



UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS**

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS NITRIFICANTES Y
EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN
DE TRICLOROETILENO EN UN BIORREACTOR DE
LECHO NATURAL EMPACADO**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

JONATHAN ABIGAIL PARADES AGUILAR

Hermosillo, Sonora, México

Octubre de 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Hermosillo, Sonora a 30 de octubre del 2018.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **Aislamiento de bacterias nitrificantes y evaluación de su capacidad de degradación de tricloroetileno en un biorreactor de lecho natural empacado**, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el **Grado de Maestro en Biociencias**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

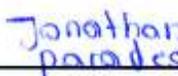
De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E



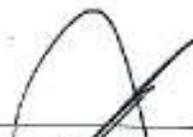
El saber de mis hijos
hará mi grandeza
DEPARTAMENTO DE
INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS
POSGRADO EN
BIOCIENCIAS


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA


Jonathan Abigail Parades Aguilar

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis intitulada “Aislamiento de bacterias nitrificantes y evaluación de su capacidad de degradación de tricloroetileno en un biorreactor de lecho natural empacado” presentada por Jonathan Abigail Parades Aguilar, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Biociencias.



Dr. Carlos Enrique Peña Limón
Director de tesis



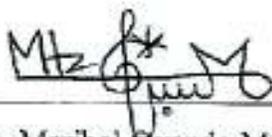
Dr. Luis Ángel Medina Juárez
Co-director de tesis



Dra. Nohemí Gámez Meza
Sinodal secretario



Dra. Kadiya del Carmen Calderón A.
Sinodal interno



Dra. Maribel Ovando Martínez
Sinodal interno



Dra. Denisse Serrano Palacios
Sinodal externo

DEDICATORIA

A mi familia, por permanecer siempre unida y siempre estar presente. A mis padres, por el amor que me demuestran, por ser mi principal apoyo, por los sacrificios que han hecho para darme lo mejor y por creer en mí. Porque gracias a todo eso he logrado cumplir este logro y cada una de las metas que me he propuesto.

A mis hermanos, por su apoyo, porque han sido una fuente de estímulo que me alegra los días, gracias por compartir tan buenos momentos conmigo.

A todos mis profesores que me han enriquecido con sus enseñanzas durante cada uno de mis años de estudios y me han hecho crecer académicamente.

A mis amigos, compañeros y a cada una de las personas que han influido en mí de alguna manera a lo largo de mi vida y me han hecho crecer como ser humano.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Sonora**, al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS)** y a la **Maestría en Biociencias**, por recibirme, enseñarme y darme la oportunidad de realizar este proyecto en sus instalaciones.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el apoyo otorgado durante estos dos años de maestría.

A mi **Comité de Tesis**:

Al **Dr. Carlos E. Peña Limón** por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto con él, por sus enseñanzas, anécdotas y su apoyo. Al **Dr. Luis Ángel Medina Juárez**, por aceptar colaborar en este proyecto y abrirme las puertas de su laboratorio, por todo su apoyo y guía durante mi maestría, por su atención a mis necesidades, por sus consejos y su comprensión, por creer en mí para lograr la culminación de este trabajo. A la **Dra. Kadiya Calderón Alvarado**, por todas sus enseñanzas, guía y apoyo durante mi proyecto de tesis, por preocuparse y estar siempre pendiente de mi trabajo, y porque me inspira a ser un mejor estudiante y profesionalista. A la **Dra. Nohemí Gámez Meza**, la **Dra. Maribel Ovando Martínez** y la **Dra. Denisse Serrano Palacios**, por aceptar ser parte de mi comité de tesis, por su tiempo, accesibilidad, observaciones y recomendaciones a mi trabajo, por su atención y apoyo. A todos ustedes por hacer posible la culminación de esta tesis ¡muchas gracias!

A la **Dra. María Teresa Certucha Barragán** por su accesibilidad, confianza y por toda su ayuda prestada en partes esenciales de este trabajo. También agradezco a su equipo de investigación del Laboratorio de Biorremediación del Departamento de Ingeniería Química de la UNISON por permitirme desarrollar parte de mi experimental en sus instalaciones.

A mi compañero **Crescent Fernando Berrelleza Valdéz**, por haber ayudado en gran parte del desarrollo de este trabajo, por estar presente tanto en las buenas como en las malas, por apoyarme durante toda la maestría y por creer y confiar en mí. Gracias por tu amistad.

Al **Dr. Ramón Barraza Guardado** por brindarme su espacio en el Laboratorio de Calidad Ambiental (DICTUS) y permitirme utilizar su material y equipo para el desarrollo de esta tesis, gracias por su amabilidad y accesibilidad.

A la **M. C. Ana María Pérez Villalba** por su apoyo, orientación y accesibilidad y por estar siempre pendiente de mí en el Laboratorio de Calidad Ambiental. Gracias por su confianza y comprensión.

A la **M. C. Claudia Molina Domínguez** del Laboratorio de Biotecnología de Lípidos del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, por su accesibilidad, enseñanzas y orientación para el uso adecuado del equipo del laboratorio.

A los profesores de la Maestría en Biociencias que me han brindado su conocimiento y experiencia para mi desarrollo profesional. Gracias también a todos los Doctores y personal del DICTUS que ayudaron directa o indirectamente durante el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Biociencias por estar presentes en esta etapa de mi vida y compartir buenos momentos conmigo.

RESUMEN

Un contaminante altamente tóxico de aguas y suelos cuya presencia se ha detectado en la región fronteriza de Sonora es el tricloroetileno (TCE), el cual es un compuesto halogenado sintético utilizado en las industrias de electrónicos como solvente y es conocido por causar daños a la salud humana. Un método eficiente para reducir la contaminación de este tipo de compuestos es la biorremediación por microorganismos. Bacterias nitrificantes oxidantes de amonio como *Nitrosomonas europaea* han demostrado ser capaces de degradar compuestos halogenados, incluyendo al TCE. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue aislar bacterias nitrificantes y evaluar su capacidad de degradación de TCE en un biorreactor de lecho natural empacado con zeolita a escala laboratorio. Se realizó el aislamiento y producción de un consorcio de bacterias nitrificantes a partir de una laguna aerobia para el tratamiento de aguas residuales urbanas utilizando un biorreactor de flujo continuo, proceso que permite aislar bacterias difíciles de cultivar y las bacterias del cultivo más eficientes metabólicamente a las condiciones dadas. La presencia de bacterias nitrificantes oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito fue confirmada por amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa. Se logró la fijación de las bacterias en el biorreactor de lecho empacado y se evaluó la capacidad de degradación del TCE por medio de cromatografía de gases. Las bacterias aisladas degradaron 46.7% de TCE en un sistema *batch*; mientras que las bacterias fijas en el biorreactor empacado con zeolitas degradaron 62.7%. Estos resultados muestran que las bacterias nitrificantes aisladas a partir de lodos activos para el tratamiento de aguas residuales son capaces de degradar el TCE en un sistema *batch* y que alcanzan una mayor degradación al ser fijadas en un biorreactor de lecho natural empacado a escala laboratorio. Esto sitúa al consorcio aislado como una posible alternativa para la biorremediación de TCE.

ABSTRACT

A highly toxic pollutant of water and soils that has been detected in the border region of Sonora is the trichloroethylene (TCE), which is a halogenated synthetic compound used by electronic industries as solvent that is harmful to human health. An efficient way to reduce contamination of this kind of chemical compounds is biorremediation by microorganisms. Nitrifying ammonia oxidizing bacteria as *Nitrosomonas europaea* have shown to be capable of degrade halogenated compounds, including TCE. Therefore, the aim of this study was isolate nitrifying bacteria and evaluate their capacity to degrade TCE in a natural packed-bed bioreactor at laboratory scale. The isolation and production of nitrifying bacteria was performed from an oxidation pond for the treatment of urban wastewaters using a continuous stirred tank bioreactor, process that allows the isolation of bacteria that are difficult to grow at laboratory conditions and isolate the more metabolically efficient bacteria of the culture at the given conditions. The presence of nitrifying ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) was confirmed by amplification in PCR and agarose gel electrophoresis. The fixation of the bacteria in a zeolite packed-bed bioreactor was achieved and the capacity to degradate TCE was evaluated by gas chromatography. The isolated bacteria reached a TCE removal of 46.7% in batch system and up to 62.7% when fixed in the zeolite packed-bed bioreactor. These results show that nitrifying bacteria isolated from active sludge for the treatment of urban wastewaters are capable of degradate TCE in a batch system and that they have a higher TCE removal when fixed in a packed-bed bioreactor at lab scale. This makes the isolated consortium a possible alternative for TCE biorremediation.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1 El tricloroetileno como contaminante	3
I.2 Contaminación por tricloroetileno en la región fronteriza	5
I.3 Biorremediación por microorganismos	6
I.4 Aislamiento de bacterias en biorreactores	10
I.5 Bacterias nitrificantes	11
I.5.1 Cometabolismo de nitrosomonas	12
I.5.2 Limitaciones del cultivo de nitrosomonas	13
I.6 Uso de Biorreactores de nitrificación	14
I.7 Biorreactores con biomasa inmovilizada en biopelículas	14
I.7.1 Formación de biopelículas	15
I.8 Soportes para la Inmovilización de bacterias por biopelículas	17
I.8.1 Zeolitas como soporte para la inmovilización de bacterias	17
II. JUSTIFICACIÓN	20
III. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	21
III.1 Pregunta de investigación	21
III.2 Hipótesis	21
IV. OBJETIVOS	22
IV.1 Objetivo general	22
IV.2 Objetivos específicos	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
V.1 Obtención y preparación del inóculo	23
V.1.1 Evaluación de plantas de tratamiento	23
V.1.1.1 Planta de tratamiento Los Lagos (Hermosillo, Sonora) ..	23

	Página
V.1.1.2 Planta de tratamiento sur Domos (Ciudad Obregón, Sonora)	25
V.1.2 Toma de muestras de aguas negras	27
V.1.3 Análisis de parámetros fisicoquímicos de las muestras	27
V.1.3.1 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO5)	28
V.1.3.2 Demanda química de oxígeno (DQO)	29
V.1.3.3 Sólidos	29
V.2 Diseño de biorreactor de flujo continuo para el aislamiento de bacterias nitrificantes	30
V.3 Aislamiento de bacterias nitrificantes y monitoreo del cultivo	31
V.4 Cuantificación de especies nitrogenadas en el cultivo	32
V.5 Análisis moleculares para la identificación de las bacterias aisladas	32
V.6 Diseño y construcción de biorreactor de lecho empacado	34
V.7 Experimentales de degradación de tricloroetileno	35
V.8 Evaluación de la degradación de tricloroetileno	36
V.9 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)	37
V.10 Análisis de resultados	37
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
VI.1 Análisis de parámetros fisicoquímicos de la zona aerobia de las plantas de tratamiento evaluadas	39
VI.2 Evaluación del aislamiento de las bacterias nitrificantes	41
VI.3 Análisis de la producción de biomasa en el cultivo	42
VI.4 Análisis de especies nitrogenadas en el cultivo	45
VI.5 Identificación de bacterias aisladas	48
VI.6 Diseño y construcción del biorreactor de lecho natural empacado	51
VI.7 Evaluación de la degradación de tricloroetileno	52
VI.8 Análisis por microscopía electrónica de barrido	54
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. RECOMENDACIONES	58
IX. LITERATURA CITADA	59
X. APÉNDICE 1	67
XI. APÉNDICE 2	68
XII. APÉNDICE 3	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Estructura química del tricloroetileno	3
2	Estructura básica de un quimiostato	11
3	Representación esquemática de la formación de una biopelícula,.....	16
4	Tanque aireado de la planta de tratamiento Los Lagos (Hermosillo, Sonora, México).	23
5	Ubicación geográfica de la planta de tratamiento Los Lagos en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.	24
6	Laguna de oxidación aireada de la planta de tratamiento sur Domos (Ciudad Obregón, Sonora, México).	25
7	Ubicación geográfica de la planta de tratamiento de aguas residuales Sur Domos en Ciudad Obregón, Sonora, México.	26
8	Toma de muestra de aguas negras de las plantas de tratamiento.	27
9	Estructura del biorreactor de cultivo continuo.	31
10	Estructura del biorreactor de lecho natural empacado (zeolitas).	35
11	Cambio de la turbidez del biorreactor durante el aislamiento de bacterias nitrificantes.	42
12	Curva de calibración de absorbancia y SSV del biorreactor.	43
13	Gráfica de SSV y DO del biorreactor a través del tiempo.	43
14	Gráfica de DO y UFC/mL del biorreactor a través del tiempo.	44
15	Proceso de nitrificación del biorreactor de flujo continuo a través del tiempo.	47
16	Geles de los productos de PCR de cada muestra A) Al usar los primers nxrA para las bacterias oxidantes de nitrito (NOB) (fragmentos de 322 pb) B) Al usar los primers CTO para las bacterias oxidantes de amonio (AOB) (fragmentos de 465 pb).	49
17	Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de la materia orgánica presente en (a) los lodos activos antes del aislamiento de las bacterias nitrificantes y en el soporte de zeolitas con las bacterias fijas (A) antes y (B) después del tratamiento de TCE.	56

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Límites máximos permisibles (LMP) en agua potable para los principales compuestos organoclorados utilizados en la industria.	4
2	Estudios de degradación de TCE con diferentes cultivos y biorreactores de lecho empacado.	8
3	Composición química de algunas zeolitas.	18
4	Parámetros fisicoquímicos de la zona aerobia de las plantas de tratamiento evaluadas.	40
5	Valores de las especies nitrogenadas en el biorreactor.	46
6	Porcentaje de degradación de TCE por las bacterias en sistema batch y fijas en el biorreactor de lecho empacado.	53

INTRODUCCIÓN

El tricloroetileno (TCE) es un compuesto halogenado sintético utilizado en las industrias electrónicas principalmente como disolvente, el cual puede contaminar suelos, así como agua, se ha reportado que puede resistir a la degradación ambiental y es dañino para la salud humana (ATSDR, 2015; Shukla *et al.*, 2014). En Sonora y en la región fronteriza se ha reportado contaminación por TCE en pozos de la ciudad de Nogales, Sonora (Sánchez, 1995), y se ha detectado TCE en muestras de agua y de leche materna de mujeres de Nogales, Arizona (Beamer *et al.*, 2012). A pesar de que Estados Unidos y otros países tienen límites máximos permisibles para la concentración de TCE en agua, en México aún no hay una regulación estricta para este contaminante. Debido a esto y a que la contaminación por TCE ha sido un problema que no ha sido solucionado y tiene un gran impacto ambiental, así como en la salud, es necesaria la investigación e implementación de técnicas que ayuden a tratar y remediar la contaminación de TCE en el ambiente.

La biorremediación por microorganismos es un posible método para tratar la contaminación por compuestos químicos como el TCE, ya que, por medio de enzimas específicas de su metabolismo, los microorganismos pueden degradar estos contaminantes a formas menos nocivas (Shukla *et al.*, 2014). Microorganismos como la bacteria nitrificante *Nitrosomonas europaea* han demostrado ser capaces de degradar diferentes compuestos halogenados, entre ellos el TCE (Arciero *et al.*, 1989; Vannelli *et al.*, 1990; Wahman *et al.*, 2005), y han mostrado ser incluso más eficientes que otras bacterias con la misma capacidad como algunos metanótrofos cuya actividad es inhibida en presencia de cobre (Fitch *et al.*, 1993).

Sin embargo, el cultivo de bacterias oxidantes de amonio como *Nitrosomonas* puede tener ciertas limitantes tales como su baja velocidad específica de crecimiento ($\mu=0.045/h$), con un tiempo de generación entre 10-17 horas (Reina, 1996) y el efecto inhibitorio generado por la producción de nitritos (Pérez *et al.*, 2014; Papp *et al.*, 2016). Además, este tipo de bacterias son

dificiles de aislar y cultivar en condiciones de laboratorio debido a que son autótrofos estrictos (Farges *et al.*, 2012). Para llevar a cabo el aislamiento y desarrollo de bacterias difíciles de cultivar como *Nitrosomonas*, una técnica que es posible implementar es el cultivo continuo, que ofrece la posibilidad de mantener las condiciones de crecimiento de la especie o grupo de bacterias y por ende ejerce una presión de selección constante para su aislamiento. El cultivo continuo además permite obtener las bacterias del cultivo más eficientes en obtener los nutrientes suministrados (Grigorova, 1990; Masci *et al.*, 2008).

Por otra parte, una forma de evitar la limitación del crecimiento en las bacterias es inmovilizar la biomasa en un soporte sólido (lecho empacado) permitiendo que las células mantengan su actividad y el incremento de biomasa simultáneamente (Jaime, 2010; Farges *et al.*, 2012). En el caso de la inhibición del crecimiento bacteriano por nitritos, un cultivo mixto de bacterias nitrificantes evitaría el efecto inhibitorio de los nitritos en las bacterias oxidantes de amonio, dado que las bacterias oxidantes de nitrito oxidan el nitrito a nitrato. Por lo tanto, esta tesis consistió en aislar y producir biomasa de bacterias nitrificantes a partir de lodos activos para el tratamiento de aguas residuales urbanas utilizando un biorreactor de flujo continuo, fijar las bacterias en un biorreactor de lecho empacado y evaluar la capacidad de degradación de TCE de dichas bacterias nitrificantes.

I. ANTECEDENTES

I.1 El tricloroetileno como contaminante

El TCE, cuya estructura química se muestra en la Figura 1 es uno de los compuestos organoclorados más peligrosos (Tabla 1). Es un líquido incoloro no inflamable que se usa desde la década de 1920 como disolvente, principalmente por las industrias de electrónicos para eliminar grasa de partes metálicas. No se produce de forma natural en el medio ambiente, pero se ha encontrado en fuentes de aguas subterráneas y aguas superficiales por ser liberados como desechos por las industrias. También puede encontrarse como vapor en el aire, ya que se evapora con facilidad. Al estar presente en el ambiente, es fácil que el TCE cause daños en la salud humana (Shukla *et al.*, 2014; ATCSDR, 2015).

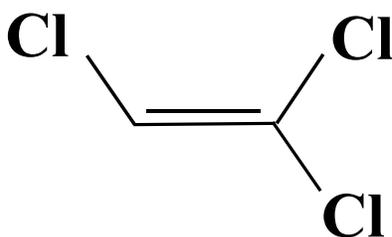


Figura 1. Estructura química del tricloroetileno.

Respirar o ingerir TCE puede alterar la función cardiaca, dañar el sistema nervioso, los riñones, el hígado, y llegar a provocar la muerte. Estudios realizados por el Programa Nacional de Toxicología en Estados Unidos de América mostraron que la exposición de TCE puede producir cáncer de hígado en ratones, cáncer de riñón en ratas, y a partir del 2015 se clasificó al TCE como “conocido por ser carcinógeno en humanos” con base a que hay suficiente evidencia científica de su carcinogenicidad en humanos (ATCSDR, 2015).

Tabla 1. Límites máximos permisibles (LMP) en agua potable para los principales compuestos organoclorados utilizados en la industria (EPA, 2009). Adaptado de Alfán-Guzmán (2010).

CONTAMINANTE	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE (mg/L)	DAÑO A LA SALUD	NOTA
Clorobenceno (CB)	0.1	Hígado y riñón	Solvente usado en industrias químicas y agroquímicas
Diclorometano (DCM)	0.005	Hígado, riñón e incrementa el riesgo de cáncer	Solvente usado en industrias químicas
Hexaclorobenceno (HCB)	0.001	Hígado, riñón e incrementa el riesgo de cáncer, reducción de capacidad reproductiva	Agroquímico (fungicida)
Tricloroetileno (TCE)	0.005	Hígado, riñón e incrementa el riesgo de cáncer	Solvente, producto de la degradación del tetracloroetileno (PCE)
Cloruro de vinilo (CV)	0.002	Incrementa el riesgo de cáncer	Usado para fabricar productos de cloruro de polivinilo (PVC). Producto de degradación del TCE.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) ha establecido un nivel de contaminación máximo para el TCE en agua potable de 0.005 mg/L. Por otra parte, la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido un límite de exposición de 100 partes de TCE por cada millón de partes de aire (100 ppm) en el trabajo durante una jornada de 8 horas diarias, 40 horas semanales (EPA, 2016). Además de ser un contaminante a tan bajas concentraciones, el TCE generalmente se resiste a la degradación ambiental por lo que se ha trabajado en el desarrollo de métodos para su control y remediación (Shukla *et al.*, 2014).

