de coliformes del agua residual durante el tratamiento. Se ha reportado que la secreción de sustancias tóxicas de las microalgas produce el abatimiento de los patógenos de manera similar a los antibióticos (Cole, 1982).

#### *ii. Efecto a nivel de coliformes*

Los valores obtenidos en el nivel de coliformes totales (Figura 26-A) fueron menores aproximadamente un 50% (260 NMP/100 ML/100ml) al final del tratamiento con los tapetes microbianos en relación a los controles sin tapete microbiano (500 NMP/100 ML/100ml). Una reducción importante se logró en los reactores con tapetes microbianos en comparación con los niveles registrados inicialmente en el agua residual muestreada, pues el procedimiento aplicado logró reducir en un 88% el nivel de coliformes proveniente de las aguas residuales analizadas (Figura 25-B). Un efecto similar se observa en relación a la carga en sólidos volátiles que presentan una disminución del 34.84% en los reactores experimentales.

### *iii. Cinética con carga amoniaca mediana*

Esta cinética se realizó con una concentración inicial de amonio en el agua residual colectada de 48.44 ppm (Tabla IX); misma que registro una gran variación como resultado de la nitrificación y/o consumo de amonio por la población microbiana presente en los tapetes construidos (fig. 28-A). A pesar de las oscilaciones pronunciadas en el consumo de este catión, asumidas de los tiempos de adaptación, y crecimiento microbiano debido al consumo del sustrato, el sistema logró reducir la concentración en un 100% a las 25 horas de experimentación (figura 28-B). No así para el caso del  $\text{NO}_2$  (fig. 29-A) que se agota después de 48 horas y registra oscilaciones que evidencian la presencia de bacterias oxidantes de nitrito como lo reportado por Bebout *et al.*, (1993); Glibert *et al.*, (1994); Miyajima *et al.*, (2001); Nagel, (2004). La progresión de la nitrificación muestra una tendencia lenta del nitrato, que se intensifica después de 48 horas en los reactores microbianos mientras que esta se ve fuertemente inhibida en los reactores controles al inicio del experimento. Después de 5 horas empieza haber presencia de este elemento y va en aumento hasta las 48 horas, por parte de los controles solo se registra su presencia al inicio pero al carecer de una población nitrificante se inhibe y no registra concentración de (0 ppm) al final del experimento.

### *iv. Efecto a nivel de Coliformes.*

Se observó una disminución del 51% en el nivel de coliformes totales (Fig. 30-A), sin embargo el resultado de reducción de coliformes es ligeramente superior de lo encontrado en los reactores control (Fig. 30-B) lo cual podría ser indicativo del efecto físico de barrera del soporte. Las implicaciones de control de patógenos por los tapetes microbianos coadyuvan a reducir el contenido en coliformes totales. Este efecto ha sido reportado a nivel de cultivos densos de microalgas y a nivel de consorcios microbianos (Moreno *et al.*, 2006) y cada vez cobra más relevancia en

estudios de biopelículas (Camper *et al.*, 1996; Pierre *et al.*, 1996; Banning *et al.*, 2003). Por ejemplo, las cianobacterias han sido caracterizadas por sus propiedades de producción de sustancias alelopáticas que inhiben el crecimiento bacteriano (Peinador, 1999), Schumacher y Sekoulov (2003) proponen el uso de esta propiedad para la eliminación de las bacterias fecales en efluentes terciarios de aguas residuales.

Un aspecto en el que influye la carga orgánica contenida en el agua residual es en el contenido de sólidos volátiles que reflejan metabolismo endógeno por la comunidad microbiana (Zeng *et al.*, 2010).. Su incremento en los reactores al inicio refleja la progresión en crecimiento de los constituyentes microbianos en el agua. Sin embargo en relación a los sólidos totales no hay gran cambio de estos entre el agua inicial y experimental, lo cual no sucede con los controles y eso lo podemos observar en la grafica 31. Este resultado podría estar asociado a la tasa de filtración del tapete microbiano (~90%) que no registra diferencias entre control y experimental a pesar de la presencia del componente microbiano. Usualmente el nivel reportado para aguas residuales municipales en sólidos es de 350-1200 ppm (Seoanez).