I.2 Contaminación por tricloroetileno en la región fronteriza

El rápido crecimiento industrial en la frontera entre México y Estados Unidos y la falta del manejo correcto de desechos químicos por diferentes industrias desde la década de los noventa ha incrementado la contaminación de compuestos químicos como los organoclorados en dicha región (Sánchez, 1995). Se ha reportado el manejo inadecuado de desechos industriales y su disposición en cuerpos de agua o aguas residuales municipales en ciudades mexicanas como Mexicali, Tijuana, Nogales y Matamoros (Sánchez, 1995). Sin embargo, aunque se sabe de este manejo inadecuado, en México no se han llevado a cabo muchos estudios que analicen el grado de contaminación por estos compuestos en el agua. Uno de los estudios que se ha realizado reporta concentraciones entre 0.1 µg/L y 23.5 µg/L de compuestos orgánicos volátiles (entre ellos el TCE) en los canales de drenaje hacia la Cuenca de México localizados entre la Ciudad de México y el Estado de México, siendo esta una concentración mayor a la establecida por la EPA de 5 µg/L (Hiriart, 2007).

En el caso de Tijuana, un estudio reciente examinó la concentración de contaminantes orgánicos de muestras de suelo del cañón de los Laureles en la cuenca del río Tijuana. La mayor parte del cañón está localizado en México y hay indicios de vertederos de desechos en la zona mexicana del cañón, lo cual pudiera estar relacionado con el incremento de maquiladoras en Tijuana. En este estudio, por medio de espectrometría de masas se detectaron 168 contaminantes orgánicos, pero sólo 30 pudieron identificarse por medio de la literatura. Sin embargo, entre los posibles contaminantes que los autores mencionan que pueden encontrarse en el cañón, incluyen

compuestos utilizados como solventes por las industrias de electrónicos, como lo puede ser el TCE (López-Galvéz, 2014).

En Nogales, estudios han detectado la presencia de compuestos orgánicos volátiles en muestras de agua de pozos de ambos lados de la frontera desde 1990. Más del 65% de maquiladoras en Nogales, Sonora están involucradas en la industria de electrónicos y solventes como el TCE constituyen parte importante de los desechos de este tipo de industrias, siendo la zona sur de Nogales, Sonora la zona con mayor concentración de compuestos como tricloroetano (TCA), tetracloroetileno (PCE), tricloroetileno (TCE), dicloroetileno (DCE), dicloroetano (DCA) y dicloroetileno (DCE) (Sánchez, 1995; Beamer *et al.*, 2012).

En otro estudio realizado en Nogales, Arizona se detectó TCE en muestras de leche materna de mujeres, así como en agua de grifo y agua embotellada. Dicho estudio demostró que la concentración de TCE en leche materna se correlaciona directamente con la concentración de TCE detectada del agua usada para lavado de ropa y para la ducha (Beamer *et al.*, 2012).

Aunque se ha detectado TCE en diferentes zonas de México, actualmente no hay ninguna ley que regule los límites permitidos de TCE en agua, a pesar de que desde el año 2003 se planteó un proyecto (NOM-SSA-XXX) para regular la presencia de TCE en agua doméstica siendo propuesta una concentración máxima de TCE de 70 $\mu\text{g/L}$, concentración mucho mayor a las establecidas internacionalmente (Alfán-Guzmán, 2010).

La evidente contaminación causada por este tipo de compuestos desechados principalmente por las industrias en la región fronteriza entre México y Estados Unidos hace necesaria la búsqueda de soluciones como el desarrollo de procesos para la degradación de contaminantes.

I.3 Biorremediación por microorganismos

Algunos métodos para la remediación de contaminantes involucran procesos físicos como la extracción o desfogeo en el caso de agua contaminada o diferentes procesos químicos, sin embargo, estos métodos pueden ser relativamente lentos, ineficientes, caros o incluso dañinos cuando se utilizan químicos tóxicos. Por otra parte, el uso de microorganismos para

biorremediación es otro posible método para la degradación de contaminantes ya que puede alcanzar una mineralización completa de éstos a formas menos nocivas siendo más eficiente y menos dañino para el ambiente (Pant, 2010).

La biorremediación aprovecha la actividad catabólica que tienen los microorganismos por presentar enzimas específicas para degradar diferentes compuestos. Una forma de tratar contaminantes orgánicos halogenados como el TCE por microorganismos es la deshalogenación, que es un proceso que involucra la remoción de un sustituyente halógeno de una molécula, puede llevarse a cabo por microorganismos generalmente anaerobios y es usado para el tratamiento de aguas contaminadas. Por otra parte, está el cometabolismo, proceso que suele requerir oxígeno para la degradación de compuestos clorados cuyo rendimiento no beneficia a la bacteria, ya que esta toma el carbono y energía a partir de otros sustratos. Al ser el cometabolismo un proceso que usualmente requiere oxígeno se suele presentar en microorganismos aerobios (Mohn, 1992; García-Solares *et al.*, 2013). En la Tabla 2 se presenta una recopilación de estudios llevados a cabo con diferentes microorganismos en distintos sistemas para la degradación de TCE. Por lo anterior, la investigación y obtención de microorganismos capaces de degradar compuestos contaminantes como el TCE es un reto y un foco de interés actual para la ciencia.

Tabla 2. Estudios de degradación de TCE con diferentes cultivos y biorreactores de lecho empacado.

REFERENCIA	BACTERIAS	CONDICIONES EXPERIMENTALES	CONDICIONES DEL ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	RESULTADOS DE DEGRADACIÓN DE TCE
Shukla <i>et al.</i> , 2009	Cultivo mixto de metanótrofos aislados del suelo (en ambos estudios)	1mL (OD ₆₀₀ :1.2) de bacterias fue inoculado en viales de 20 mL con medio de cultivo para después inyectar TCE en forma de gas (100 ppm). Se analizó la degradación de TCE los días 0-10 después del experimento.	Las siguientes condiciones de análisis se utilizaron en ambos estudios: CG, Varian con detector de captura de electrones (ECD) y columna capilar CP SIL 5CB (15 m x 0.25 mm)	En batch: Tasa de degradación: 0.19 ppm/h Porcentaje de degradación: 55-60% en 6 días
Shukla <i>et al.</i> , 2010b		Se usó una columna de vidrio (80 cm x 5 cm) empacada con piezas de 1 cm de carbón vegetal e inoculada con las bacterias. El TCE pasó por el biofiltro en forma de gas al ser evaporado por medio de aireación. Después se analizó el efecto de la variación en el flujo y concentración de TCE por diferentes intervalos de tiempo.	Inyector a 250 °C, horno a 70 °C y detector a 350 °C. Se usó Nitrógeno como gas acarreador (flujo de 15 mL/min).	Biofiltración (con carbón vegetal): Se alcanzó hasta el 99% de la remoción en un tiempo de 36 días al menor flujo y concentración inicial de TCE probados.
Shukla <i>et al.</i> , 2010a	Cultivo de diazotrofos aislados del suelo	Batch: 100 µL (OD ₆₀₀ :1) de bacterias fueron inoculados en viales de 25 mL con medio de cultivo para después inyectar TCE en forma de gas (100 ppm). Se analizó la degradación de TCE los días 0-10 después del experimento.	GC, Varian con detector de captura de electrones (ECD) y columna capilar CP SIL 5CB (15 m x 0.25 mm) Inyector a 250 °C, horno a 70 °C y detector a 350 °C. Se usó Nitrógeno como gas acarreador (flujo de 15 mL/min).	En batch: Tasa de degradación: 0.2 ppm/h Porcentaje de degradación: Hasta 65% en 7 días para después mantenerse estable.

Biofiltración: Mismas condiciones reportadas por (Shukla *et al.*, 2010a).

Biofiltración (con carbón vegetal): Se alcanzó más del 88% de remoción al menor flujo y concentración inicial de TCE probados en un tiempo de 36 días.

Guo *et al.*, 2001 Cultivo de *Pseudomonas putida* Se usó una columna de vidrio (60 cm x 11 cm) empacada con materiales fibrosos (100% tela de algodón) e inoculada con biomasa de *Pseudomonas putida*. Los experimentos consistieron en la recirculación de 2 L de solución de TCE (100 ppm) por 4 h, agregando H₂O₂ cada 30 min. (para mantener suficiente oxígeno disuelto) y sin agregar H₂O₂.

CG equipado con un detector de captura de electrones con el horno a 100 °C de temperatura. Se utilizó una columna capilar DB624.

Biorreactor de lecho empacado (material fibroso):

La adición de H₂O₂ permitió una degradación de TCE 60% a las 4h.

Cuando no se agregó H₂O₂ se alcanzó una degradación de hasta el 98.5% a las 4h.

García-Solares *et al.*, 2013 Cultivo de bacterias sulfurogénicas El TCE fue analizado al inyectar 250 µL de headspace de los microcosmos en un CG Perkin Elmer, Claurus 500 equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna SPB-624 con helio como gas acarreador.

60 mL de inóculo de sedimento con bacterias sulfurogénicas fueron colocados en botellas y se agregó N₂ para promover la anaerobiosis. La máxima concentración de TCE probada fue de 939 µM (aprox. 123 ppm).

En microcosmos anaerobio: Porcentaje de degradación: 90% en dos semanas.

El gradiente de temperatura del horno fue de 40 °C por 2 min. Posteriormente de 5 °C/min hasta los 100 °C, y por último hasta los 200 °C por 3 min a una tasa de 20 °C/min.

I.4 Aislamiento de bacterias en biorreactores

Para el aislamiento de bacterias a partir de muestras medioambientales, muchos estudios utilizan cultivos enriquecidos, los cuales son medios con características específicas para favorecer el crecimiento de un tipo de bacteria o una comunidad bacteriana con ciertas condiciones fisiológicas (Grigorova, 1990). Los cultivos pueden desarrollarse en biorreactores con diferentes modos de operación, donde los principales modos de operación son el cultivo discontinuo o *batch* y el cultivo continuo en quimiostato.

El cultivo *batch* es aquel al que se le agrega la carga total del medio del cultivo del proceso (lote) al biorreactor, es decir, es un sistema cerrado. Por otra parte, el cultivo continuo es aquel en el que se lleva a cabo una entrada y una salida de cultivo al mismo flujo de tal manera que la producción de biomasa sea continua (Figura 2) (Grigorova, 1990; Masci *et al.*, 2008).

Aunque el enriquecimiento en cultivo *batch* es el procedimiento más común, a menudo el uso de cultivos continuos quimiostatos pueden resultar más eficientes para seleccionar y aislar tipos específicos de bacterias. Utilizando un quimiostato se pueden seleccionar las especies deseadas, controlando la tasa de dilución y la concentración de sustrato de entrada, por lo tanto, se favorece a las especies que son más eficientes en obtener los nutrientes suministrados (Grigorova, 1990; Masci *et al.*, 2008).

El quimiostato aplica la ley de competencia que establece que si n especies que compiten son introducidas en un quimiostato, generalmente (en condiciones apropiadas) sólo una especie permanecerá en el quimiostato, mientras las otras ($n-1$) no. La especie que permanece en el quimiostato es la que puede crecer a una tasa constante con una pequeña cantidad de nutrientes limitantes (Masci *et al.*, 2008). A diferencia del cultivo discontinuo, los quimiostatos ofrecen la posibilidad de mantener las condiciones de crecimiento y por ende una presión de selección constante por periodos de tiempo prolongados (Grigorova, 1990).

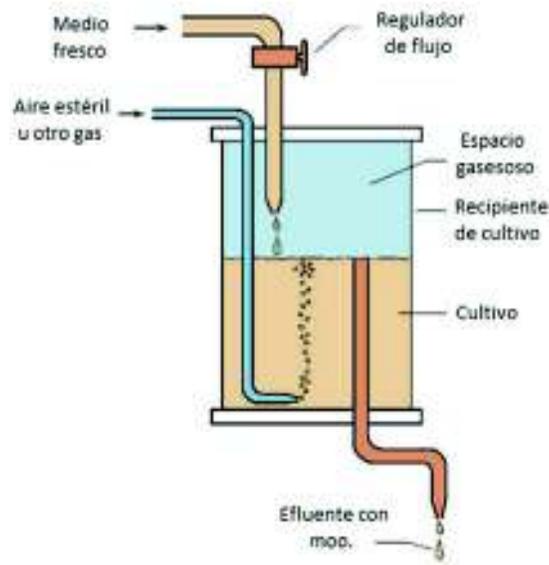


Figura 2. Estructura básica de un quimiostato. Adaptado de Sánchez (s.f).

El empleo del cultivo continuo para el estudio de bacterias se ha llevado a cabo por diferentes autores en bacterias de la familia Enterobacteriaceae aisladas de agua de mar (Holger, 1968), bacterias oxidantes de amonio aisladas de suelo (Bollman *et al.*, 2001) y bacterias reductoras de nitrato aisladas de sedimentos estuarinos en biorreactores anaerobios (Ogilvie *et al.*, 1997). Esta técnica puede ser útil especialmente para el aislamiento y desarrollo de bacterias difíciles de cultivar en condiciones de laboratorio tal como las presentes en muestras ambientales o con nutrición autótrofa estricta como las bacterias nitrificantes.

I.5 Bacterias nitrificantes

Las bacterias nitrificantes son microorganismos importantes en el ciclo del nitrógeno, las cuales intervienen en el proceso de nitrificación. Éstas pueden dividirse en nitrificantes autótrofas y heterótrofas según la forma de obtener energía para su crecimiento. Las bacterias nitrificantes autótrofas consiguen su energía a partir de la oxidación de compuestos nitrogenados inorgánicos y generalmente utilizan CO_2 como fuente de carbono. *Nitrobacteriaceae* es una de las familias de bacterias más importantes en la nitrificación y se compone de géneros de bacterias Gram

negativas oxidantes de amonio u oxidantes de nitrito, como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* respectivamente (Farges *et al.*, 2012).

Nitrosomonas transforma el amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) para obtener energía a partir de esta oxidación. Este género se encuentra abundantemente distribuido en suelos, agua y especialmente en áreas que contienen altos niveles de compuestos nitrogenados. El pH óptimo para el crecimiento de estas bacterias es entre 6 y 9, pueden crecer a una temperatura entre 20 y 30 °C, y al ser fotofóbicas generan biopelículas para evitar la luz. Sus membranas usan los electrones de la oxidación del amonio para fijar el carbono gaseoso a moléculas orgánicas y así producir biomasa (Vannelli *et al.*, 1990; Holt, 1993; Farges *et al.*, 2012).

De forma opuesta, el género *Nitrobacter* oxida nitritos (NO_2^-) a nitratos (NO_3^-) para obtener energía. Se encuentra principalmente en suelos y puede crecer de forma óptima alrededor de 28 °C y un pH entre 5.8-8.5 (Holt, 1993; Farges *et al.*, 2012).

1.5.1 Cometabolismo de *nitrosomonas*

El término cometabolismo ha sido foco de discusión desde la década de los setenta, sin embargo, puede definirse como la transformación de un compuesto llamado cosustrato, en presencia o ausencia de un sustrato. El sustrato actúa como donador de electrones que proporciona poder reductor y energía para la célula, mientras que el cosustrato no aporta energía o carbono (Perry, 1979). El cometabolismo de las bacterias es ampliamente utilizado en procesos de biorremediación de compuestos xenobióticos (García-Rivero y Peralta-Pérez, 2008).

Las bacterias *Nitrosomonas* oxidan el amoniaco (sustrato) a hidroxilamina por la enzima *amonio monooxigenasa* que está asociada a las proteínas de membrana. Posteriormente oxidan la hidroxilamina a nitrito por *hidroxilamina oxidoreductasa*, localizada en el espacio periplasmático. La reacción requiere oxígeno y una fuente de poder reductor (Farges *et al.*, 2012). Estos pasos se muestran en la siguiente reacción:



De la misma la enzima *amonio monooxigenasa* puede catalizar la oxidación de compuestos como metano, metanol, etileno, propileno y tricloroetileno, siendo estos los cosustratos en el cometabolismo de la bacteria (Arciero *et al.*, 1989; Vannelli *et al.*, 1990; Wahman *et al.*, 2005; Farges *et al.*, 2012). Se ha reportado que *Nitrosomonas europaea* puede degradar diferentes concentraciones (50-800 µg/L) de trihalometanos (Wahman *et al.*, 2005) y que puede degradar progresivamente el TCE a una tasa de degradación de 2-30 µM/h/g de biomasa (Vannelli *et al.*, 1990), o degradar 10 µM de TCE completamente a una tasa de 1 µM/mg de proteína (Arciero *et al.*, 1989).

I.5.2 Limitaciones del cultivo de *nitrosomonas*

A pesar de ser abundantes en el medio ambiente, las bacterias *Nitrosomonas* son difíciles de cultivar ya que presentan ciertas limitaciones, entre ellas su menor velocidad de crecimiento en comparación con las bacterias heterótrofas (Wijffels y Tramper, 1995; Farges *et al.*, 2012). Además, en medios discontinuos, *Nitrosomonas* por su metabolismo disminuye el pH y la cantidad de amoníaco disponible en el medio. A pesar de que la disminución del pH puede ser controlada, el nitrito, el cual es el principal metabolito inhibitorio se sigue acumulando (Papp *et al.*, 2016). En cambio, en la naturaleza o en cultivos mixtos, como las bacterias oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito se encuentran juntas, la acumulación de nitrito es rara y no se produce esta inhibición (Farges *et al.*, 2012).

Lo anterior se demuestra en el estudio de Pérez *et al* (2015), donde mediante observaciones microscópicas de un cultivo mixto de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi* mostraron que *N. europaea* contribuyó al 80% del crecimiento bacteriano en el cultivo y *N. winogradskyi* al 20% restante. Conjuntamente análisis transcriptómicos revelaron que en el cultivo mixto *N. europaea* se beneficia más que *N. winogradskyi* (su crecimiento no es inhibido).

Por lo tanto, para combatir estas limitantes en el cultivo de *Nitrosomonas* en condiciones de laboratorio, el cocultivo de ambas bacterias y/o técnicas de inmovilización pueden ser aplicadas (Wijffels y Tramper, 1995).

I.6 Uso de biorreactores de nitrificación

El proceso de nitrificación se ha llevado a cabo en diferentes sistemas, principalmente en biorreactores con biomasa en suspensión y sistemas con biomasa inmovilizada (Farges *et al.*, 2012). Generalmente estos sistemas se usan en el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de compuestos nitrogenados (Wijffels y Tramper, 1995; Hill y Khan, 2008), ya que el tratamiento biológico suele ser más económico que los procesos fisicoquímicos. Otra actividad en la que se aplica el proceso de nitrificación es la acuicultura, donde se han usado bacterias nitrificantes para la eliminación de productos nitrogenados como el amoníaco el cual tiene un efecto tóxico en crustáceos y peces (Seo *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2008). El potencial de estas bacterias para la degradación de diferentes compuestos puede ser utilizado para otras aplicaciones como la biorremediación de compuestos químicos contaminantes.

En los sistemas de biomasa en suspensión (bacterias nitrificantes) se usan biorreactores aireados con grandes tiempos de residencia. En los sistemas con biomasa inmovilizada los microorganismos responsables de la nitrificación se fijan en algún tipo de soporte, permitiendo un tiempo de residencia menor, una mayor actividad enzimática y por lo tanto una nitrificación más rápida (Farges *et al.*, 2012).

Al inmovilizar bacterias de lento crecimiento en un soporte sólido en biorreactores de flujo continuo, la concentración de biomasa no se ve limitada (Wijffels y Tramper, 1995; Cohen 2001), como en el caso del sistema de biomasa suspendida, por lo que hay un aumento en la actividad metabólica de las bacterias (Cohen 2001; Farges *et al.*, 2012). Otras ventajas pueden ser el aumento de la tolerancia de las bacterias a condiciones adversas como la disminución de la temperatura o la presencia de agentes inhibitorios (Wijffels y Tramper, 1995; Cohen 2001; Seo *et al.*, 2001).