Una de las problemáticas asociadas a los tapetes microbianos es la formación de costras, resultado del crecimiento excesivo en biomasa conforme progresa la maduración del tapete. Este efecto se observó en la última parte experimental donde la diferencia de concentración de células en los tapetes de los reactores experimentales incremento su turbidez debido al desprendimiento de células (Tapete 3 > Tapete 2 > Tapete 1).

El funcionamiento de los reactores empacados con tapete microbiano en fase de activación generó los mejores resultados en las pruebas de remoción de amonio, 65.79 ppm se redujo en un 100% (Figs. 32-A, 32-B). El progreso de la nitrificación se evidencia con la presencia de nitrito (29.59 ppm) en los reactores con tapete

microbiano, el cual es transformado y/o consumido dentro de los reactores a una disponibilidad mínima de 2.6 ppm. Este resultado se relaciona con la nitrificación donde la tendencia del nitrato puede deberse a consumo menor a la producción (Fig. 32) en el reactor experimental, condición que se ha observado en tapetes microbianos dominados por cianobacterias (De la Noue, 1988; Bender *et al.*, 1995) y en biopelículas nitrificantes utilizadas para bio-tratamiento de aguas residuales y efluentes industriales (Lazarova y Manem, 1995).

La corroboración de los resultados de la relación sustrato-consumo se realizó enriqueciendo los biorreactores microbianos con cloruro de amonio equivalente a la concentración baja (10.45 ppm), lo cual muestra la tendencia reportada anteriormente, pero en una escala de tiempo mucho más corta evidenciando la fase de crecimiento y activación exponencial de la comunidad microbiana como ha sido reportado previamente por Cembella *et al.*, 1982 y Sternberg *et al.*; 1999.

La tendencia observada anteriormente en relación al amonio, fue corroborada en relación a la concentración de nitrito y nitrato en un periodo más corto. El contenido en sólidos no presenta una variación elevada.

La tendencia general observada es un proceso lento de activación de los tapetes que se activa de manera exponencial en la componente microbiana mediante el sustrato aportado en las aguas residuales lo que induce a procesos de nitrificación mucho más acelerados y estables en cuanto se refiere a remoción y reducción. Las diferentes concentraciones suministran sustrato para una población microbiana activa que empieza a degradar más rápido los nutrientes en un rango de horas (Kim *et al.*, 2003)..

## **b) Acoplamiento del Bio-reactor Tapetes Microbianos: Membrana.**

### **i. Efecto a nivel de coliformes**

El objetivo del acoplamiento del sistema de membrana fue el producir agua para fines de reúso, una vez removidos los nutrientes en exceso y estabilizado el efluente. Para tal fin se alimento el reactor con agua residual tipo, combinación de agua residual clorada y sin clorar para evaluar el efecto de la membrana en el pulimiento del agua y la remoción respectiva de coliformes como se observa en la tabla XII.

Las concentraciones registradas en este efluente sin clorar excedieron la cantidad permisible de coliformes que establece la norma NOM-003-Ecol-1996; una concentración sensiblemente menor producto de la cloración antes de la liberación del efluente al medio se observó; el agua tipo (2815 NMP/100 mL) se sometió a pulimiento en la componente de membrana de microfiltración durante un tiempo de retención hidráulica de 5 horas, seleccionado en base a la remoción de nutrientes en el menor tiempo.

Los resultados registrados demostraron que los tapetes microbianos ejerce una disminución sustantiva en coliformes al compararse con el control (sin microorganismos) y el efecto más determinante se determinó mediante la membrana que realiza la eliminación de coliformes casi al 100% y cumple con la NOM Mexicana. Las diferencias obtenidas en las pruebas estadísticas (con tapete vs sin tapete) realizadas son significativas ( $p < 0.05$ ) en la reducción de nutrientes y coliformes. La diferencia entre tapete microbiano y la membrana de microfiltración también fue significativa ( $p < 0.05$ ), reiterando y demostrando los resultados obtenidos (tabla II). Todo lo anterior nos conlleva a que el sistema de remediación deja las aguas del efluente de las plantas de Tratamiento el Gallo y el Naranja en condiciones adecuadas para su reúso con un grado elevado de confiabilidad.