I.7 Biorreactores con biomasa inmovilizada en biopelículas

La inmovilización puede llevarse a cabo de forma natural por la formación de biopelículas por las propias bacterias o de forma artificial, siendo el primer método más simple (Farges *et al.*, 2012). Uno de los métodos más usados para la inmovilización de células nitrificantes o

desnitrificantes de forma artificial es la captura de las bacterias en perlas poliméricas naturales (alginato o carragenato) o artificiales (de alcohol polivinílico, poliacrilamida o poliuretano) formadas por una mezcla de células y una suspensión en gel que posteriormente se gelifica (Seo *et al.*, 2001).

En el caso de los biorreactores de biomasa inmovilizada en biopelículas, podemos mencionar a los biorreactores de lecho fluidizado y a los biorreactores de lecho empacado. Los biorreactores con biomasa inmovilizada pueden usarse como biofiltros para los contaminantes ya que éstos pueden ser absorbidos por la biopelícula formada, sin embargo, la biodegradación es el método más común para el tratamiento de los contaminantes. En ambos biorreactores se suelen usar partículas pequeñas para aumentar el área específica y que las bacterias se adhieran naturalmente para formar las biopelículas (Singh *et al.*, 2006; Farges *et al.*, 2012).

I.7.1 Formación de biopelículas

Las biopelículas o *biofilms* son conglomeraciones de una o múltiples poblaciones de microorganismos que se adhieren a superficies bióticas o abióticas a través de sustancias poliméricas extracelulares (Wimpenny *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2006). Es decir, los microorganismos se encuentran naturalmente formando agregados en superficies debido a las sustancias que secretan.

Las biopelículas están formadas mayormente por agua o algún solvente y las células microbianas, pero además contienen sustancias poliméricas extracelulares, nutrientes o metabolitos y productos de la lisis celular y partículas o detritos del ambiente. En la composición de una biopelícula se puede encontrar peptidoglucano, lípidos, fosfolípidos y macromoléculas. (Wimpenny *et al.*, 2000; Sutherland, 2001).

La formación de las biopelículas es resultado de una combinación de factores, entre ellos factores ambientales como el pH, la disponibilidad de nutrientes y la estructura del soporte (para el transporte y difusión de sustratos y células al soporte), además de factores dependientes a la fisiología de la bacteria (crecimiento, consumo de sustrato, propiedades de su superficie celular que permitan la adhesión, etc.) (Wijffels y Tramper, 1995; Singh *et al.*, 2006).

El proceso de la formación de las biopelículas (Figura 3) empieza con la adhesión inicial y establecimiento, maduración y finalmente la separación. En la adhesión inicial los primeros microorganismos se adhieren directamente al soporte, éste proceso puede seguir produciéndose si el soporte aún dispone de superficie libre, después otros microorganismos se pueden unir a los ya adheridos (Singh *et al.*, 2006; Farges *et al.*, 2012).

La adhesión inicial o adsorción puede producirse debido a interacciones químicas (enlaces covalentes o iónicos) o físicas (puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals) o por la secreción de sustancias poliméricas extracelulares para formar una monocapa. Después, las células proliferan en esta monocapa y otros microorganismos se adhieren para formar una biopelícula activa y la biomasa se acumula a través del tiempo. Por último, cuando la biopelícula se ha desarrollado plenamente se genera un desprendimiento celular cuya velocidad es igual a la de la formación de biomasa (Singh *et al.*, 2006; Farges *et al.*, 2012).

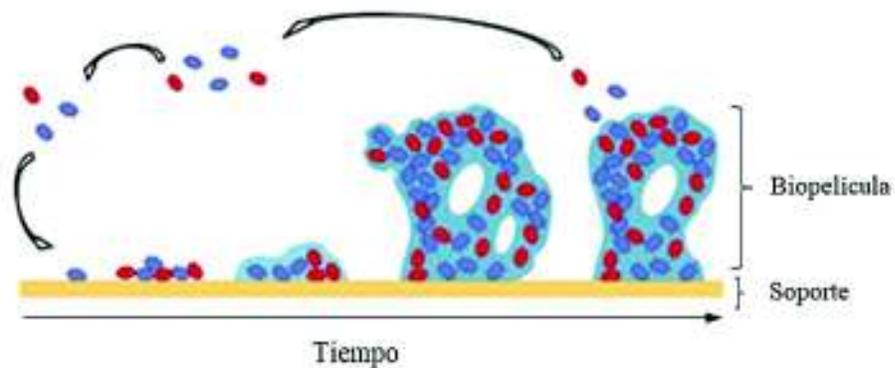


Figura 3. Representación esquemática de la formación de una biopelícula. Adaptado de VISAVET (2010).

I.8 Soportes para la inmovilización de bacterias por biopelículas

En la actualidad hay gran variedad de materiales que pueden ser utilizados como lechos o soportes para la formación de biopelículas, y generalmente su modo de uso es más simple y más económico que los materiales usados por métodos de inclusión artificial. Algunas de las características que se buscan en estos materiales son su porosidad, resistencia, estructura y costo (Cohen, 2001; Farges *et al.*, 2012).

Se han usado ampliamente polímeros sintéticos para la inmovilización de células por biopelículas, entre ellos polietileno, poliestireno y poliuretano. Específicamente para bacterias nitrificantes oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito se han utilizado biorreactores con esferas de poliestireno y polietileno de baja densidad (Kumar *et al.*, 2008; Montras *et al.*, 2008).

Materiales de origen natural también pueden ser utilizados por ser resistentes, inertes, termoestables e incluso biodegradables. Un ejemplo de materiales inorgánicos de origen natural son las rocas o los minerales altamente porosos. Los poros son espacios que permiten que los microorganismos se adhieran y crezcan mientras el fluido se mueve a cierto flujo por el soporte (Cohen, 2001; Kumar *et al.*, 2008).

I.8.1 Zeolitas como soporte para la inmovilización de bacterias

Las zeolitas son minerales aluminosilicatos cristalinos microporosos que están compuestos por tetraedros formados por un catión que puede ser silicio o aluminio y cuatro átomos de oxígeno: $[\text{SiO}_4]^{4-}$ y $[\text{AlO}_4]^{5-}$. Existen muchos tipos de zeolita que varían en su composición química (Tabla 3), y se encuentran distribuidas mundialmente tanto en rocas sedimentarias como en volcánicas y metamórficas (Monge-Amaya *et al.*, 2008; Oostroumov *et al.*, 2012).

Las zeolitas tienen una gran aplicación en la industria debido a su afinidad al agua (pueden hidratarse o deshidratarse reversiblemente) y por su gran porosidad. Han sido utilizadas como catalizadores en procesos químicos industriales, como aditivos en alimento animal y en agricultura como mejoradores de la calidad del suelo, ya que además tienen la capacidad de retener compuestos nitrogenados (Wang y Peng, 2010; Hernández *et al.*, 2013).

Tabla 3. Composición química de algunas zeolitas (Wang y Peng, 2010).

ZEOLITA	COMPOSICIÓN QUÍMICA
Clinoptiolita	$(K_2, Na_2, Ca)_3Al_6Si_{30}O_{72} \cdot 21H_2O$
Chabacita	$(Na_2, Ca)_4Al_8Si_{40}O_{96} \cdot 28H_2O$
Mordenita	$(Ca, Na_2, K_2)_2Al_4Si_8O_{24} \cdot 12H_2O$
Phillipsita	$K_2(Ca, Na_2)_2Al_8Si_{10}O_{32} \cdot 12H_2O$
Escolecita	$Ca_4Al_8Si_{12}O_{40} \cdot 12H_2O$
Estilbita	$Na_2Ca_4Al_{10}Si_{26}O_{72} \cdot 30H_2O$
Analcima	$Na_{16}Al_{16}Si_{16}O_{96} \cdot 16H_2O$
Laumontita	$Ca_4Al_8Si_{12}O_{48} \cdot 16H_2O$
Erionita	$(Na_2K_2MgCa_{1.5})_4Al_8Si_{28}O_{72} \cdot 28H_2O$
Ferrierita	$(Na_2, K_2, Ca, Mg)_3Al_6Si_{30}O_{72} \cdot 20H_2O$

México es uno de los países que cuenta con yacimientos naturales de zeolitas, se ha reportado su presencia en el sur y norte de la ciudad de Oaxaca y en el estado de Michoacán por el Eje volcánico Transversal Mexicano, siendo la clinoptiolita una de las más comunes (Oostroumov *et al.*, 2012).

La clinoptiolita es una zeolita formada a partir de cenizas volcánicas en lagos o aguas marinas desde hace millones de años (Oostroumov *et al.*, 2012). Es una de las zeolitas más estudiadas que se conoce como absorbente de gases tóxicos como el sulfito de hidrógeno y el dióxido de azufre (Monge-Amaya *et al.*, 2008). En estudios recientes, la clinoptiolita ha mostrado ser útil para la inmovilización de bacterias aerobias y anaerobias en procesos de biorremediación principalmente de metales pesados como el cobre (Monge-Amaya *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2013; Figueroa-Torres *et al.*, 2016).

Por otra parte, la chabacita es una zeolita menos abundante, encontrándose especialmente en la Península Itálica y por lo tanto ha sido menos estudiada (Ferretti *et al.*, 2018). Muestra las propiedades generales de las zeolitas y ha sido usada para la inmovilización de bacterias en conjunto con otras zeolitas, como por ejemplo en biorreactores *batch* para la oxidación de arsénico (AS[III]) (Lièvreumont *et al.*, 2003).

En la presente tesis se usó un biorreactor de lecho empacado con una mezcla de las zeolitas antes mencionadas (Chabasita/Clinoptiolita) para la fijación o inmovilización de un consorcio de bacterias nitrificantes, con el fin de que éstas colonizaran las zeolitas y aumentaran su biomasa y por ende su actividad metabólica (lo cual se ve limitado en sistemas de biomasa suspendida) para después evaluar en el biorreactor la degradación de TCE por las bacterias.

II. JUSTIFICACIÓN

El TCE se ha encontrado en más de 852 de los 1,430 sitios de la Lista de Prioridades Nacionales identificados por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (ATSDR, 2015). En México se ha detectado en la Cuenca de México localizada entre la Ciudad de México y el Estado de México y en Sonora y la región fronteriza se ha reportado que existe contaminación por TCE en el acuífero, y en pozos de Nogales de ambos lados de la frontera desde la década de los noventa, siendo esto atribuido a que es una de las zonas con mayor número de industrias y maquiladoras del país (Sánchez, 1995).

Particularmente en México y Estados Unidos, la contaminación causada en mantos acuíferos por diferentes compuestos desechados por las industrias hace necesario el desarrollo de procesos para la degradación de contaminantes y preferentemente bajos en costos. El uso de microorganismos es un posible método para la degradación de compuestos contaminantes como el TCE, especialmente por bacterias del género *Nitrosomonas* como *N. europaea* que ha demostrado la capacidad de degradar diferentes compuestos halogenados (Arciero *et al.*, 1989; Vannelli *et al.*, 1990; Wahman *et al.* 2005). Sin embargo, el cultivo de microorganismos del género *Nitrosomonas* puede tener ciertas limitantes relacionadas al óptimo crecimiento bacteriano y al efecto inhibitorio generado por la producción de nitritos (Pérez *et al.*, 2014; Papp *et al.*, 2016).

Por lo tanto, para eliminar estas limitantes y lograr una eficiente degradación de TCE, el objetivo general de esta tesis fue aislar un consorcio de bacterias nitrificantes a partir de lodos activos para el tratamiento de aguas residuales urbanas utilizando un biorreactor de cultivo continuo, producir biomasa de estas bacterias y fijarla en un biorreactor de lecho empacado con zeolitas para aumentar su biomasa y actividad y finalmente evaluar su capacidad de degradación de TCE en el biorreactor de lecho empacado.

III. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

III.1 Pregunta de Investigación

¿La biomasa de bacterias oxidantes de amonio (AOB) producida al aislar por medio de cultivo continuo un consorcio de bacterias nitrificantes a partir de lodos activos para el tratamiento de aguas residuales urbanas, será capaz de degradar tricloroetileno en un biorreactor de lecho empacado?

III.2 Hipótesis

Al aislar por medio de cultivo continuo un consorcio de bacterias nitrificantes a partir de lodos activos para el tratamiento de aguas residuales urbanas, será posible desarrollar biomasa de bacterias oxidantes de amonio (AOB) capaz de degradar tricloroetileno en un biorreactor de lecho empacado.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

- Desarrollar biomasa de bacterias nitrificantes y evaluar su capacidad de degradación de tricloroetileno en un biorreactor de lecho natural empacado.

IV.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la zona aerobia de dos plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas como fuentes de inóculo para el aislamiento de bacterias.
- Desarrollar bacterias nitrificantes a partir de aguas residuales urbanas.
- Diseñar un biorreactor de lecho natural empacado con la biomasa de bacterias nitrificantes producida para evaluar su capacidad de degradación de tricloroetileno.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Obtención y preparación del inóculo

V.1.1 Evaluación de plantas de tratamiento

V.1.1.1 Planta de tratamiento Los Lagos (Hermosillo, Sonora)

La planta de tratamiento Los Lagos está ubicada en el fraccionamiento Los Lagos en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México (Figura 5). Es una planta usada para riego de áreas verdes y almacenamiento en lagos y utiliza la tecnología de lodos activados en la modalidad de aireación extendida. La planta trata diariamente de 3,785,400 - 4,921,020 L de aguas residuales urbanas de la zona norte de la ciudad por medio de diferentes tanques: tanque aireado por una red de difusores de membrana de 3,235,262 L (Figura 4), tanque anóxico de 559,294 L, tanque de reaireación de 403,007 L y un tanque sedimentador. Su tiempo de retención de sólidos (TRS) es de 5 h y su tiempo de retención hidráulico (TRH) es de 33 h.



Figura 4. Tanque aireado de la planta de tratamiento Los Lagos (Hermosillo, Sonora, México).



Figura 5. Ubicación geográfica de la planta de tratamiento Los Lagos en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.

V.1.1.2 Planta de tratamiento sur Domos (Ciudad Obregón, Sonora)

La planta de tratamiento sur Domos está ubicada entre la calle Kino y la avenida 400 en la ciudad Obregón, Sonora (Figura 7). Tiene una extensión de 13 hectáreas (0.13 km²) y trata diariamente alrededor de 63,504,000 L de aguas residuales urbanas de la zona sur de la ciudad. Utiliza un proceso que consta de un pretratamiento para la separación de los sólidos grandes por rejillas y un tratamiento por medio de lagunas de oxidación: primeramente, el agua residual pasa por una laguna aireada con aireadores mecánicos superficiales (Figura 6), después por una laguna facultativa y por último una laguna de sedimentación y un proceso de desinfección por cloración. El tiempo de retención hidráulico de la planta es de 24 h.

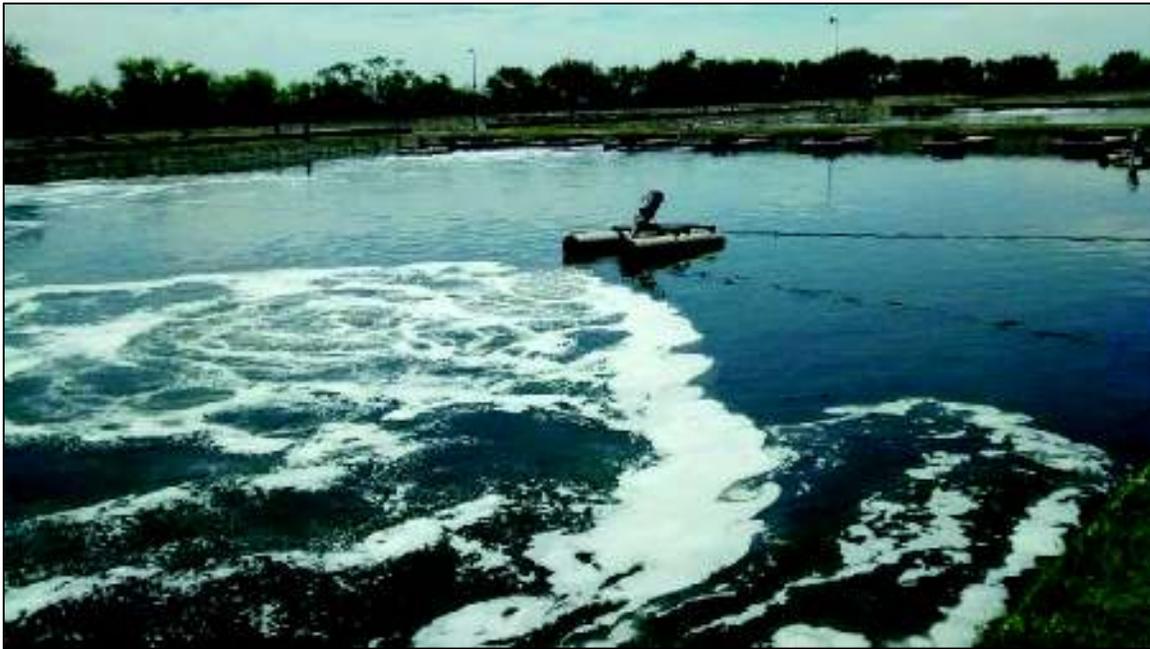


Figura 6. Laguna de oxidación aireada de la planta de tratamiento sur Domos (Ciudad Obregón, Sonora, México).

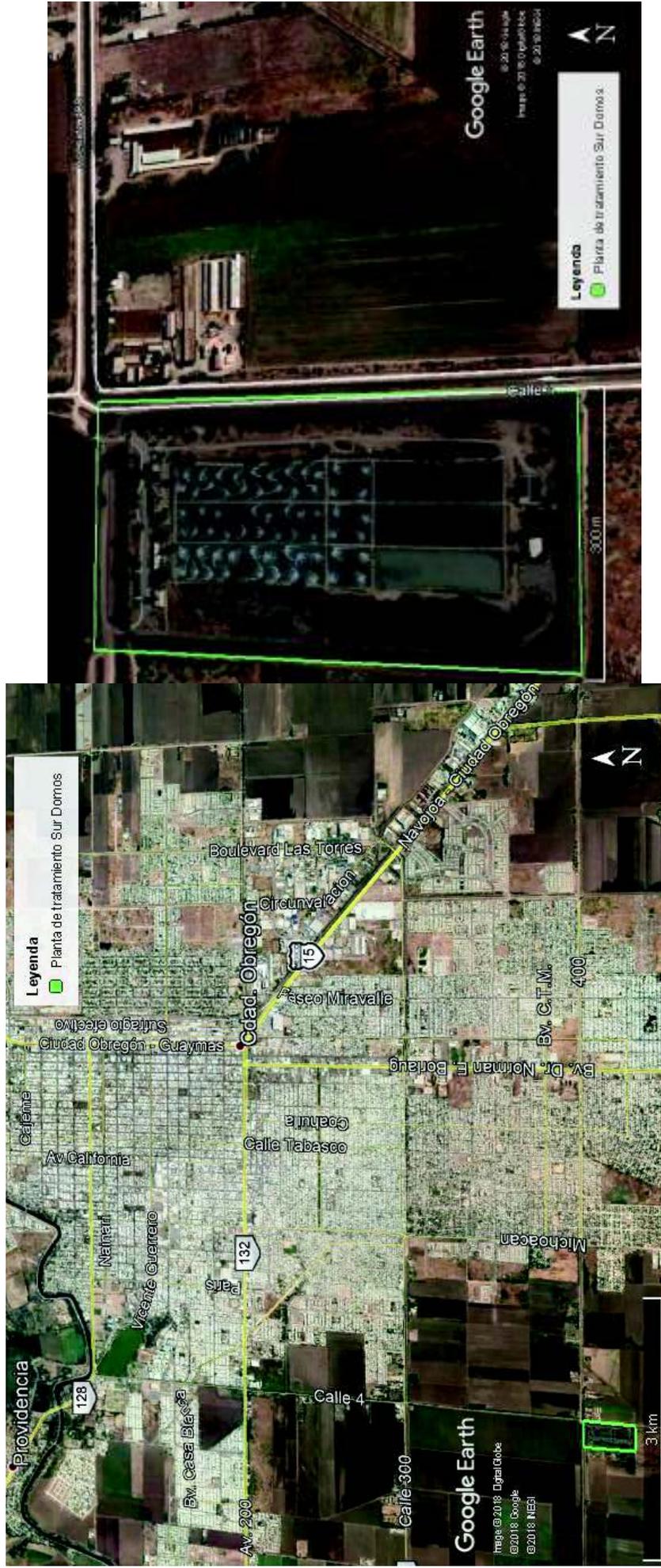


Figura 7. Ubicación geográfica de la planta de tratamiento de aguas residuales Sur Doms en Ciudad Obregón, Sonora, México.

V.1.2 Toma de muestras de aguas negras

Se tomó muestra de los tanques aerobios de las dos plantas de tratamiento por medio de procedimientos básicos de laboratorio para la recolección de muestras. Se utilizaron envases limpios de plástico polipropileno y se tomó la muestra de lodos activos de la parte superior del tanque aerobio o la laguna de oxidación aerobia (Figura 8). Los envases se llenaron hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad para permitir su agitación (manual) y se transportaron al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora usando una hielera (a una temperatura entre 4 y 10 °C) para su inmediata utilización.



Figura 8. Toma de muestra de aguas negras de las plantas de tratamiento.

V.1.3 Análisis de parámetros fisicoquímicos de las muestras

Por medio de demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), demanda química de oxígeno (DQO) y sólidos se evaluó la carga bacteriana de la zona aerobia de las dos plantas de tratamiento para determinar la mejor fuente de inóculo para el aislamiento de las bacterias. Se siguieron los procedimientos descritos en las secciones V.1.3.1, V.1.3.2 y V.1.3.3. Los valores de los parámetros de cada planta se compararon mediante una prueba t con $\alpha=0.05$.

V.1.3.1 Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅)

La demanda bioquímica de oxígeno mide el oxígeno molecular utilizado por las bacterias en la degradación de material orgánico e inorgánico durante un periodo específico de incubación, es un parámetro utilizado para determinar la carga bacteriana de plantas de tratamiento y evaluar su eficiencia de remoción (APHA, 2001). Para determinar la demanda bioquímica de oxígeno se siguió el método 5210 B. de Standard Methods For Examination of Water and Wastewater (APHA, 2001).

Para esto se colocaron 200 mL de agua de dilución (1L de agua destilada que contiene 1 mL de buffer fosfato, y 1 mL de soluciones de sulfato de magnesio, cloruro de calcio y cloruro de hierro) previamente oxigenada, en 100 mL de muestra en frascos de DBO. En una de las botellas se determinó la concentración inicial de oxígeno, otra botella se colocó en una incubadora a 18 ° C durante 5 días para después determinar la concentración de oxígeno tras ese periodo de tiempo (APHA, 2001). Las determinaciones de DBO₅ se realizaron por triplicado.

La determinación de oxígeno inicial y final fue determinada por la técnica de Winkler (modificada a la ázida de sodio) de acuerdo con el procedimiento de la Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001. Para esto primeramente se colocaron 2 mL de sulfato de manganeso y 2 mL de álcali yoduro en el frasco de DBO con la muestra (la muestra se torna de color blanco a café dependiendo de la concentración de oxígeno), después se agregaron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y la muestra se dividió en tres submuestras de 100 mL en matraces Erlenmeyer para agregar tres gotas de solución de almidón el cual ayuda a detectar visualmente el punto final de la titulación. Finalmente se tituló cada submuestra con tiosulfato de sodio hasta el punto de inflexión y se calculó el oxígeno disuelto dependiendo de los mL de tiosulfato gastados. La DBO₅ se calculó restando la concentración de oxígeno inicial menos la final y dividiendo el resultado entre el % de dilución realizado.

V.1.3.2 Demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno es la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar el material orgánico presente en una muestra. Al igual que la demanda bioquímica de oxígeno, es un parámetro importante para saber la eficiencia de remoción de una planta de tratamiento, ya que indica la cantidad de materia orgánica presente (APHA, 2001).

La demanda química de oxígeno fue determinada por el método 5220 B de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) de Standard Methods For Examination of Water and Wastewater (APHA, 2001). El fundamento de este método es que la mayor parte de la materia orgánica se oxida en una solución digestora (mezcla de dicromato y ácido sulfúrico con iones plata como catalizador). Para esto se realizó un reflujo o digestión de 1 mL de muestra en 3 mL de solución digestora durante 2 horas a 150 °C en un digestor HACH DRB 200. Después de la digestión, el cromo (VI) pasa al estado de oxidación Cromo (III) (se reduce) oxidando la materia orgánica y el dicromato no reducido se determina por medio de colorimetría. La diferencia entre la absorbancia de una muestra digerida y un blanco es una medida de DQO. La determinación de la absorbancia se realizó en un colorímetro HACH (Loveland, USA).

V.1.3.3 Sólidos

Se determinaron los Sólidos Totales (ST), Sólidos Totales Fijos (STF), Sólidos Totales Volátiles (STV), Sólidos Suspendidos Totales (SST), Sólidos Suspendidos Fijos (SSF) y Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) de acuerdo al procedimiento de la Norma Mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015. Los sólidos totales (ST) incluyen la materia orgánica e inorgánica total de las muestras después de evaporar y secar a una temperatura de 105 °C ± 2 °C en una cápsula de porcelana y los sólidos suspendidos totales (SST) son los sólidos sedimentables, suspendidos y coloidales retenidos por un filtro de fibra de vidrio en un crisol después de secar a 105 °C ± 2 °C, para esto se usaron filtros Whatman 934AH (Maidstone, UK) con poro de 1.5 µm. Los sólidos volátiles son los sólidos de los sólidos totales o sólidos suspendidos que son volatilizados por el efecto de la calcinación a 550 °C, es decir, corresponde a la materia orgánica. Por otra

parte, los sólidos fijos son los sólidos que permanecen después de la calcinación, es decir, la materia orgánica.

V.2 Diseño de biorreactor de flujo continuo para el aislamiento de bacterias nitrificantes

El aislamiento de las bacterias se llevó a cabo por medio un biorreactor de flujo continuo mediante el uso de un matraz bola de 2 L de tres bocas con un termómetro en la boca central, en una de las bocas laterales una entrada de aire suministrado por una bomba de aire (1500 cc/min a 3.0 PSI) y un influente de medio de cultivo suministrado por una bomba de flujo Econo Pump BIORAD (Hercules, USA) y en la otra boca lateral un efluente. La estructura del biorreactor se muestra en la Figura 9.

Para el aislamiento de bacterias semejantes a *Nitrosomonas europaea* se inocularon en el biorreactor 1.4 L de la muestra de lodos activos tomada de la planta de tratamiento seleccionada y se alimentó un medio de cultivo de sales (Apéndice 1) donde el sulfato de amonio es la fuente de energía, mientras el carbonato de sodio es la fuente de carbono. El flujo fue ajustado a 1 mL/min para que la tasa de dilución (F/V) fuera menor que la velocidad de crecimiento máxima (μ_{max}) de 0.045 / h reportado por Reina (1996) para *N. europaea* a 30°C y pH 8 ± 0.2 , de tal manera que el consorcio aislado fueran bacterias oxidantes de amonio con características de cultivo similares a *N. europaea* y bacterias oxidantes de nitrito como *Nitrobacter* que crecen por la producción de nitritos de las bacterias oxidantes de amonio. El pH del biorreactor se monitoreó con un potenciómetro pH 211 HANNA (Woonsocket, USA) tomando muestras directamente del biorreactor con una pipeta estéril y se mantuvo en 8 ± 0.2 agregando NaOH 6M y la temperatura se mantuvo en 30 °C utilizando una chaqueta de calentamiento (Lapara *et al.*, 2000; Bollman *et al.*, 2001).

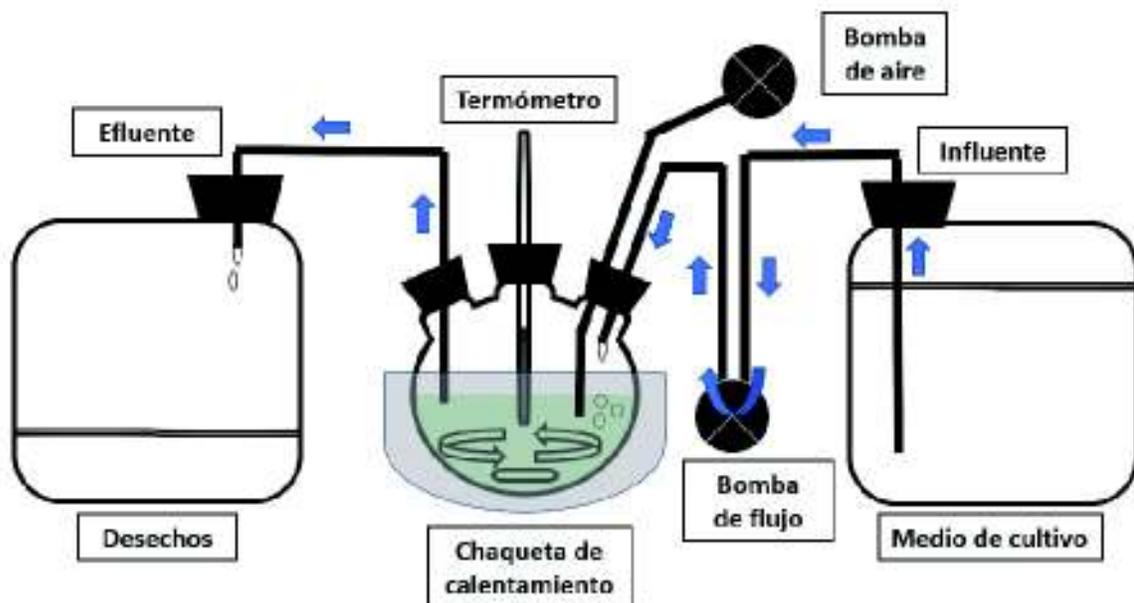


Figura 9. Estructura del biorreactor de cultivo continuo.

V.3 Aislamiento de bacterias nitrificantes y monitoreo del cultivo

Para determinar la salida de materia (presente en la muestra inicial de lodos activos) del biorreactor de cultivo continuo y la salida del resto de bacterias (*washing-out*) durante el aislamiento de las bacterias nitrificantes se midió la turbidez del cultivo tomando una muestra de éste y por medio de un turbidímetro Hellige 12620 (Parkland, USA) en una celda de vidrio de 50 mm (8010-50), sin el filtro del turbidímetro y con la ventana del turbidímetro cerrada.

Después del aislamiento, el biorreactor de flujo continuo se cambió a *batch* (discontinuo), es decir se empezó a agregar medio de cultivo por lote semanalmente y no de forma continua. Posteriormente, con la biomasa aislada se inoculó un segundo biorreactor *batch* de respaldo con un volumen de 700 mL y se mantuvo a las mismas condiciones del biorreactor inicial. Para obtener biomasa adicional se tomó biomasa del biorreactor inicial, se centrifugó y se resuspendió en 100 mL de medio de cultivo para inocular matraces de 250 mL que fueron mantenidos en agitación (150 rpm) a 30°C en una incubadora New Brunswick (New Jersey, USA).

El monitoreo de la producción de biomasa en el cultivo del biorreactor después del aislamiento se llevó a cabo determinando la concentración de microorganismos a lo largo del tiempo por medio de análisis de sólidos suspendidos volátiles en filtros Whatman 934AH (Maidstone, UK) con poro de 1.5 μm y medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro HACH DR5000 (Loveland, USA). Además, se realizó una curva que relaciona ambas variables (Reina, 1996; Pérez *et al.*, 2014; Papp *et al.*, 2016). También se determinó la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL por medio de los estándares de McFarland (McFarland, 1907).

V.4 Cuantificación de especies nitrogenadas en el cultivo

Se realizaron análisis de especies nitrogenadas para determinar el consumo de amoníaco ($\text{NH}_3\text{-N}$) y su transformación a nitrito ($\text{NO}_2\text{-N}$) por las bacterias oxidantes de amonio (AOB) y el consumo de nitrito y su transformación a nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) por las bacterias oxidantes de nitrito por medio de colorimetría en un espectrofotómetro HACH DR5000 (Loveland, USA) utilizando los reactivos HACH: Nitriver 5 para nitrato (por el método 8039 de reducción de cadmio), Nitriver 2 para nitrito (por el método 8153 de sulfato ferroso) y el set de nitrógeno amoniacal (por el método 8155 de salicilato). Para esto primeramente la muestra fue centrifugada en una centrífuga DYNAC 420101 (Sparks, USA) a 2,000 RPM por 10 min. para su precipitación y se usaron los sobrenadantes para los análisis (Farges *et al.*, 2012). Además, se obtuvieron los rendimientos de conversión (molar) de NH_3 ($Y_{\text{NH}_3/\text{NO}_2}$) y NO_2 ($Y_{\text{NO}_2/\text{NO}_3}$) con la pendiente de la línea de tendencia resultante al graficar el consumo de amoníaco contra la producción de nitrito y la pendiente al graficar el consumo de nitrito y la producción de nitrato, respectivamente.

V.5 Análisis moleculares para la identificación de las bacterias aisladas

El ADN genómico de la muestra inicial de lodos activos tomada de la planta de tratamiento y las muestras a distintos tiempos del funcionamiento del biorreactor (al momento del aislamiento

y durante la producción de biomasa) fue extraído con el kit FastDNA[®] SPIN Kit for Soil MPBiomedicals (Santa Ana, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las bacterias oxidantes de amonio (AOB) y las bacterias oxidantes de nitrito (NOB) fueron identificadas por medio de amplificación por PCR tiempo final y electroforesis en gel de agarosa utilizando como molde el ADN extraído. Todas las amplificaciones se realizaron utilizando la Taq Polimerasa Maxima[®] Hot Start Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), los primers correspondientes (Sigma Aldrich, San Luis, USA) y un termociclador T100[™] BIORAD (Hercules, USA). Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% migrados en cámaras de electroforesis y la fuente de poder PowerPac Basic BIORAD (Hercules, USA) y se visualizaron (tinción con bromuro de etidio) en un fotodocumentador Gel Doc[™] XR+ Imagin System BIORAD (California, USA).

Para las bacterias oxidantes de amonio (AOB) se usaron como primers forward CTO189fAB y CTO189fC en concentraciones equimolares y como primer reverse CTO654r, descritos por Kowalchuck *et al.* (1997). Estos primers son usados para amplificar una secuencia de 465 pb del gen 16S rDNA entre los dominios *V2-V3* de las *β -proteobacteria* oxidantes de amonio. Se utilizó el programa de PCR descrito por Kowalchuck *et al.* (1997) y la concentración final de los componentes de la mezcla de cada reacción fue la siguiente: Taq Buffer 24 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 5% DMSO, 1 μ L BSA, 0.2 mM de la mezcla de dNTPs, 0.6 μ M de cada primer y 1.5 U de Taq polimerasa.

Para las bacterias oxidantes de nitrito (NOB) *Nitrobacter* se usaron los primers nxrAf1370 y nxAr2843 descritos por Poly *et al.* (2008). Estos primers amplifican la subunidad catalítica de la enzima *nitrito oxidasa reductasa NXR* codificada por el gen *nxrA*. Se utilizó el programa de PCR descrito por Wertz *et al.* (2008) donde la concentración final de los componentes de la mezcla de cada reacción fue: Taq Buffer 1 x, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de la mezcla de dNTPs, 0.4 μ M de cada primer y 1.75 U de Taq polimerasa.

V.6 Diseño y construcción de biorreactor de lecho empacado

Para la construcción del biorreactor de lecho empacado se evaluó la resistencia de dos diferentes soportes de origen natural, estos fueron piedra pómez y una mezcla de zeolitas (Chabasita/Clinoptiolita). La piedra pómez fue obtenida en un establecimiento comercial localizado en la Ciudad de Hermosillo, Sonora, mientras las zeolitas de aproximadamente 4 mm de diámetro fueron proporcionadas por la Dra. María Teresa Certucha Barragán del departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sonora. La piedra pómez fue tamizada hasta obtener piedras de dos tamaños de diámetro: 6.5 mm y 4.75. Para evaluar la resistencia de los soportes estos se sometieron en agitación a 150 rpm y 30 °C en agua durante una semana y después de ese tiempo se observó si los soportes habían sufrido alguna alteración física en su estructura. Finalmente, las zeolitas fueron seleccionadas como el soporte para el biorreactor de lecho empacado por ser más resistentes que la piedra pómez, ya que esta última se deshizo completamente en líquido durante la prueba de resistencia.

Como biorreactor de lecho empacado se usó una columna de vidrio de 500 mL de capacidad, 22 cm de altura y 6.5 cm de diámetro, empacada con la mezcla de zeolitas estériles de aproximadamente 4 mm con un porcentaje de relleno del 50% del volumen total de la columna (Pal *et al.*, 2012). La estructura del biorreactor de lecho empacado se muestra en la Figura 10.

Las zeolitas fueron inoculadas con la biomasa previamente generada, por medio de recirculación en medio de cultivo con una bomba peristáltica Cole-Parmer System modem No. 07559-00 (Vernon Hills, USA) a un tiempo de retención hidráulico (TRH) de aproximadamente 12 h durante 100 días y en presencia de luz para facilitar la formación de la biopelícula (Calderón *et al.*, 2012; Farges *et al.*, 2012; Guerrero-Barajas *et al.*, 2014). Para corroborar la fijación en el soporte se analizaron los sólidos suspendidos volátiles presentes en éste (APHA, 2001).

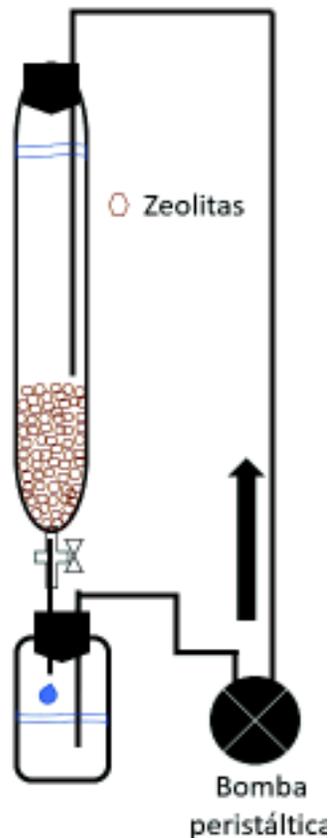


Figura 10. Estructura del biorreactor de lecho natural empacado (zeolitas).

V.7 Experimentales de degradación de tricloroetileno

Para determinar la capacidad de degradación de las bacterias aisladas se llevaron a cabo experimentos a distintos tiempos que consistían en tres réplicas y un blanco utilizando una dilución de TCE (Sigma Aldrich, 99.5% de pureza) de 500 mg/L. Esta concentración se seleccionó con base a que se han detectado concentraciones cercanas a 100 mg/L de TCE en acuíferos (Beamer *et al.*, 2012; y que estudios anteriores han evaluado la degradación de TCE por bacterias usando concentraciones similares a la ya mencionada (Shukla *et al.*, 2009, 2010a, 2010b). Por ello, como análisis preliminares se evaluó por cromatografía de gases una serie de diluciones: 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 mg/L de TCE, siendo la concentración de 500 mg/L la que al extraerse con la técnica de extracción líquido-líquido utilizada (descrita en la sección

V.8) pudo detectarse más fácilmente por medio de cromatografía de gases. Además, se llevaron a cabo experimentales de degradación de TCE en *batch* (en viales de 25 mL) utilizando bacterias con las diluciones de 250 y 500 mg/L de TCE y se obtuvieron mejores resultados en los experimentales con 500 mg/L.

Por lo tanto, para cada réplica de los experimentales se centrifugó 1 mL de medio de cultivo con bacterias (DO: 0.232 ± 0.002) proveniente del biorreactor y se resuspendió con 5 mL de la dilución de 500 mg/L de TCE disuelto en medio de cultivo en viales de 25 mL. Los viales se mantuvieron a 24 °C y la degradación de TCE se determinó por medio de cromatografía de gases cada dos días (Shuckla *et al.*, 2009).

Para evaluar la degradación de TCE en el biorreactor de lecho empacado se llevó a cabo la recirculación de una dilución de TCE de 500 mg/L disuelto en medio de cultivo en un recipiente de 1 L y se determinó la degradación por cromatografía de gases cada dos días (Guerrero-Barajas *et al.*, 2014). En este experimental se utilizó sólo una réplica en cada medición para evitar la pérdida de TCE.