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran una baja calidad de agua residual que es descargada a la bahía Todos los Santos, tanto por el nivel de coliformes que se encuentran presentes dentro de ella así como por las concentraciones elevadas de nitrógeno y fosforo. En repetidas ocasiones se exceden los límites permitidos para la protección de la vida acuática y para el agua marina de uso recreativo y pesquero (CNA-IMTA, 2000; Martínez *et al.*, 2001).

Las tecnologías de membrana ofrecen la posibilidad de una clarificación y desinfección simultánea sin la necesidad de adición de productos químicos, que pueden reaccionar con las impurezas del agua generándose subproductos indeseables. Los resultados obtenidos al final de la experimentación mediante la MBR registro de 10 a 0 NMP/100 mL de coliformes indica una calidad elevada de agua para reúso de bajo costo energético comparativamente a una membrana de osmosis inversa. Recientemente el biorreactor comercial de membrana (MBR) ha sido operado por todo el mundo para el tratamiento de aguas residuales industriales, su mayor ventaja es la calidad del efluente producido que elimina virus y microorganismos patógenos. Esta factibilidad se logra incrementando el tiempo de retención en sólidos lo más largo posible para fomentar el desarrollo de la biomasa (You *et al.*, 2007). Su optimización deberá residir en la combinación y/o acoplamiento de la remoción de nutrientes excesivos así como bacterias patógenas a bajo costo. Aunque los sistemas MBR para el tratamiento de aguas residuales reportan eficiencias de calidad del agua que van del 95 al 99% (Alien *et al.*, 2007), nuestros resultados con la integración del modulo MBR de microfiltración acoplado a tapetes microbianos logra un nivel de retención de partículas que va de 0.1 a 10  $\mu\text{m}$ .

Una aplicación del proceso desarrollado en este trabajo puede coadyuvar a disminuir el nivel de contaminación de las aguas costeras de la Bahía de Todos

Santos que recibe constantemente a través del arroyo El Gallo (266 Lps) de aguas residuales con un alto contenido de materia orgánica y bacterias coliformes.

Las conclusiones principales se enlistan a continuación.

1. La selección y aislamiento de microalgas y bacterias nitrificantes del sitio de descarga del efluente permitió mejorar la calidad del agua.
2. Los tiempos bajos de retención hidráulica en los reactores con tapete microbiano coadyuvieron a la eliminación de  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_2$ , formación de  $\text{NO}_3$  y biomasa activada.
3. El biorreactor TM-MBR posee la capacidad para mitigar el nivel de coliformes del efluente de aguas residuales municipales (El Gallo-El Naranjo) a un nivel superior al 90 % y a bajo costo.
4. El biorreactor TM-MBR realizó el tratamiento del agua residual municipal generando agua de calidad para el reúso y/o vertimiento en aguas y bienes nacionales de acuerdo a la norma oficial Mexicana sin impactar el ambiente y a un riesgo reducido para la salud humana.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Aileen N.L. Ng, Albert S. Kim. (2007). A mini-review of modeling studies on membrane bioreactor (MBR) treatment for municipal wastewater, Desalinization. 212: 261-281.
- Abeliovich A. (1987). Nitrifying bacteria in wastewater reservoirs. Applied and Environmental Microbiology. 53(4): 754-760.
- Bebout BM, MW Fitzpatrick and HW Paerl. (1993). "Identification of the sources of energy for nitrogen fixation and physiological characterization of nitrogen-fixing members of a marine microbial mat community." Applied and Environmental Microbiology. 59(5): 1495-1503.
- Bender J. y Phillips P. (2004). Microbial mats for multiple applications in aquaculture and bioremediation. Biosource Technology. 94:229-238.
- Bender J., Richard L., Sheppard M., Brinkley K., Phillips P., Yeboah Y. y Wah R. (2004). A waste effluent treatment system based on microbial mats for black seas bass *Centropristis Striata* recycled-water mariculture. Aquacultural Engineering. 31(1-2):73 82.
- Camper AK, WL Jones and JT Hayes. (1996) Effect of growth conditions and substratum composition on the persistence of coliforms in mixed-population biofilms Appl. Environ. Microbiol. Vol 62(11): 4014-4018.
- Cappuccino JG y Sherman N (1992) *Microbiology; A Laboratory Manual* (3rd edn.). Rockland Community College, Suffern: New York. 544.
- Chávez A., Jiménez B., Gillberg L. (2002). Determinación del efecto del tiempo y la distribución del tamaño de partículas de un agua tratada con diversos coagulantes, Memorias del XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniera Sanitaria Ambiental. 27 de octubre al 1 noviembre.