V.8 Evaluación de la degradación de tricloroetileno

Para evaluar la degradación de TCE en cada uno de los experimentos, primeramente, se realizó una extracción líquido-líquido usando 3 mL de *n*-pentano y 5 mL de muestra de acuerdo al método 6232 A de Standard Methods For Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Después se procedió a inyectar la muestra en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890B (Santa Clara, USA) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar DB-624 Agilent (30 m x 0.25 mm d.i., 1.4 µM de grosor, Santa Clara, USA). Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: temperatura del inyector 150 °C, temperatura del detector 250 °C, utilizando nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 1.56 mL/min. El programa de temperatura para la columna fue: 40 °C por 2 min, 40-100°C (3°C/min), 100-200 (20 °C/min).

V.9 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

Muestras de los lodos activos antes del aislamiento y del soporte (zeolitas) con las células fijas antes y después de la recirculación del TCE fueron analizadas por medio del microscopio electrónico de barrido (MEB) JSM-7800F (Akishima, Tokio) y las micrografías se obtuvieron utilizando el software del equipo.

Para su análisis las muestras fueron previamente fijadas con glutaraldehído (5% v/v) a 4°C durante 48 h, y después fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X) hasta eliminar el olor del glutaraldehído. Posteriormente se fijaron con tetraóxido de Osmio (OsO_4) al 1% durante dos horas a 4°C y se lavaron nuevamente con solución amortiguadora de fosfatos para después realizar una desecación paulatina con acetona (30, 50, 70, 90 y 100%). Cada concentración se añadió por duplicado con un tiempo de reposo de 15 min, a excepción de la acetona absoluta que tuvo un tiempo de reposo de 20 min. Finalmente, las muestras fueron sometidas a un desecador de punto crítico a 36.1 °C y 7.37 Pa usando un Samdri 780B (Rockville, Maryland) y se observaron el microscopio sin ser recubiertas con oro (Calderón *et al.*, 2011; Purswani *et al.*, 2011).

V.10 Análisis de resultados

Para los análisis de resultados se utilizaron los paquetes estadísticos IBM SPSS y Minitab 18. Los parámetros medidos para comparar las plantas de tratamiento fueron analizados por medio de una comparación de medias usando la prueba *t de student* con $\alpha=0.05$. Las concentraciones de las especies nitrogenadas presentes en el medio de cultivo fueron evaluadas por medio de un análisis de varianza de un factor con $\alpha=0.05$ y para determinar cuáles resultados de ellas diferían entre sí se realizó una prueba de Tukey. Las medias de los datos correspondientes a la producción de biomasa fueron representadas gráficamente junto con su desviación estándar. Los datos de degradación del TCE fueron analizados por medio de un análisis de varianza de un factor cuya variable independiente fue el tiempo y la variable dependiente el porcentaje de TCE degradado, además se realizó una prueba de Tukey para determinar cuáles resultados diferían entre sí. La tasa de volatilización de TCE para los experimentales se calculó según el valor de

la pendiente de la curva generada por los datos de porcentaje de degradación de los blancos a través del tiempo, considerando como 100% el valor del blanco a tiempo 0. Con este porcentaje de volatilidad se estimó la cantidad de TCE en mg/L volatilizados a cada tiempo, y ésta se restó a los datos de degradación obtenidos en los experimentales.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 Análisis de parámetros fisicoquímicos de la zona aerobia de las plantas de tratamiento evaluadas

Las bacterias nitrificantes pueden encontrarse en ambientes ricos en compuestos nitrogenados, desde suelos a ambientes acuáticos en donde llevan a cabo el ciclo del nitrógeno. Estas bacterias son además importantes en las plantas de tratamiento, debido a que cumplen un papel fundamental en los procesos de nitrificación y desnitrificación de éstas (Farges *et al.*, 2012). Es por ello por lo que son ampliamente estudiadas dentro de esta área. En este trabajo se evaluaron dos plantas de tratamiento para seleccionar la mejor fuente de inóculo para el aislamiento de bacterias y así proceder a aislar bacterias nitrificantes endémicas de la región. Los valores de los parámetros de cada planta se muestran en la Tabla 4.

Ambas plantas de tratamiento mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Sin embargo, la planta de tratamiento sur Domos de Ciudad Obregón presentó parámetros fisicoquímicos mayores a los de la planta de tratamiento Los Lagos, Hermosillo, Sonora. Debido a esto, la muestra de lodos activos de la planta de Ciudad Obregón se seleccionó para el aislamiento de bacterias nitrificantes, esto por contener mayor cantidad de materia orgánica y carga bacteriana.

Algunos estudios han aislado bacterias nitrificantes a partir de plantas de tratamiento de aguas residuales (Prinčič *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005; Kocamemi y Çeçen, 2010; Itoh *et al.*, 2013; Rezaee *et al.*, 2013), pero en pocos se han evaluado los parámetros fisicoquímicos de las plantas de tratamiento de estudio. A continuación, se presentan algunos ejemplos de los resultados obtenidos en este tipo de estudios.

En el estudio de Limpiyakorn *et al.* (2011), se evaluó la presencia de bacterias oxidantes de amonio (AOB) en 7 diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales en la modalidad de lodos activos, 4 de ellas municipales. La demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5) en el efluente de las plantas de tratamiento municipales varió de 23.4-68 mg/L, y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) de 1103-4150 mg/L. En el caso de las plantas de tratamiento analizadas en el presente estudio (Planta Los Lagos y Planta Sur Domos) se obtuvieron valores de DBO_5 y SSV

semejantes a los reportados por Limpiyakorn *et al.* (2011). Otro estudio es el de Zeng *et al.* (2014) en el cual se analizó la dinámica de población de bacterias nitrificantes y su remoción de nitrógeno, también en una planta de tratamiento municipal, siendo la demanda química de oxígeno (DQO) del efluente de esta de 84.6-267.6 mg/L, valores también similares a los obtenidos en ambas plantas de tratamiento analizadas en la presente tesis.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos de la zona aerobia de las plantas de tratamiento evaluadas.

PARÁMETRO (mg/L)	PLANTA DE TRATAMIENTO	
	LOS LAGOS (HERMOSILLO)	SUR DOMOS (CIUDAD OBREGÓN)
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	72 ± 17 ^b	238 ± 38 ^a
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	20 ± 1 ^b	70 ± 2 ^a
Sólidos Totales (ST)	3078 ± 23 ^b	20800 ± 8685 ^a
Sólidos Totales Volátiles (STV)	1898 ± 44 ^b	5431 ± 2055 ^a
Sólidos Totales Fijos (STF)	1180 ± 24 ^b	15369 ± 6630 ^a
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	1167 ± 236 ^b	19333 ± 1414 ^a
Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV)	889 ± 314 ^b	4389 ± 1336 ^a
Sólidos Suspendidos Fijos (SSF)	278 ± 79 ^b	14944 ± 79 ^a

Promedio de tres determinaciones ± desviación estándar. Los valores en cada columna con diferentes letras (a-b) indican una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Al comparar la planta de tratamiento de Ciudad Obregón, elegida como fuente de inóculo, con las plantas de tratamiento municipales mencionadas en los estudios anteriores, ésta presenta valores semejantes en sus parámetros fisicoquímicos a los más altos reportados (DBO de 70 ± 2 mg/L, DQO de 238 ± 38 mg/L y SSV de 4389 ± 1336 mg/L). La variación entre los resultados de las plantas de tratamiento de aguas residuales puede deberse a características como su tiempo de residencia hidráulico (TRH) y tiempo de retención de sólidos (TRS), además de la cantidad de agua que trata cada planta, características que influyen directamente en la cantidad de materia orgánica y carga bacteriana presentes (Limpiyakorn *et al.*, 2011). Por lo tanto, dependiendo de

estas características, algunas de las plantas de tratamiento pueden presentar mayores valores de parámetros fisicoquímicos. En el presente estudio, la planta de tratamiento Los Lagos presentó menores valores que la planta de tratamiento Sur Domos, por ejemplo, debido a la mayor dimensión de esta última que permite la acumulación de mayor cantidad orgánica y mayor carga bacteriana. Es por ello por lo que la planta de tratamiento Sur Domos pudo ser seleccionada como fuente de inóculo para el aislamiento de bacterias.

VI.2 Evaluación del aislamiento de las bacterias nitrificantes

En la Figura 11 se muestra el cambio de la turbidez del biorreactor de flujo continuo a través del tiempo. Desde el inóculo hasta la hora 600 (aproximadamente 1 mes) hubo una notable disminución de la turbidez en el biorreactor, que puede ser explicada debido a la salida de materia orgánica y bacterias presentes en la muestra de lodos activos (*washing-out*). Después de la hora 600 hubo un aumento considerable en la turbidez, ya que las bacterias que pudieron crecer en las condiciones proporcionadas en el biorreactor empezaron a aumentar su biomasa. Así mismo, las bacterias tuvieron la capacidad de crecer y mantenerse en el biorreactor formando biopelículas y siendo retenidas como forúnculos (acumulaciones de bacterias) como ha sido reportado antes por Prinčič *et al.* (1998).

El cultivo continuo, usado en el presente trabajo como técnica para el aislamiento de bacterias, es una técnica de investigación útil ya que permite controlar las condiciones del cultivo y por lo tanto el desarrollo de las bacterias (Peña-Limón, 1971), sin embargo, es una técnica que no ha sido utilizada para el aislamiento de bacterias, por lo que estudios donde se reporta su uso para esta función son escasos en la literatura. Un ejemplo del uso de cultivo continuo es el del trabajo de Bollmann y Laanbroek (2011), en donde se usaron sedimentos como inóculo de biorreactores de flujo continuo y fueron enriquecidos con diferentes concentraciones de amonio para después analizar la composición de la comunidad bacteriana. En este estudio, por lo tanto, se utilizó el cultivo continuo para diferenciar una serie de experimentos, pero no directamente para aislar un consorcio de bacterias a partir de una muestra, como en el presente trabajo. En la presente tesis se demostró que la técnica de cultivo continuo es útil para el aislamiento de bacterias y debería ser aplicada en otros estudios.

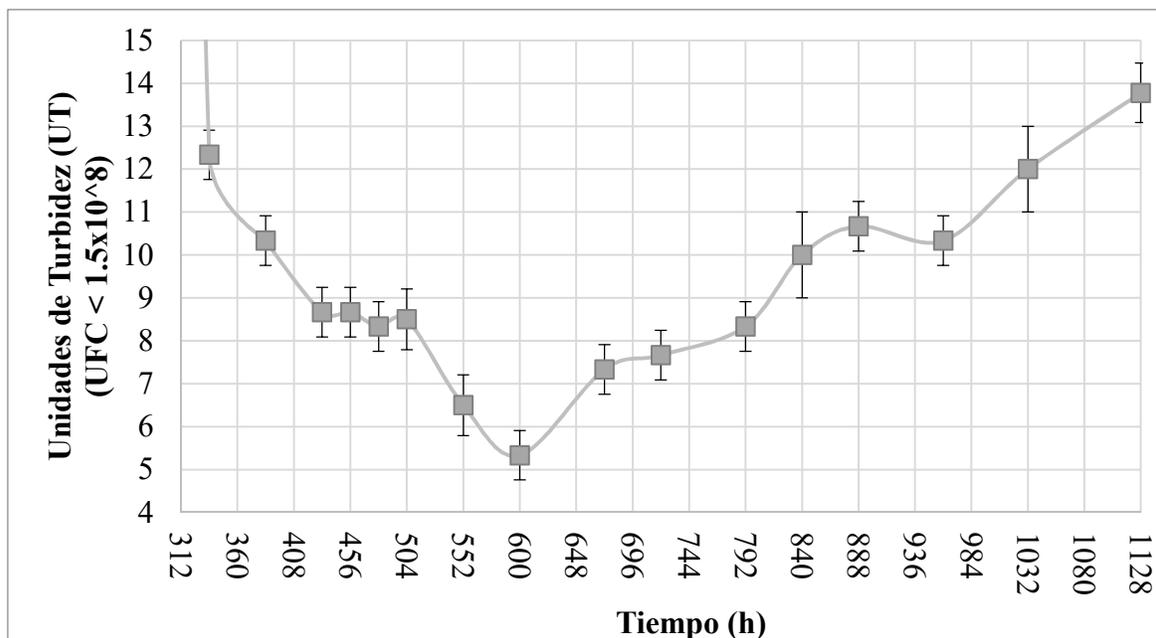


Figura 11. Cambio de la turbidez del biorreactor durante el aislamiento de bacterias nitrificantes.

VI.3 Análisis de la producción de biomasa en el cultivo

Después del aislamiento por medio del biorreactor en cultivo continuo las condiciones del biorreactor cambiaron a cultivo *batch* y se empezó a agregar medio de cultivo semanalmente. Las bacterias presentes empezaron a aumentar su biomasa y se realizó una curva de calibración para relacionar la absorbancia a 600 nm y los sólidos suspendidos volátiles (SSV) (Figura 12).

Después, con la ayuda de la curva se graficó la densidad óptica y los SSV a través del tiempo (Figura 13). El $\ln \times 100$ de los datos de densidad óptica fue graficado contra el tiempo para el cálculo de la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}), que en un cultivo *batch* es la pendiente obtenida de la porción lineal de la curva de crecimiento (fase log o exponencial) y corresponde a la máxima velocidad de crecimiento (en unidad de tiempo) a la que un cultivo puede crecer a las condiciones dadas (Peña, 1971). La μ_{max} obtenida por medio de esta gráfica fue de 0.068 / h. Además, se graficó la densidad óptica y las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL obtenidas según la escala McFarland (McFarland, 1907) como se muestra en la Figura 14.

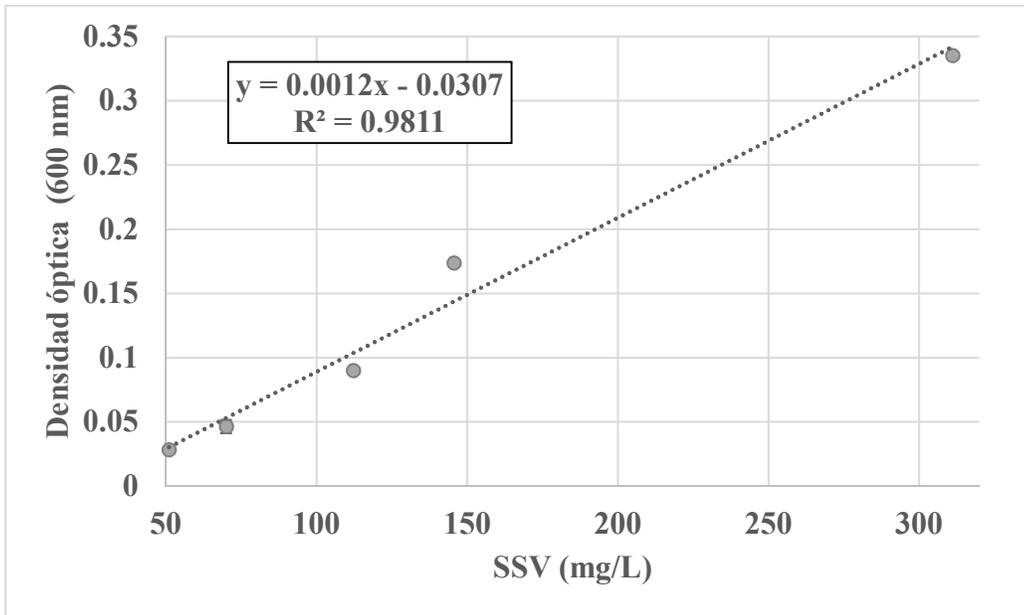


Figura 12. Curva de calibración de absorbancia y SSV del biorreactor.

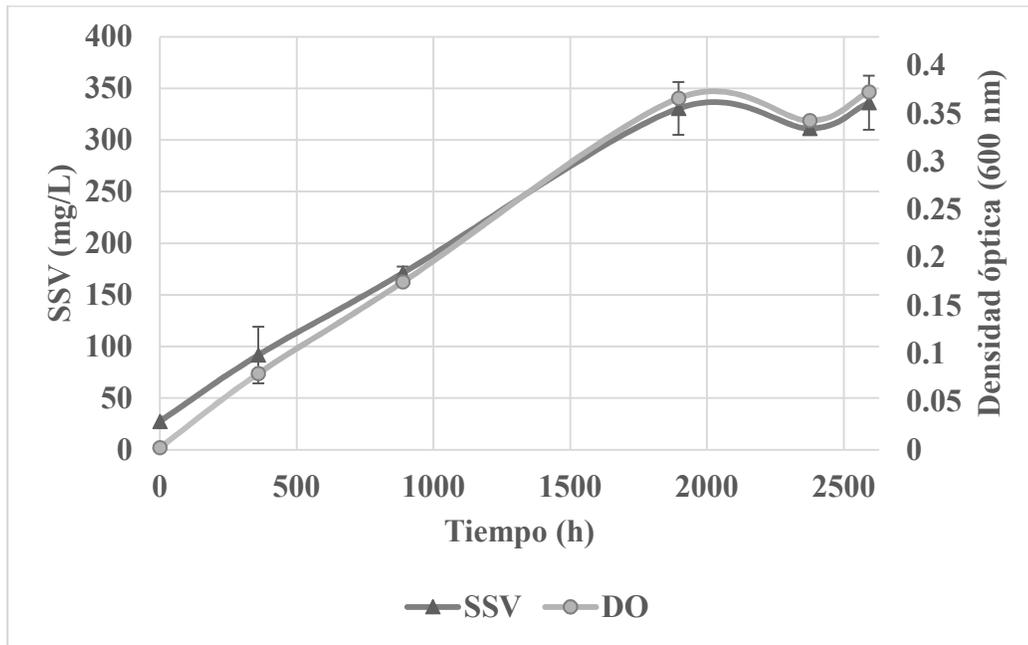


Figura 13. Gráfica de SSV y DO del biorreactor a través del tiempo.

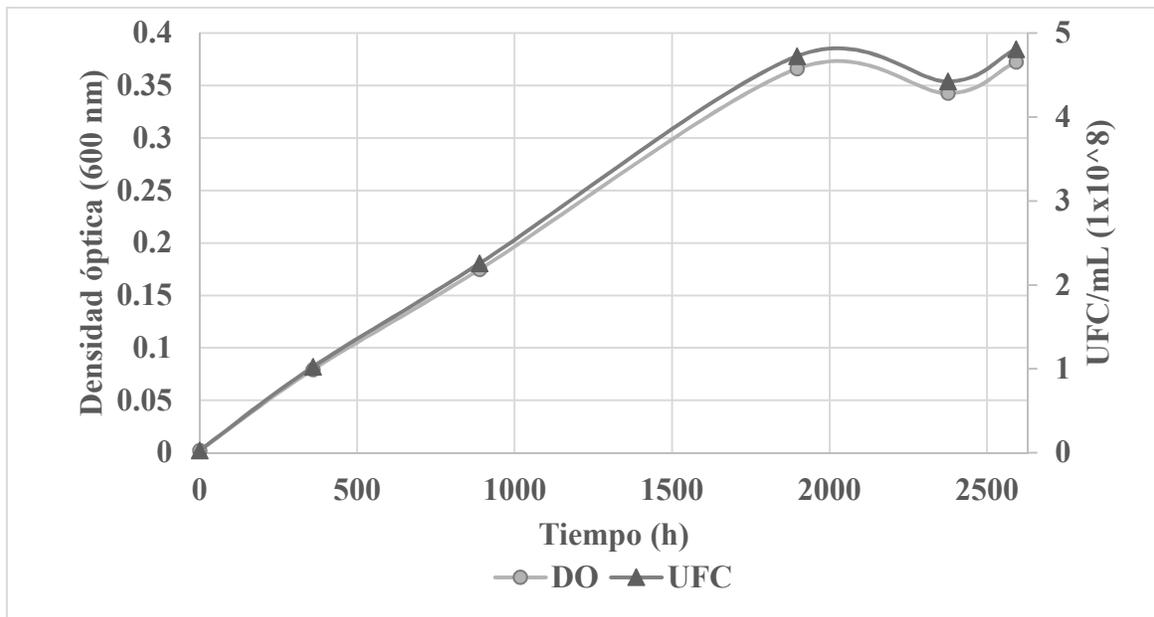


Figura 14. Gráfica de DO y UFC/mL del biorreactor a través del tiempo.