- Cembella A. D., Naval J. A., Paul J. H. (1982). The Utilization of Inorganic and Organic Phosphorous Compounds as Nutrients by Eukaryotic Microalgae: A Multidisciplinary Perspective: Part I Critical Reviews in Microbiology, Vol. 10(4): 317 – 391.
- Cole, J., (1982) Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13:291-314.
- Comisión Nacional del Agua (CNA). (2007). Estadísticas de Agua en México, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Ambientales.101.
- Comisión Nacional del Agua (CNA), Subdirección General de Administración del Agua (1989). Criterios ecológicos de calidad del agua.
- CNA-IMTA. (2000). Estudio de la calidad del agua en la bahía de Ensenada B.C.
- Díaz C. y Campos C. (2003). Comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en los diferentes sistemas de desinfección, Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua (RIPDA-CYTED) y Centro Interamericano de Recursos del Agua, Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de México (CIRA-UAEM).
- Eliassen Rolf, Tchobanoglous G. (1969). Removal of nitrogen and phosphorus from waste water *Environ. Sci. Technol.* 3 (6): 536–541.
- De La Noue, J., De Pauw, N. (1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotech. Adv.* Vol. 6: 725-770.
- Guillard, R.R.L. y J.H.Ryther. Studies of marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Com J Microbiol* 1962: 229-398.

- Glibert P.M. and Bronk D.A. (1994). "Release of dissolved organic nitrogen by marine diazotrophic cyanobacteria, *Trichodesmium spp.*" *Applied and Environmental Microbiology*. 60(1): 3996-4000.
- Glass C., Silverstein J.A. and Denton L. (1997). Bacterial populations in activated sludge denitrifying high nitrate waste reflect pH differences. *Proc. 2nd Int. Conf. on Micro-organisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*, Berkeley. 377-380.
- Graae J., Keithley S., Luc M., Pawl J., Wilson D. (2008) Alternative solution for wastewater treatment in U.S.-Mexico border colonias: An analysis from Socio-Economic and technological perspectives Bren School of Environmental science and Management, University of California at Santa Barbara. 143.
- Helmer C., S. Kunst, Juretschko, M. C. Schmind, K. H. Schleifer y M. Wagner. (1999). Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. *Wat. Sci. Tech.* 39 (7):13-21.
- Juhna, T., Birzniece, D., Rubulis, J. (2007). Effect of Phosphorus on Survival of *Escherichia coli* in Drinking Water Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3755-3758.
- Johnson M. y Wen Z. (2010). Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(3): 525-534
- Ketchumpa. (1988). *Microbiology: Concepts and Applications*. John Wiley & Sons, Inc.: Canada.
- Kim DJ, Chang JS, Lee DI, Han DW, Yoo IK, Cha GC. (2003). Nitrification of high strength ammonia wastewater and nitrite accumulation characteristics. *Water Sci Technol.* 47(11):45-51.
- Krumbein W. (1994). The year of Slime. In: Krumbein WE, Paterson D, Stal Ij (eds) *Biostabilization of sediments*. Bibliotheks und Information system der Carl von Ossietzky Universitat Oldenburg. 1-7.