Por medio del cultivo *batch*, se obtuvieron cantidades de SSV mayores a 350 mg/L (Figura 13) y una concentración de bacterias de alrededor de 5×10^8 UFC/mL (Figura 14). Los valores obtenidos son en general semejantes a los reportados en la literatura: La concentración en mg/L de bacterias reportada por Papp *et al.* (2016) de un cultivo *batch* de *Nitrosomonas* fue de 54 mg/L (a las 80 h) y la obtenida en esta tesis es de 59 mg/L para el mismo tiempo. En el caso de la concentración de células/mL, la obtenida en este trabajo es semejante a la de *Nitrosomonas*/mL reportada por Farges *et al.* (2012) a la misma densidad óptica. Así mismo, la μ_{max} obtenida para el cultivo fue de 0.068 / h, valor también similar al de 0.067 / h reportado por Papp *et al.* (2016) para cultivos *batch* de *Nitrosomonas europaea*. Estos resultados demuestran que el biorreactor de flujo continuo permitió el aislamiento de bacterias semejantes a *Nitrosomonas europaea* que pudieron desarrollarse posteriormente en cultivo *batch*.

VI.4 Análisis de especies nitrogenadas en el cultivo

La concentración de especies nitrogenadas presentes en el medio de cultivo utilizado y en el biorreactor antes y después de una semana de agregar 200 mL de medio de cultivo se muestra en la Tabla 5. En el medio de cultivo se encontró una gran cantidad de amoníaco ($\text{NH}_3\text{-N}$), pero no se detectó nitrito ($\text{NO}_2\text{-N}$) y nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$). Por otra parte, en el biorreactor se detectó producción de nitrito por las bacterias oxidantes de amonio y nitrato por las bacterias oxidantes de nitrito. Tras una semana de agregar medio de cultivo al biorreactor se mostró el consumo casi total del amoníaco suministrado, la disminución del nitrito y un aumento en nitrato, este comportamiento fue constante a lo largo de las semanas y se muestra en la Figura 15. El tiempo 0 de dicha figura corresponde al cambio del sistema continuo a sistema *batch* en el biorreactor, y las determinaciones de nitrito y nitrato empezaron a la hora 168 (ambas especies nitrogenadas estaban presentes desde el biorreactor de flujo continuo).

El consumo de amonio en forma de amoníaco por las bacterias oxidantes de amonio del consorcio de bacterias nitrificantes aislado (Figura 15) es relativamente similar al reportado por Farges *et al.* (2012) para una cepa pura de *Nitrosomonas europaea* a densidades ópticas similares (DO mayores a 0.015), aunque para ese trabajo el consumo es mayor probablemente por tratarse de un cultivo sólo de *N. europaea* y que la densidad óptica obtenida es debida exclusivamente a esa bacteria. En el mismo trabajo se presenta la continua producción de nitritos por *N. europaea* a lo largo del cultivo, la cual en la presente tesis es reducida por también tener bacterias oxidantes de nitrito como *Nitrobacter* en el cultivo lo que permitió el continuo desarrollo de las bacterias oxidantes de amonio. Sin embargo, el consumo de nitrito para el presente trabajo fue considerablemente menor que el reportado por Farges *et al.* (2012) para una cepa pura de *Nitrobacter winogradskyi* a densidades ópticas similares, esto puede deberse a que el consorcio aislado en la presente tesis presenta mayor cantidad de bacterias oxidantes de amonio que bacterias oxidantes de nitrito. Lo anterior concuerda con lo reportado Pérez *et al.* (2015), demostraron que *N. europaea* contribuyó al 80% del crecimiento bacteriano en el cultivo y *N. winogradskyi* al 20% restante en un cultivo mixto.

Tabla 5. Valores de las especies nitrogenadas en el biorreactor.

CONDICIONES DEL CULTIVO	ESPECIES DE NITRÓGENO (mg/L)		
	NH ₃ - N	NO ₂ ⁻ -N	NO ₃ ⁻ -N
Medio de cultivo	187.5 ± 10.6 ^a	N. D	N. D
Biorreactor (antes de agregar 200 mL de medio de cultivo)	0.43 ± 0.35 ^a	63.33 ± 11.54 ^b	375.5 ± 2.12 ^c
Biorreactor (después de una semana de agregar medio de cultivo)	0.45 ± 0.40 ^a	30 ± 10 ^b	473 ± 43.08 ^c

Promedio de tres determinaciones ± desviación estándar. Los valores en cada columna con diferentes letras (a-b) indican una diferencia significativa (p<0.05).

N. D = No detectado

Un enfoque para analizar el balance de masas de un cultivo es determinar los rendimientos de conversión de los metabolitos principales de los procesos metabólicos de los organismos (Farges *et al.*, 2012). Por lo tanto, con los datos obtenidos de los análisis de especies nitrogenadas por espectrofotometría se calcularon los rendimientos de conversión para NH₃ y NO₂⁻, obteniendo un $Y_{NO_2^-/NH_3}$ y un $Y_{NO_3^-/NO_2^-}$ mayores a 0.99 moles de NO₂⁻/mol NH₃ y NO₃⁻/mol NO₂⁻ respectivamente, por lo que se puede decir que casi todo el nitrógeno presente en el medio de cultivo es oxidado y sólo una pequeña parte es incorporada a la biomasa de bacterias oxidantes de amonio y bacterias oxidantes de nitrito. Lo anterior concuerda con la literatura (Farges *et al.*, 2012; Papp *et al.*, 2016), sin embargo, las posibles diferencias pueden deberse a que en el presente trabajo se utilizó un cultivo mixto y en la mayoría de las referencias se estudiaron cultivos axénicos, además de que las diferentes técnicas utilizadas para determinar las especies nitrogenadas pueden variar en sus resultados.

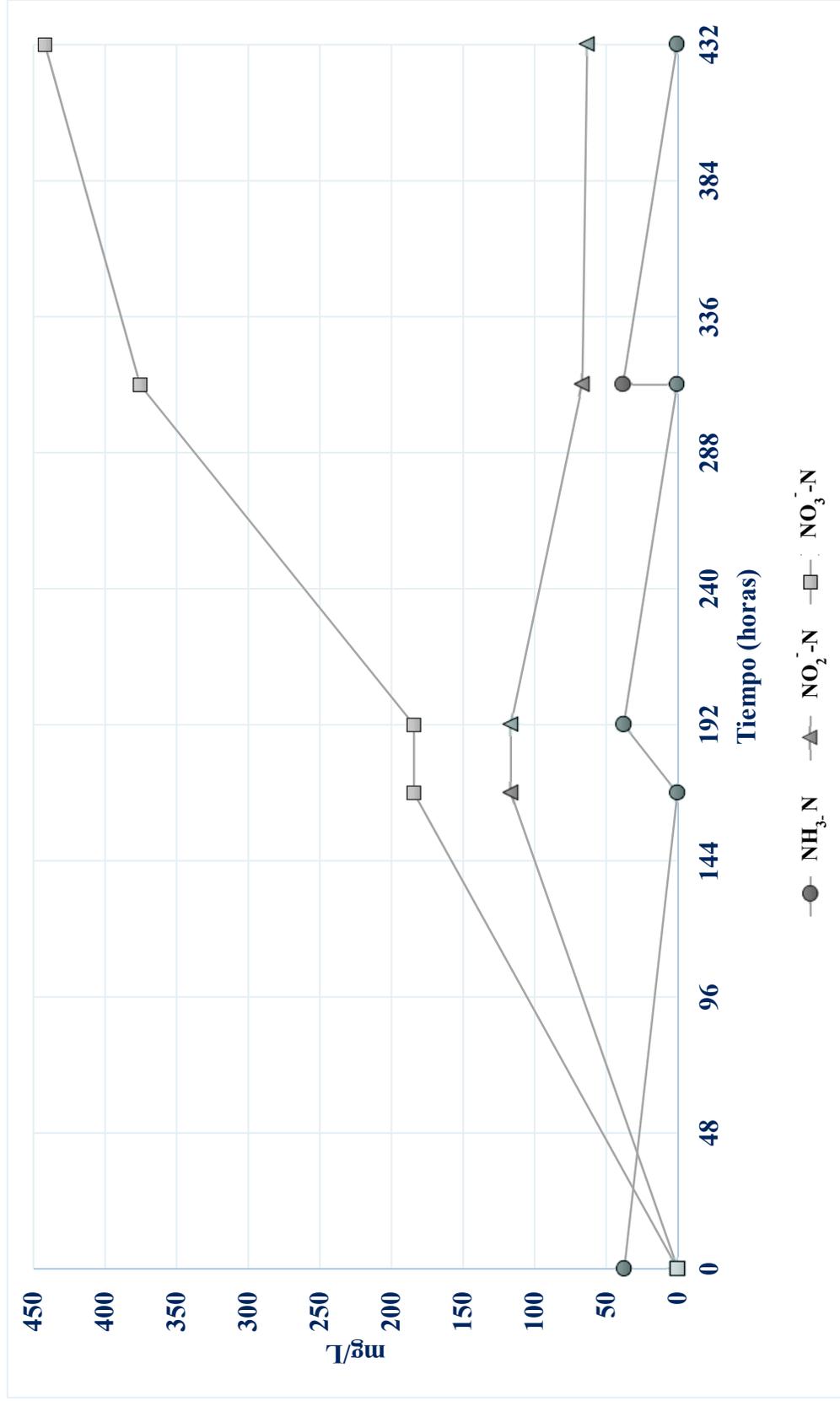


Figura 15. Proceso de nitrificación del biorreactor de flujo continuo a través del tiempo.

VI.5 Identificación de bacterias aisladas

Los resultados obtenidos de los análisis de especies nitrogenadas indicaron la presencia de bacterias oxidantes de amonio (AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (NOB) en el cultivo, misma que fue confirmada con análisis moleculares. En la Figura 16 se muestran los geles de los productos de la amplificación de PCR realizados con los respectivos primers de las muestras del biorreactor a distintos tiempos.

En los dos geles se observan bandas en los carriles de las muestras y del tamaño del fragmento amplificado (322 pb y 465 pb, Figura 16 A y Figura 16 B, respectivamente) lo que indica la presencia de los dos grupos de bacterias y que por lo tanto el aislamiento se llevó a cabo. A partir del carril 2 (muestras después del aislamiento) se observa una mayor intensidad en las bandas con respecto al carril de la muestra de los lodos activos debido al aumento en la biomasa de las bacterias en el biorreactor. La mayor intensidad en estas bandas también puede deberse al proceso de purificación de la muestra llevado a cabo durante el aislamiento, ya que inicialmente la muestra de lodos activos pudo haber contenido mayor cantidad de sustancias inhibitoras para el análisis molecular.

Tanto bacterias oxidantes de amonio como bacterias oxidantes de nitrito han sido aisladas de lodos activos a partir de plantas de tratamiento e identificadas y caracterizadas en otros trabajos, siendo *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter winogradskyi* probablemente las especies de bacterias oxidantes de amonio y oxidantes de nitrito más fácilmente aisladas y cultivadas respectivamente (Kowalchuk *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2013; Rezaee *et al.*, 2013).

N. europaea es la principal bacteria oxidante de amonio, sin embargo, se ha mostrado que otras especies como *Nitrosococcus mobilis* de la clase gammaproteobacteria o el género *Nitrospira* de la clase betaproteobacteria también pueden encontrarse en aguas residuales, siendo las dos primeras especies mencionadas las más importantes para la oxidación del amonio en las plantas de tratamiento (Wagner *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2012). En el caso de las bacterias oxidantes de nitrito el género *Nitrobacter* es el considerado como más importante en las plantas de tratamiento, aunque también puede encontrarse la presencia del género *Nitrospira* (Henze, 1997; Wagner *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2012).

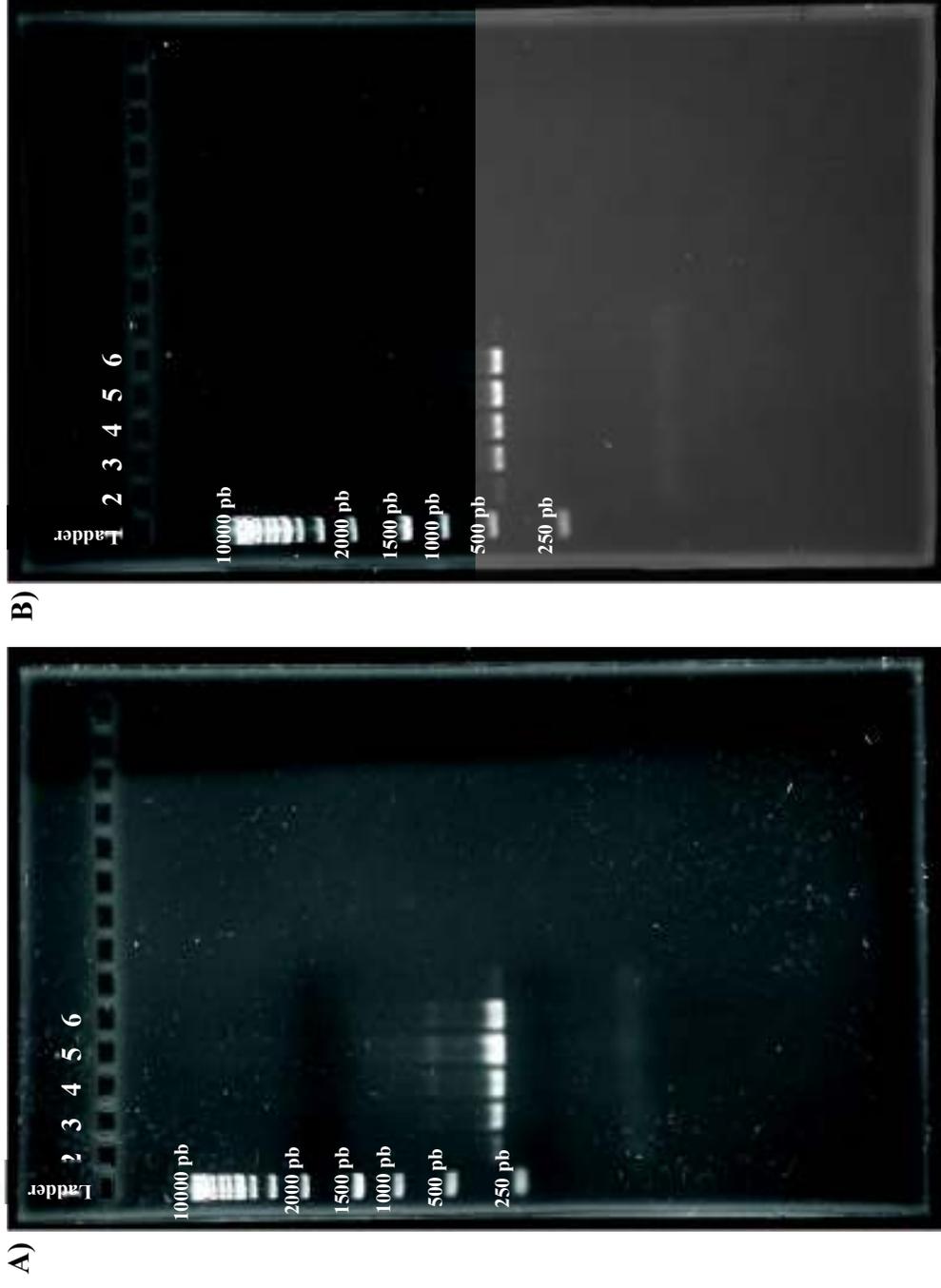


Figura 16. Geles de los productos de PCR de cada muestra A) Al usar los primers nxA para las bacterias oxidantes de nitrato (NOB) (fragmentos de 322 pb) B) Al usar los primers CTO para las bacterias oxidantes de amonio (AOB) (fragmentos de 465 pb): Donde el carril inicial corresponde al marcador molecular (1Kb), el carril marcado con 1 es la muestra inicial de lodos activos, el carril 2 es la muestra después del aislamiento en biorreactor de flujo continuo, el carril 3 corresponde a los matraces con biomasa en incubación, el carril 4 es del biorreactor de respaldo, el carril 5 es el biorreactor inicial y el carril 6 es el control negativo.

Algunos de los estudios antes citados han usado los primers *amoA* para detectar la presencia de bacterias oxidantes de amonio del género *Nitrosomonas*, ya que estos amplifican una región del gen que codifica para la enzima *amonio monooxigenasa*, sin embargo, al estar presente una enzima con prácticamente la misma secuencia (*metano monooxigenasa*) y similar función en otros grupos de bacterias como los metanotrofos, los primers *amoA* no son específicos (Cheng *et al.*, 1999). Por esta razón y debido a que actualmente no hay primers específicos para el género *Nitrosomonas*, fue que en el presente trabajo se optó por el uso de los primers CTO descritos por Kowalchuk *et al.* (1977) que amplifican un gen que codifica para una enzima quitinasa presente en bacterias oxidantes de amonio de la clase betaproteobacteria como lo son *Nitrosomonas* y *Nitrospira*, siendo posible encontrar ambos géneros de bacterias en lodos activos aguas residuales.

Por otra parte, para la detección de la presencia de bacterias oxidantes de nitrito se han usado principalmente primers que amplifican secuencias del gen 16SrRNA específicas para los géneros *Nitrobacter* y *Nitrospira* (Wertz *et al.*, 2008), o que amplifican secuencias para genes funcionales como el *nxrA* que codifica para la subunidad catalítica de la enzima nitrito oxidorreductasa del género *Nitrobacter* como los primers diseñados por Poly *et al.* (2008), que fueron los utilizados en el presente trabajo.

Los fragmentos amplificados por medio de PCR al usar los primers ya mencionados confirmaron el aislamiento de bacterias oxidantes de amonio como *Nitrosomonas* y de bacterias oxidantes de nitrito del género *Nitrobacter*. Sin embargo, para identificar las especies aisladas de cada género sería necesario realizar análisis de diversidad dentro de las clases, mediante herramientas moleculares independientes al cultivo celular y posteriormente su secuenciación. Debido a que estos microorganismos son difíciles de cultivar en condiciones de laboratorio ya que son autótrofos estrictos, el empleo de las herramientas moleculares basadas en PCR son inminentes (Farges *et al.*, 2012). Este tipo de técnicas para la identificación de microorganismos consisten en el análisis del ADN de las muestras medioambientales y entre ellas podemos mencionar la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE por sus siglas en inglés) (Muyzer *et al.*, 1993) o de Gradiente de Temperatura (TGGE), el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) y el análisis de

polimorfismos de conformación de cadenas sencillas (SSCP), entre otras (Correa-Galiote, 2016).

VI.6 Diseño y construcción del biorreactor de lecho natural empacado

Después de la confirmación de la presencia de ambos grupos de bacterias, se diseñó el biorreactor de lecho empacado. Para su construcción se seleccionó como soporte la mezcla de zeolitas (Chabasita/Clinoptiolita) después de comprobar su mayor resistencia al compararla con la de la piedra pómez a diferentes tamaños. Monge-Amaya *et al.* (2008) y Figueroa-Torres *et al.*, (2014) reportan que la zeolita es un soporte viable para la inmovilización de bacterias tanto aerobias como anaerobias y que no interviene en los bioprocesos de las bacterias. La columna fue llenada al 50% de su volumen total con la mezcla de zeolitas ya que generalmente para biorreactores se utilizan porcentajes de soporte de relleno entre 30 y 50% (Calderón *et al.*, 2012; Reboleiro-Rivas *et al.*, 2016; Pal *et al.*, 2012) y además se ha reportado que el porcentaje de soporte de relleno (*carrier filling ratio*) es uno de los parámetros que más influye en el desempeño de remoción de biorreactores de tipo MBBR (Biorreactor de lecho móvil) obteniendo mayores tasas de remoción al incrementar el porcentaje desde 10% a 50%, aunque porcentajes mayores a 50% no mejoran la tasa de remoción (Wang *et al.*, 2005). Al incrementar el porcentaje del soporte de relleno incrementa la superficie que puede ser colonizada por los microorganismos, sin embargo, al aumentar más del 50% hay mayor tensión en la biopelícula y empieza a haber un mayor desprendimiento de ésta (Calderón *et al.*, 2012).

La concentración de bacterias fijas en el soporte fue de 0.126g SSV/100g de soporte, y no hubo pérdida de la biomasa por el efluente. Como reporta Monge-Amaya *et al.* (2008), al utilizar zeolita como soporte la densidad de bacterias se mantiene constante a lo largo del tiempo ya que ésta ayuda a conservar la biomasa y evita que esta se pierda en el efluente del biorreactor.