- Larsdotter K., Jansen J., Dalhammar G. (2010). Phosphorus removal from wastewater by microalgae in Sweden - a year-round perspective. *Environmental Technology*. 31(2): 117-123.
- Latasa M. (2007). Improving estimations of phytoplankton class abundance using CHEMTAX. *Marine Ecology Progress Series*. 329:13-21.
- Lazarova y Manem J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*. 29(10): 2227-2245
- Leiknes T., Bolt H., Engmann M., Odegaard H. (2006). Assessment of membrane reactor design in the performance of a hybrid biofilm membrane bioreactor (BF-MBR), *Desalination*. 199: 328-330.
- Martínez E. y Ramírez V. (2001). Seguimiento al estudio de la calidad en la bahía de Ensenada, B.C. *Anuario IMTA 2001*.
- Marrot B., Barrios-Martinez a., Moulin P., Roche N. (2004). Industrial wastewater treatment in a membrane biorreactor: A review. *Environmental Progress*. 23(1):59-68.
- Miyajima T, M Suzumura, Y Umezawa and I Koike. (2001). "Microbiological nitrogen transformation in carbonate sediments of a coral-reef lagoon and associated seagrass beds. *Marine Ecology Progress Series* 217: 273-286.
- Moreno M., Vaz Pardal R., Gutiérrez Cotro A. y Lebrato Martínez J. (2006), III Congreso de Ingeniería civil, territorio y medio ambiente. Universidad de Sevilla. 25-27 septiembre.
- Nagel E. (2004). Nitrogen fixation in benthic microalgal mats: an important. Internal source of "new" nitrogen to benthic communities in Florida Bay. University of Maryland. Tesis. 103.
- Noyola A., Cisneros M., Morgan J. (2005). Tratamiento de agua residual, Tratamiento de aguas en zonas industriales, urbanas y rurales, Proyecto 7.2.2.

- Oswald, W. J. (1960). Light conversion efficiency of algae grown in sewage. *J. Sanitary Eng. Div, Am. Soc. Civil Eng.* 86(SA4):71–95.
- Pacheco Vega R. (2007). Participación de la Comisión Nacional del Agua en el tratamiento de aguas residuales, en la cuenca de Lerma-Chapala. *Estadísticas Federales y Estatales, Región y Sociedad*, Vol. 19(39): 60-61.
- Paniagua Michel J. y García O. (2003). Ex – situ bioremediation of shrimp culture effluent using constructed microbial mats. *Aquacultural Engineering*. 28:131-139.
- Peinador, M. (1999). Cyanobacteria as bioindicators of organic pollution *Rev. Biol. Trop.* 47(3):381-391.
- Pierre M., Camper A., Jones W., Gatel D., and Goldman J. C. (1996). Colonization and Disinfection of Biofilms Hosting Coliform-Colonized Carbon Fines *Applied And Environmental Microbiology*. Vol. 62(12): 4428–4432.
- Pinckney J., Paerl H. W., Fitzpatrick M. (1995). Impacts of seasonality and nutrients on microbial mat community structure and function. *Marine Ecology Progress Series*. Vol 123: 207-216 pp.
- Prescott, G.W., (1972). *How to Know the Freshwater Algae*. WmC. Brown. New York. Nitrogen Removal: A Literature Review Thomas G. Reeves *Journal (Water Pollution Control Federation)*. Vol. 44(10): 1895-1908.
- Reynolds K. (2002). Tratamiento de Aguas en Latinoamérica, Identificación del Problema. *Agua Latinoamérica*. 1-4.
- Robertson L.A. and Kuenen G. (1992). Nitrogen removal from water and waste. *Microbial Control of Pollution*. 227-267.
- Röske, I., Röske y D. Uhlmann. (1998). Gradients in the taxonomic composition of different microbial systems: comparison between biofilms for

advanced waste treatment and lake sediments. *Wat. Sci. tech.* 37 (3-4): 159-166.

- Salazar González M. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales, *ContactoS*, 59, 60-70 pp..
- Sánchez Tonatiuh y Torres-Alvarado R. (2005). Estructuras y aspectos biotecnológicos de las comunidades acuáticas microbianas: biopelículas y tapetes microbianos, *ContactoS*, 58:63-71.
- Sanchez O., Marti M., Aspe E. y Roeckel M. (2001). Nitrification rates in a saline médium at different dissolved oxygen concentration, *Biotechnology Letters* 23: 1597–1602.
- Sánchez O., Aspé E., Roeckel M. (2000) In: *Anales XIV Congreso Chileno de Ingeniería Química (Proceedings of the XIVth Chilean Meeting of Chemical Engineering)*, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile, 23-26 Oct., 401–405.
- Schumacher. G. and Sekoulov, I. (2003). Improving the effluent of Small Wastewater treatment Plants by bacteria Reduction and Nutrient Removal with an Algal Biofilm. *Wat. Sci Tech.* 48:(2) 373-380.
- Segovia-Zavala A.J. y Orozco-Borbón M.V. (1986) Calidad bacteriológica del agua de mar en la zona costera noroccidental de Baja California Mexico *Ciencias Marinas UABC.* 12(1):93-102
- Seoanez Calvo Mariano. (1999). Aguas residuales urbanas. Tratamientos naturales de bajo costo y aprovechamiento. Edit. Ediciones MUNDI-PRENSA. Curso de tratamiento de aguas (Tomo II). Consejería de Transportes y Obras Públicas. Eusko Jaularitza-Gobierno Vasco. 368.

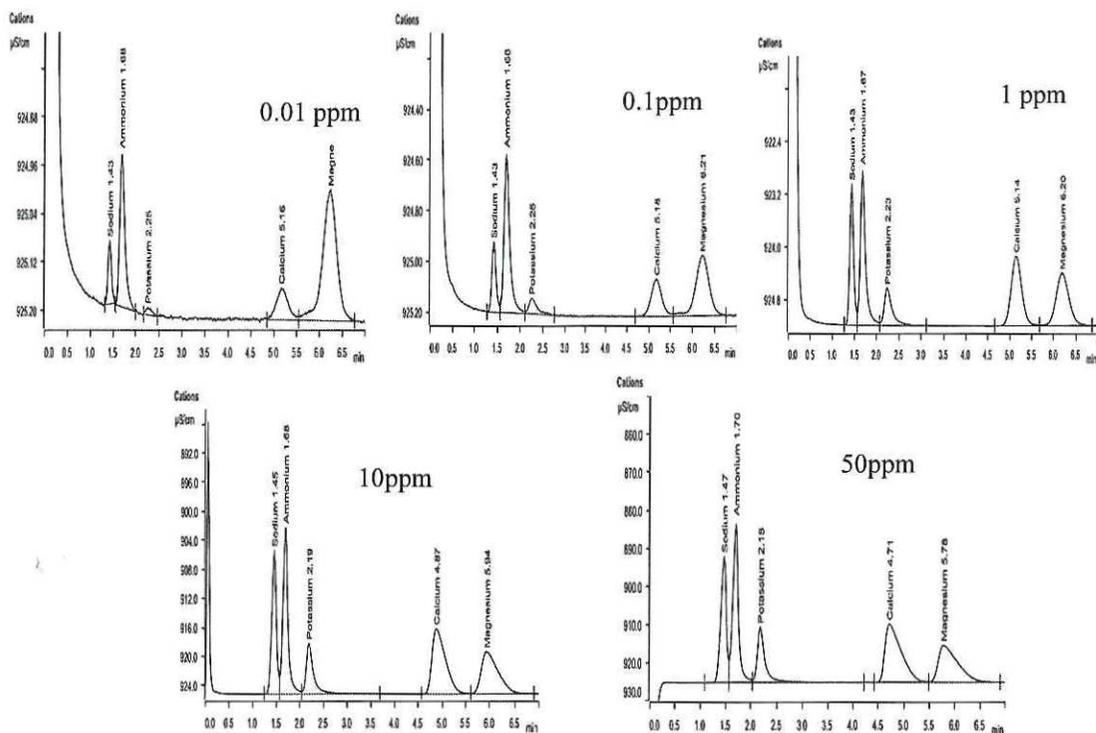
- Sharma B, Ahlert RC. (1977). *Water Res.* 11: 897–925.
- Stal I. j. and Krumbein (1986) Metabolism of cyanobacteria in anaerobic marine sediments. *Actes de Colloques*, 3:301-309.
- Sternberg C., Christensen B., Johansen T., Toftgaard Nielsen A., Andersen J., Givskov M., and Molin S. (1999). Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9):4108-4117.
- Stolz John. (2000). *Microbial Sediments*, R.E Riding and S.M. Awramik (Eds). 331.
- J. H. Vail, R. Morgan, C. R. Merino, F. Gonzales, R. Miller, and J. L. Ram. 2003. Enumeration of Waterborne *Escherichia coli* with Petrifilm Plates: Comparison to Standard Methods, *Environ. Qual.*, 32:368-373.
- Vera L., Villaroel R., Delgado S., Elmaleh S. (2000). Enhancing microfiltration through an inorganic tubular membrane by gas sparging, *Membrane Science*. 165(1): 47-57.
- Vitousek, P.M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C.B., Grimm, N.B. (2002) Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57/58: 1–45.
- 
- Wang S., Hu Q., Sommerfeld M y Chen F. (2003). An optimized protocol for isolation of soluble proteins from microalgae for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Phycology*. 15(6):485-496.
- You S. J., Hsu C. L., Shen Y. J., and Ouyang C. F. (2002). The microbial diversity of a hybrid AS-Biofilm process compared with an A2O process using non-cultured based molecular biotechnology. *Biotechnol. Let.* **24**(16): 1361-1366.
- You S.J., Tseng D.H., Liu C., Ou S.H. y Chien H.M. (2007). The performance and microbial diversity of a membrane biorreactor trating with