VI.7 Evaluación de la degradación de tricloroetileno

Después de la fijación de la biomasa de bacterias, se desarrollaron dos experimentos: A) se utilizaron células en sistema *batch* y B) se utilizaron células inmovilizadas en el biorreactor de lecho natural empacado. En la Tabla 6 se muestra los porcentajes de degradación de TCE obtenido a través del tiempo para los experimentales con bacterias en sistema *batch* y bacterias en lecho fijo. La tasa de volatilización del TCE calculada para los experimentales en sistema *batch* fue de 0.16 ppm/h y para los experimentales de las bacterias fijas en el biorreactor fue de 0.54 ppm/h. Al ser el TCE altamente volátil este puede evaporarse fácilmente, especialmente en sistemas con recirculación a pesar de tomarse medidas como mantener el sistema sellado y mantener una temperatura menor a 26°C. Estas tasas de volatilidad fueron utilizadas para corregir los datos obtenidos.

Los porcentajes de degradación para los experimentales en sistema *batch* no muestran diferencias significativas ($p < 0.05$), desde las 48 h hasta las 144 h y el porcentaje se mantuvo (Tabla 6). Esto implica que no se presentó una degradación progresiva por las bacterias en suspensión. La tasa de degradación por las bacterias en estos experimentales en sistema *batch* fue de 1.67 ppm/h durante las primeras 48 h, pero después se mantuvo en 0.07 ppm/h durante las siguientes horas.

En el caso del experimental realizado en el biorreactor de lecho empacado con las bacterias fijas (0.126 g SSV/100 g de soporte) el porcentaje de degradación de TCE fue siempre en aumento hasta llegar a un 62.7% de degradación donde ya no fue posible detectar la concentración de TCE ya que los cromatogramas generaron picos cuya área no pudo ser cuantificada (Tabla 6). La tasa de degradación por las bacterias fijas después de la corrección por volatilización fue de alrededor de 1.6 ppm/h durante las primeras 48 h y de alrededor de 0.5 ppm/h durante las siguientes horas.

Tabla 6. Porcentaje de degradación de TCE por las bacterias en sistema *batch* y fijas en el biorreactor de lecho empacado

TIEMPO	% DE DEGRADACIÓN	
	BATCH*	BIORREACTOR**
48 h	42.51 ± 4.06 ^a	39.42 ^a
96 h	43.97 ± 0.73 ^a	55.01 ^b
144 h	46.47 ± 0.70 ^a	62.70 ^c

*Promedio de tres determinaciones ± desviación estándar (datos). **Experimental de una sola réplica. Los datos fueron corregidos con base a la tasa de volatilización de TCE. Los valores en cada fila con diferentes letras (a-b) indican una diferencia significativa ($p < 0.05$).

A pesar de que la tasa de degradación en los sistemas *batch* fue mayor en las primeras horas, estos datos no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) durante el experimento (Tabla 7). Por otra parte, en el biorreactor de lecho empacado la degradación siempre fue en aumento y mostró una reducción significativa ($p < 0.05$) por medio de la determinación por cromatografía de gases (Tabla 7).

La falta de degradación progresiva en los experimentales con bacterias en suspensión pudo deberse a que las bacterias consumieron el amoníaco presente en el vial y esto inhibió la degradación del TCE, como describen Arciero *et al.* (1989) y Vanelli *et al.* (1990), ya que el amoníaco estimula la degradación del TCE. El sistema *batch* pudo haber causado que se acumularan más fácilmente productos inhibitorios para la bacteria como el nitrito o productos tóxicos generados por la misma degradación del TCE. En cambio, en el biorreactor de lecho empacado, el suministro de TCE era un recipiente de 1 L con TCE disuelto en medio de cultivo, por lo tanto, la cantidad de amoníaco disponible como fuente de energía para las bacterias fue mayor y por ende la degradación fue progresiva.

Shukla *et al.* (2009) y Shukla *et al.* (2010a) obtuvieron porcentajes de degradación de 55-60% a las 144h con cultivos *batch* de metanótrofos y diazótrofos, respectivamente, a condiciones similares en el presente trabajo. Por otra parte, Shukla *et al.* (2010b) y Sukla *et al.* (2010a) obtuvieron porcentajes de degradación superiores al 88% con metanótrofos y diazótrofos en biorreactores con carbón vegetal como lecho empacado. Aunque los resultados obtenidos en la presente tesis con un biorreactor de lecho empacado son menores a los obtenidos por Shukla *et al.* (2010a) y Shukla *et al.* (2010b) en un biorreactor con carbón vegetal como

lecho empacado, los resultados de la presente tesis también demuestran que el consorcio aislado presenta biodegradación de TCE y que al fijar las bacterias en un lecho empacado estas facilitan su propagación aumentando también su actividad.

Las diferencias en los resultados obtenidos en esta tesis con estudios reportados (Tabla 2) pueden deberse a diversos factores como el procedimiento experimental (concentración de células utilizadas, tipo de sistema utilizado para la degradación y la concentración de contaminante utilizada), pero principalmente a la actividad metabólica de las bacterias (Shukla *et al.*, 2014).

Cutright y Meza (2007), usando un consorcio aeróbico formado de cepas puras (*Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Nocardia paraffinae*) previamente adaptadas al TCE demostraron que dichas bacterias eran capaces de degradar de 70 a 88% de concentraciones entre 228 y 900 mg/L de TCE en sistemas *batch*. Por otra parte, Malachowsky *et al.* (1994) demostraron que al usar un cultivo constituido por diferentes especies de *Rhodococcus* aumentaba considerablemente la degradación de TCE, a diferencia de cuando se usaba una sola especie. En este sentido, se demuestra que adaptar previamente el consorcio de bacterias al contaminante además de usar cultivos mixtos ayuda a obtener mayores porcentajes de degradación. En el presente trabajo, a pesar de que el consorcio aislado no fue adaptado previamente al TCE y que no provenía de cepas comerciales puras, si no de un aislamiento realizado a partir de lodos activos de una planta de tratamiento de aguas residuales, fue capaz de degradar el TCE en sistema *batch* y en un biorreactor de lecho natural empacado y por lo tanto puede ser aprovechado y aplicado más fácilmente.

VI.8 Análisis por microscopía electrónica de barrido

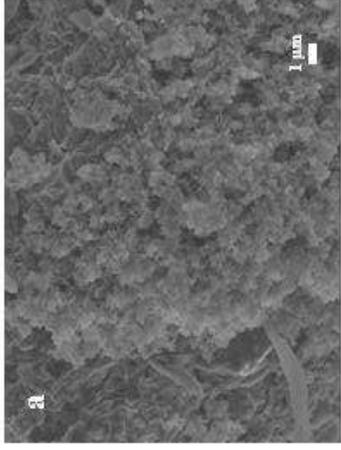
La microscopía electrónica de barrido ha sido ampliamente utilizada en estudios del área biológica debido a que permite realizar un análisis detallado de la superficie de una muestra (Asahi, *et al.*, 2015). Específicamente en el área microbiológica, se han hecho estudios por MEB para analizar la formación y la estructura de las biopelículas (Calderón *et al.*, 2011; Purswani *et al.*, 2011; Guisado *et al.*, 2016). Se ha analizado anteriormente por MEB la

inmovilización de bacterias en zeolitas como la clinoptiolita (Figueroa-Torres *et al.*, 2016) y éstas han resultado eficientes para inmovilizar bacterias aerobias y anaerobias especialmente para la biorremediación de metales pesados como cobre (Monge-Amaya *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2013).

Las micrografías obtenidas por MEB en la presente tesis se muestran en la Figura 17. La muestra inicial de lodos activos presentó una gran cantidad de materia orgánica (Figura 17, a), y las muestras del soporte (chabasita/clinoptiolita) presentaron una evidente formación de biopelículas por sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (Figura 17, b y d). Además, se pueden observar estructuras bacterianas con formas de bacilos y cocos con un tamaño promedio entre 1 y 2 μm (Figura 17, c y e). Lo anterior concuerda con Maro y Bravo (2016) que reportaron estructuras con formas de bacilos, cocos y cocobacilos en aguas residuales domésticas, como las que fueron usadas como inóculo en el presente trabajo. Por otra parte, se pueden observar diferencias en el soporte antes (pretratamiento) y después (postratamiento) de la recirculación con TCE, presentando el soporte después de la recirculación de TCE una mayor superficie cubierta por biopelículas (d) y principalmente estructuras con forma de bacilos (e).

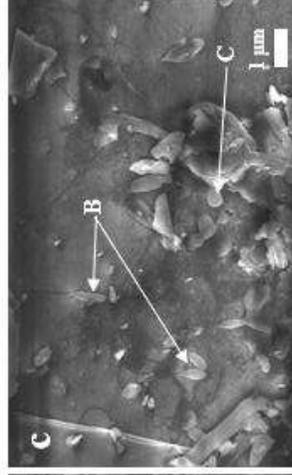
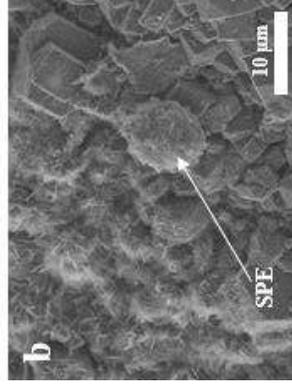
Las bacterias nitrificantes que podrían estar presentes en el consorcio aislado, como *Nitrosomonas* spp. y *Nitrobacter* spp. poseen una estructura bacilar (Sinha y Annachhatre, 2005; Fang *et al.*, 2010), por ende, la mayor presencia de estructuras bacilares en el soporte después de la recirculación de TCE puede ser debida a las bacterias como *Nitrosomonas europaea* que pueden co-metabolizar el TCE y fueron adheridas al soporte. Aunque se ha reportado que el cometabolismo de un sustrato que no se utiliza para el crecimiento de la bacteria (como lo es el TCE) puede inhibir el metabolismo disminuyendo así el crecimiento bacteriano, o producir daño e inactivación en la bacteria (Rasche, *et al.*, 1991), también ha sido reportado que *N. europaea* puede recuperar su actividad en presencia de grandes cantidades de amoníaco (Ely *et al.*, 1996), como en el presente trabajo. Al no haber estudios previos que analicen por MEB la presencia de bacterias nitrificantes en soportes después de la aplicación de TCE, el presente estudio posee información esencial para posteriores estudios.

Muestra de lodos activos



Zeolitas con biomasa inmovilizada

A) Pretratamiento



B) Postratamiento

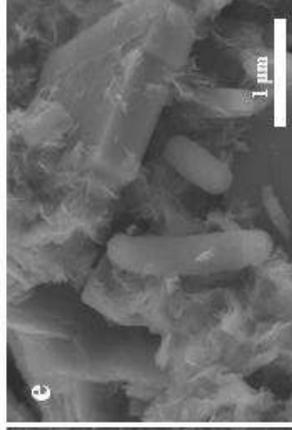
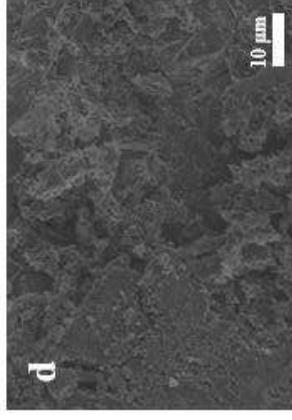


Figura 17. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de la materia orgánica presente en (a) los lodos activos antes del aislamiento de las bacterias nitrificantes y en el soporte de zeolitas con las bacterias fijas (A) antes y (B) después del tratamiento de TCE. (b): estructura del soporte parcialmente cubierto por biopelículas antes del tratamiento con TCE, se pueden observar las sustancias poliméricas extracelulares (SPE). (c): vista cercana del soporte antes del tratamiento con TCE, se pueden observar cocos (C) y bacilos (B). (d) estructura del soporte cubierto con biopelículas maduras después del tratamiento con TCE (e): vista cercana del soporte después del tratamiento con TCE, principalmente se pueden observar formas bacilares.

VII. CONCLUSIONES

- La planta de tratamiento de aguas residuales Domos (Ciudad Obregón) presentó mayor cantidad de materia orgánica y mayor carga bacteriana, por lo que se seleccionó como fuente de inóculo para el aislamiento de bacterias.
- Se aislaron bacterias nitrificantes por medio de un biorreactor de flujo continuo a partir de lodos activos para el tratamiento aguas residuales urbanas, su aislamiento fue confirmado por medio de análisis moleculares y se desarrolló biomasa de las bacterias aisladas.
- Se diseñó un biorreactor de lecho natural empacado (Chabasita/Clinoptiolita) con la biomasa de bacterias nitrificantes y su capacidad de degradación de TCE resultó mayor que la de las bacterias en sistema *batch*.
- Los resultados de la presente tesis muestran que las bacterias nitrificantes aisladas a partir de aguas residuales urbanas son microorganismos con la capacidad de degradar TCE en un biorreactor de lecho natural empacado con zeolitas y las sitúan como una posible alternativa para la biorremediación de TCE.

VIII. RECOMENDACIONES

- Analizar la diversidad microbiana presente en el biorreactor para determinar cuáles especies o grupos de bacterias están implicadas en la degradación del TCE y los posibles cambios en estas antes y después del suministro del biorreactor con TCE. Esto por medio de técnicas como T-RFLP, SSCP, métodos de hibridación de ADN o técnicas de secuenciación de nueva generación en plataformas como Illumina.
- Probar diferentes concentraciones de TCE en el desarrollo de las bacterias para adaptarlas y determinar a cuál concentración las células pueden ser inhibidas.
- Probar diferentes concentraciones de TCE y/o diferentes flujos en el biorreactor de flujo continuo para determinar si hay cambios en el porcentaje de degradación.
- Confirmar la degradación del TCE realizando la cuantificación en forma de gas, no de forma acuosa.
- Evaluar la degradación de TCE usando el biorreactor de lecho empacado como un biofiltro, en donde el TCE pase en forma de gas.
- Analizar por cromatografía de gases los productos generados después de la degradación del TCE.
- Analizar otras fuentes ricas en especies nitrogenadas, como el suelo fertilizado, para la toma de inóculo y aislamiento de bacterias nitrificantes y determinar las especies nitrogenadas en dichas fuentes. Esto con el fin de estudiar si las bacterias aisladas de otras fuentes poseen diferente capacidad de degradación en contra del TCE.
- Evaluar distintos materiales para la fijación de las bacterias aisladas para determinar la eficiencia de estos como soporte.
- Llevar a cabo nuevas investigaciones para el desarrollo de biorreactores con los consorcios aislados, a escala piloto para determinar la viabilidad técnica y económica para su posible aplicación posterior en la industria.
- Evaluar la capacidad de degradación del consorcio aislado con otros compuestos organoclorados tóxicos como clorobenceno, diclorometano, hexaclorobenceno y cloruro de vinilo.

IX. LITERATURA CITADA

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2015. ToxFAQs™ for Trichloroethylene (TCE). ATSDR.cdc.gov. Report Update May 12, 2015. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/TF.asp?id=172&tid=30>
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). 2016. Trichloroethylene. EPA.gov. Report update February 23, 2016. (<https://www3.epa.gov/airtoxics/hlthef/tri-ethy.html>).
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). 2009. National primary drinking water regulations. EPA.gov. Report Update May 2009. (<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulation-table>).
- Alfán-Guzmán, R. 2010. Efecto de compuestos organoclorados sobre el crecimiento de una población microbiana aerobia. Tesis de Licenciatura. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Ciudad de México, México.
- APHA (American Public Health Association). 2001. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.
- APHA (American Public Health Association). 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.
- Arciero, D., T. Vannelli, M. Logan, A. B Hopper. 1989. Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 159(2):640–643. doi:10.1016/0006-291X(89)90042-9
- Asahi, Y., J. Miura, T. Tsuda, S. Kuwabata, K. Tsunashima, Y. Noiri, T. Sakata, S. Ebisu, M. Hayashi. 2015. Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquid. AMB Express 5:6. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0097-4>
- Beamer, P. I., C. E. Luik, L. Abrell, S. Campos, M. E. Martínez, A. E. Sáez. 2012. Concentration of trichloroethylene in breast milk and household water from Nogales, Arizona. Environmental Science & Technology 46(16):9055-9061. doi:10.1021/es301380d
- Bollman, A y H. J. Laanbroek. 2001. Continuous culture enrichments of ammonia-oxidizing bacteria at low ammonium concentrations. Microbiology Ecology 37:211-221. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00868.x
- Calderón K., B. Rodelas, N. Cabirol, J. González-López, A. Noyola. 2011. Analysis of microbial communities developed on the fouling layers of a membrane-coupled anaerobic biorreactor applied to wastewater treatment. Bioresource Technology 102: 4618-4627. doi:j.biortech.2011.01.007
- Calderón, K., J. Martín-Pascual, J. M. Poyatos, B. Rodelas, A. González-Martínez, J. González-López, 2012. Comparative analysis of the bacterial diversity in a lab-scale moving bed biofilm reactor (MBBR) applied to treat urban wastewater under different operational conditions. Bioresource Technology 121:119-126. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.078

- Cheng, Y. S., J. L. Halsey, K. A. Fode, C. C. Remsen, M. L. P. Collins. 1999. Detection of methanotrophs in Groundwater by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2):648-651.
- Cohen, Y. 2001. Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology* 77:257-274. doi:10.1016/S0960-8524(00)00074-2
- Correa-Galiote, D. 2016. Biodiversidad y ecología funcional de bacterias nitrificantes. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Programa Oficial de Posgrado en Microbiología. Granada, España.
- Cutright T. J y L. Meza, 2007. Evaluation of the aerobic biodegradation of trichloroethylene via response surface methodology. *Environment International* 33(3): 338-345. doi:10.1016/j.envint.2006.11.012
- Ely, R. L., K. J. Williamson, M. R. Hyman, D. J. Arp. 1996. Cometabolism of chlorinated solvents by nitrifying bacteria: kinetics, substrate interactions, toxicity effects, and bacterial response. *Biotechnology and Bioengineering* 54(6): 520-534.
- Fang, X., R. Yu, B. Li, P. Somasundaran, K. Chandran. 2010. Stresses exerted by ZnO, CeO₂ and anatase TiO₂ nanoparticles on *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Colloid and Interface Science* 348: 329-334. doi:10.1016/j.jcis.2010.04.075
- Farges, B., L. R. Poughon, C. Creuly, C. G. Dussap, C. Lasseur. 2012. Axenic cultures of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in autotrophic conditions: A new protocol for kinetic studies. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(5): 1076–1091. doi:10.1007/s12010-012-9651-6
- Figuroa-Torres, G. M, M. T. Certucha-Barragán, E. Acedo-Félix, O. Monge-Amaya, F. J. Almendariz-Tapia, L. A Gasca-Estefanía. 2016. Kinetic studies of heavy metals biosorption by acidogenic biomass immobilized in clinoptilolite. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 000: 1-6. doi:10.1016/j.jtice.2015.12.018
- Ferretti G., K. M. Keiblinger, D. Di Giuseppe, B. Faccini, N. Colombani, S. Zechmesiter-Boltenstern, M. Coltorti, M. Mastrocicco. 2018. Short-term response of soil microbial biomass to different chabazite zeolite amendments. *Pedosphere* 28(2):277-287. doi:10/1016/S1002-0160/(18)60016-5
- Fitch, M. W., K. P. Graham, R. G. Arnold, S. K. Agarwal, P. Phelps, G. E. Speitel, G. Georgiou. 1993. Phenotypic characterization of cooper-resistant mutants of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Applied and Environmental Microbiology* 59(9): 2771–2776.
- García-Rivero, M. y M. R. Peralta-Pérez. 2008. Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 7(1):1-12.
- García-Solares, S. M., A. Ordaz, O. Monroy-Hermosillo, C. Guerrero-Barajas. 2013. Trichloroethylene (TCE) biodegradation and its effect on sulfate reducing activity in enriched sulfidogenic cultures prevent from UASB maintained at 20 °C. *International Biodeterioration & Biodegradation* 83:92-96. doi:10.1016/j.ibiod.2013.04.011

- Guerrero-Barajas, C., C. Garibay-Orijel, L. E. Rosas-Rocha. 2011. Sulfate reduction and trichloroethylene biodegradation by a marine microbial community from hydrothermal vents sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65:116-123. doi:10.1016/j.ibiod.2010.10.004.
- Guerrero-Barajas, C., A. Ordaz, C. S. Garibay-Orijel, M. García-Solares, F. Bastida-González, P. B. Zárate-Segura. 2014. Enhanced sulfate reduction and trichloroethylene (TCE) biodegradation in a UASB reactor operated with a sludge developed from hydrothermal vents sediments: Process and microbial ecology. *International Biodeterioration & Biodegradation* 94:182-191. doi:10.1016/j.ibiod.2014.07.015.
- Guisado I. M., J. Purswani, J. González-López, C. Pozo. 2016. An Extractive membrane biofilm reactor as alternative technology for the treatment of methyl tert butyl ether contaminated water. *Biotechnology Progress* 32(5): 1238-1245. doi:10.1002/btpr.2311
- Grigorova, R. y J.R Norris. 1990. *Methods in microbiology*. Academic Press. Estados Unidos de América.
- Guo, G., H. Tseng, S. Huang. 2001. Co-metabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas putida* in a fibrous bed bioreactor. *Biotechnology Letters* 23(20):1653-1657. doi:10.1023/A:1012431313025.
- Henze, M., P. Harremoës, J.C Jansen, E. Arvin. 1997. *Wastewater treatment—Biological and chemical processes*, 2 ed. Springer: Berlin, Germany.
- Hernández-Mata, K. M, O. Monge-Amaya, M. T. Certucha-Barragán, F. J. Almendariz-Tapia, E. Acedo-Félix. 2013. Metallic biosorption using yeasts in continuous systems. *International Journal of Photoenergy* 1-5. doi:10.1155/2013/578729
- Hill, C. B., E. Khan. 2008. A comparative study of immobilized nitrifying and co-immobilized nitrifying and denitrifying bacteria for ammonia removal from sludge digester supernatant. *Water, air and soil pollution* 195:23-33. doi:10.1007/s11270-008-9724-x
- Hiriart, M. 2007. *Impactos Ambientales: Acuiferos*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Report update Nov 15, 2007. (<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/35/impactos.html>).
- Holger, W. J. 1968. Competitive elimination of Enterobacteriaceae from seawater. *Applied Microbiology* 1968:1616-1618.
- Holt, J. G. y Hendricks-Bergey, D. 1993. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed.). Lippincott Williams and Wilkins. Estados Unidos de América.
- Itoh, Y., K. Sakagami, Y. Uchino, C. Boonmak, T. Oriyama, F. Tojo, M. Matsumoto, M. Morikawa. 2013. Isolation and characterization of a thermotolerant ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. JPCCT2 from a thermal power station. *Microbes and Environments*. 28(4):432-435. doi:10.1264/jsme2.ME13058
- Jaime-Fonseca, A. 2010. *Degradación aerobia de cloruro de vinilo*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Ciudad de México, México.