the real textile dyeing waste water. *Environmental technology*. 28(8): 935-941.

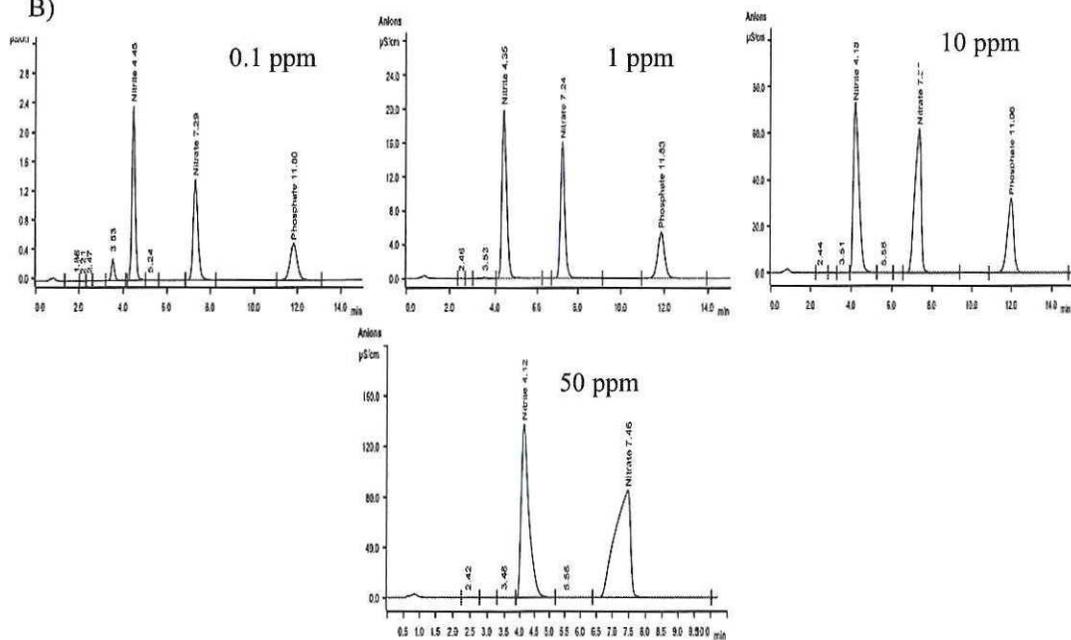
- Zamora Castro J., Paniagua Michel J., Lezama Cervantes C. (2008). A novel Approach for Bioremediation of a Coastal Marine Waste Water Effluent Based on Artificial Microbial Mats, *Marine Biotechnology*.10: 181-189,
- Zeng S., Yuan X., Shi X. y Qiu S., (2010). Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp. *Journal of Hazardous Materials*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TGF-4Y65SHR-8/2/dd06c53ff81c478c0b81328b6cfbbab3>

## APENDICE

A)



B)



Curvas de calibración generada para A) cationes y B) aniones realizadas mediante el cromatografo de intercambio ionico.