- Kowalchuck, G. A., J. R. Stephen, W. De Boer, J. I. Prosser, T. M. Embley, J. W. Woldendorp. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the Class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of pcr-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and environmental microbiology* 63 (4): 1489-1497.
- Kim, W. C. Rong y J. Deokjing. 2005. Enrichment of ammonia-oxidizing bacteria for efficient nitrification of wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15(4):772-779.
- Kocameci, B. A y F. Çeçen. 2010. Biological removal of the xenobiotic trichloroethylene (TCE) through cometabolism in nitrifying systems. *Bioresource Technology* 101:430-433. doi:10.1016/j.biortech.2009.07.079.
- Kumar, R., C. Achuthan, N. J. Manju, R. Philip. I.S. B. Singh. 2008. Activated packed bed bioreactor for rapid nitrification in brackish water hatchery systems. *Journal of Industrial Microbiological Biotechnology*. 36(3):355-65. doi:10.1007/s10295-008-0504-9
- Lapara, T. M., A. Konopka, C. H. Nakatsu, J. E. Alleman. 2000. Effects of elevated temperature on bacterial community structure and function in bioreactors treating a synthetic wastewater. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24:140-145. doi:10.1038/sj.jim.2900790
- Lièvreumont, D., M. A. N'negue, Ph. Behra, M. C. Lett. 2003. Biological oxidation of arsenite: batch reactor experiments in presence of kutnahorite and chabazite. *Chemosphere* 51:419-428. doi:10.1016/S0045-6535(02)00869-X
- Limpiyakorn, T., P. Sonthiphand, C. Rongsayamanont, C. Polprasert. 2011. Abundance of *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in activated sludge of full-scale wastewater treatment plants. *Bioresource Technology* 102:3694-3701. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.085
- Little, C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lidstrom, R. L. Tyndall, P. J. Gilmer. 1988. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 951-956.
- López-Galvez N. 2014. Soil analysis of organic and inorganic contaminants in Goat Canyon (Cañón de Los Laureles), at the U.S-Mexico border. Tesis de Maestría. San Diego State University.
- Malachowsky, K. J., T. J. Phelps, A. B. Teboli, D. E. Minnikin, D. White. 1994. Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride and aromatic compounds by *Rhodococcus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 543-548.
- Masci, P., O. Bernard, F. Grogard. 2008. Continuous Selection of the Fastest Growing Species in the Chemostat. 17th IFAC World Congress, Seoul, South Korea. 9707-9712.
- McFarland, J., M. D. Jama. 1907. The Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *XLIX(14):1176-1178*.
- Meiklejohn, J. 1950. The isolation of *Nitrosomonas europaea* in pure culture. *Journal of General Microbiology* 4(2):185-191. doi:10.1099/00221287-4-2-185

- Mohn, W. W., J. M. Tiedje. 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological Reviews* 56:482–507.
- Monge-Amaya, O., J. L. Valenzuela-García, E. Acedo-Félix, M. T. Certucha-Barragán, F. J. Almendáriz-Tapia. 2008. Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptiolita). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 24 (3):107-115.
- Montras, A., B. Pycke, N. Boon, F. Godia, M. Megeay, L. Hendrickx, J. Pérez. 2008. Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in an autotrophic nitrifying biofilm reactor as depicted by molecular analyses and mathematical modeling. *Water Research* 42:1700-1714. doi:10.1016/j.watres.2007.10.025
- Mora, A. and E. Bravo. 2016. Diversidad bacteriana asociada a biopelículas anódicas en celdas de combustible microbianas alimentadas con aguas residuales. *Acta biológica. Colombia.* 22(1):77-84. doi:10.15446/abc.v22n1.55766
- Muyzer, G., K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1):127-141.
- Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2011. Análisis de agua – determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO₅) y residuales tratadas – método de prueba (cancela a la NMX-AA-028-SCFI-1981).
- Norma Mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015. Análisis de agua – medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- método de prueba (cancela a la NMX-AA-034-SCFI-2001).
- Ogilvie, B. G., M. Rutter, D. B. Nedwell. 1997. Selection by temperature of nitrate-reducing bacteria from estuarine sediments: species composition and competition for nitrate. *Microbiology Ecology* 23:11-22. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00386.x
- Ostrooumov, M., P. Cappelletti, R. De’Gennaro. 2012. Mineralogical study of zeolite from new Mexican deposits (Cuitzeo area, Michoacán, México). *Applied Clay Science* 55:2715. doi:10.1016/j.clay.2011.09.011
- Pal, L., B. Kraigher, B. Brajer-Humar, M. Levstek, I. Mandic-Mulec. 2012. Total bacterial and ammonia oxidizer community structure in moving bed biofilm reactors treating municipal wastewater and inorganic synthetic wastewater. *Bioresource Technology* 2012. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.130.
- Pant, P, S. Pant. 2010. A review: Advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). *Journal of Environmental Sciences*, 22(1):116–126. doi:10.1016/S1001-0742(09)60082-6
- Papp, B., T. Török, E. Sándor, E. Fekete, M. Flippi, L. Karaffa. 2016. High cell density cultivation of the chemolithoautotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Folia Microbiologica* 61(3):191–198. doi:10.1007/s12223-015-0425-8

- Pérez, J., A. Buchanan, B. Mellbye. 2014. Interactions of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in co-culture. *Achieves of Microbiology* 197:79–89. doi:10.1007/s00203-014- 1056-1
- Perry, J. J. 1979. Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Microbiology Reviews* 43:59-72.
- Peña-Limón, C. E. 1971. Studies on the continuous culture of microorganism. Tesis de Doctorado. Universidad de Wisconsin. Departamento de Bioquímica. Madison, Wisconsin, Estados Unidos.
- Poly, F., S. Wertz, E. Brothier, V. Degrange. 2008. First exploration of *Nitrobacter* diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene *nxrA*. *FEMS Microbiology Ecology* 63:132-140. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00404.x
- Purswani J., B. Juárez, B. Rodelas, J. Gónzales-López, C. Pozo. 2011. Biofilm formation and microbial activity in a biofilter system in the presence of MTBE, ETBE and TAME. *Chemosphere* 85: 616-624. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.106
- Prinčič, A., I. Mahne, F. Megusar, E. A. Paul, J. M. Tiedje. 1998. Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 3584-3590. doi:0099-2240/98/\$04.00+0.
- Rasche, M. E., M. R. Hyman, D. J. Arp. 1991. Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea*: cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. *Applied and Environmental Microbiology* 57(10): 2986-2994.
- Reboleiro-Rivas, P., J. M. Pascual, J. A. Morillo, B. Juárez-Jiménez, J. M., Poyatos., B. Rodelas, J. González-López. 2016. Interlinkages between bacterial populations dynamics and the operational parameters in a moving bed membrane bioreactor treating urban sewage. *Water research* 88:796-807. doi:10.1016/j.watres.2015.10.059.
- Reina-Guerrero, L. G. 1996. Estudio cinético de *Nitrosomonas europea*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ingeniería Química. Hermosillo, Sonora, México.
- Rezaee, A., N. Naimi, S.E. Hashemi, H. Hosseini. 2013. Molecular identification of nitrifying bacteria in activated sludge. *Journal of Materials and Environmental Science* 4(5):601-604.
- Sánchez, I. M. s.f. Diversidad microbiana y taxonomía. Crecimiento en cultivo continuo. *Diversidadmicrobiana.com*. (https://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=472&Itemid=240).
- Sánchez, R. A. 1995. Water quality problems in Nogales, Sonora. *Environmental Health Perspectives* 103: 93 – 97.
- Seo, J. K., I. H. Jung, M. R. Kim, B. J. Kim, S. W. Nam, S. K. Kim. 2001. Nitrification performance of nitrifiers immobilized in PVA (polyvinyl alcohol) for a marine

- recirculating aquarium system. *Aquacultural Engineering* 24:181-195. doi:10.1016/S0144-8609(01)00063-2
- Singh, R., D. Paul, R. K. Jain. 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* 14:9. doi:10.1016/j.tim.2006.07.001
- Sinha, B., A. P. Annachate. 2006. Assesment of partial nitrification reactor performance through microbial population shift using quinone profile, FISH and SEM. *Bioresource Technology* 98: 3602-3610. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.034
- Shukla, A. K., P. Vishwakarma, S. N. Upadhyay, A. K. Tripathi, H. C. Prasana, S. K. Dubey. 2009. Biodegradation of trichloroethylene (TCE) by methanotrophic community. *Bioresource Technology* 100 2469–2474. doi:10.1016/j.biortech.2008.12.022
- Shukla, A. K., P. Vishwakarma, R. S. Singh, S. N. Upadhyay, S. K. Dubey. 2010. Bio-filtration of trichloroethylene using diazotrophic bacterial community. *Bioresource Technology* 101:2126-2133. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.094
- Shukla, A. K., R. S. Singh, S. N. Upadhyay, S. K. Dubey. 2010. Kinetics of bio-filtration of trichloroethylene by metanotrophs in presence of methanol. *Bioresource Technology* 101: 8119-8126. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.040
- Shukla, A. K., S. N. Upadhyay, S. K. Dubey. 2014. Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 8551(2):1–15. doi:10.3109/07388551.2012.727080
- Sutherland, I. W. 2001. The biofilm matrix- an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9(5):222-227. doi:10.1016/S0966-842X(01)02012-1
- Vannelli, T., M. Logan, D. M. Arciero, A. B. Hooper. 1990. Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology* 56(4):1169–1171.
- VISAVET Divulgación. 2010. Los biofilms y su repercusión en la insutria alimentaria. Visavet.es. Report Update: 12 May 2010. (<https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>)
- Wahman, D. G., L. E. Katz, G. E. Speitel. 2005. Cometabolism of Trihalomethanes by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12):7980–7986. doi:10.1128/AEM.71.12.7980
- Wang, R.C. y X. H. Wen. Y. Quian. 2005. Influence of carrier concentration on the performance and microbial characteristics of a suspended carrier biofilm reactor. *Process Biochemistry*: 40:2992-3001. doi:10.1016/j.procbio.2005.02.024
- Wang, S. y Y. Peng. 2010. Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* 156:11-24. doi:10.1016/j.cej.2009.10.029
- Wagner, M., A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold, N. Lee, H. Daims. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:665-680.

- Wertz, S., F. Poly, X. Le Roux, V. Degrange. 2008. Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of *Nitrobacter*-like *nxrA* sequences in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 63:132-261-271. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00416.x
- Wijffels, R. H. y J. Tramper. 1995. Nitrification by immobilized cells. *Enzyme and Microbial Technology* 17:482-492. doi:10.1016/0141-0229(94)00099-D
- Wimpenny, J. W. Manz, U. Szewczyk. 2000. Heterogeneity in biofilms. *Microbiology Reviews*. 66:661-671. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00565.x
- Zeng, W., X. Bai, L. Zhang, A. Wang, Y. Peng. 2014. Population dynamics of nitrifying bacteria for nitritation achieved in Johannesburg (JHB) process treating municipal wastewater. *Bioresource Technology* 162:30-37. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.102.

X.APÉNDICE 1

Composición de sales del medio de cultivo utilizado en el reactor, modificado de Farges *et al.* (2012)

SAL	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sulfato de amonio)	1
FeSO ₄ (Sulfato de hierro) 7H ₂ O	0.0015
CuSO ₄ (Sulfato de cobre) 5H ₂ O	0.0002
K ₂ HPO ₄ (Fosfato de potasio dibásico)	2
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potasio monobásico)	0.0022
MgSO ₄ (Sulfato de magnesio) 7H ₂ O	0.05
CaCl ₂ (Cloruro de calcio) 2H ₂ O	0.02
Na ₂ CO ₃ (Carbonato de sodio)	0.39

XI. APÉNDICE 2

Cambio de la turbidez del biorreactor a través del tiempo



24 h



216 h



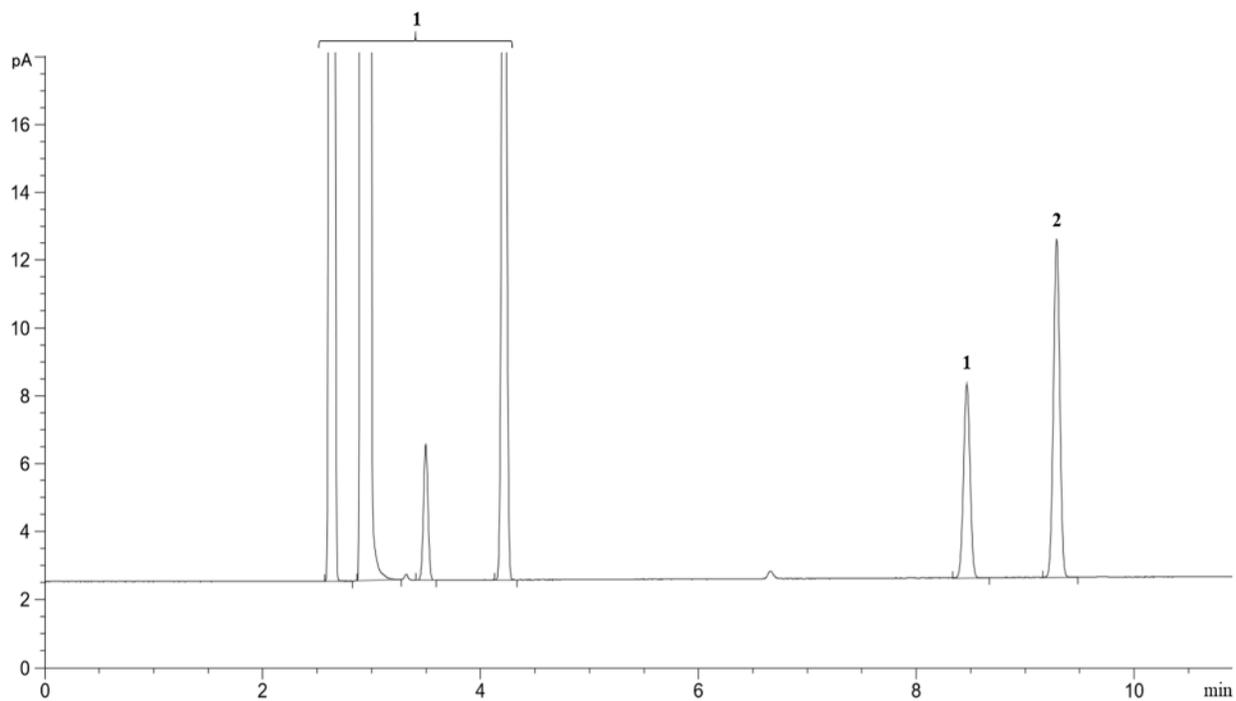
312 h



1032 h

XII. APÉNDICE 3

A) Cromatograma de uno de los blancos de las muestras del experimento

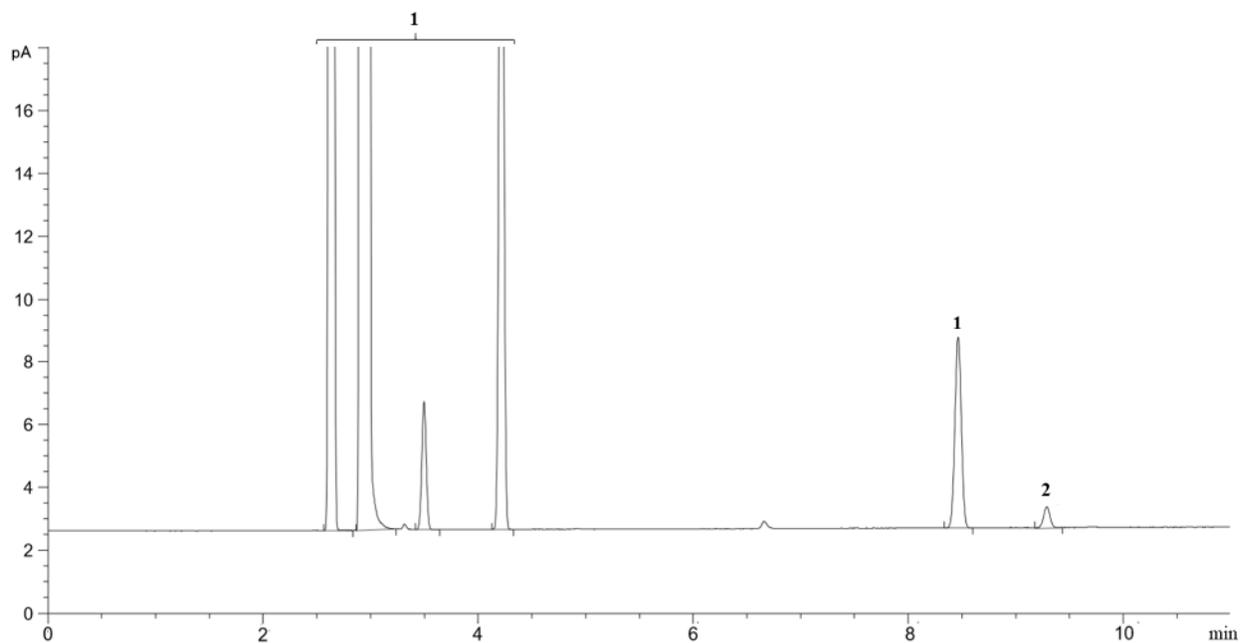


Donde:

1 = Picos correspondientes al solvente utilizado (pentano)

2 = Pico correspondiente al tricloroetileno (TCE) con un tiempo de retención de 9.29 min y un área bajo la curva de 40.37 pA*s

B) Cromatograma de una réplica del experimento



Donde:

1 = Picos correspondientes al solvente utilizado (pentano)

2 = Pico correspondiente al tricloroetileno (TCE) con un tiempo de retención de 9.29 min y un área bajo la curva de 2.92 pA*s

En B) se puede observar la disminución del pico del TCE (pA*s) con respecto al blanco mostrado en A), es decir, la disminución de su concentración.