



# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

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

---

## **POSGRADO EN BIOCENCIAS**

**BIORREMEDIACIÓN DE TRICLOROETILENO POR UN  
CONSORCIO DE BACTERIAS NITRIFICANTES DE  
AMONIO (AOB) EN UN BIORREACTOR DE LECHO  
SINTÉTICO EMPACADO**

### **TESIS**

**Para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN BIOCENCIAS**

**Presenta:**

**CRESCENT FERNANDO BERRELLEZA VALDEZ**

**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 **Biorremediación de tricloroetileno por un consorcio de bacterias nitrificantes de amonio (AOB) en un biorreactor de lecho sintético empacado**, en los sucesivos 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.

**ATENTAMENTE**



El saber de mis hijos  
hará mi grandeza  
DEPARTAMENTO DE  
INVESTIGACIONES  
CIENTIFICAS Y  
TECNOLOGICAS  
POSGRADO EN  
BIOCIENCIAS

  
LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN  
Abogado General  
UNIVERSIDAD DE SONORA



Crescent Fernando Berrelleza Valdez

BIORREMEDIACIÓN DE TRICLOROETILENO POR UN CONSORCIO DE BACTERIAS  
NITRIFICANTES DE AMONIO (AOB) EN UN BIORREACTOR DE LECHO SINTÉTICO  
EMPACADO

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

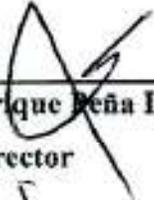
CRESCENT FERNANDO BERRELLEZA VALDEZ

Hermosillo, Sonora, México.

Septiembre del 2018

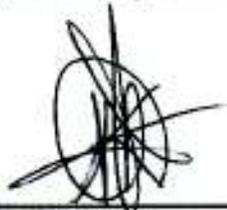
## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis Titulada Biorremediación de Tricloroetileno por un Consorcio de Bacterias Nitrificantes de Amonio (AOB) en un Biorreactor de Lecho Sintético Empacado presentada por Crescent Fernando Berrelleza Valdez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



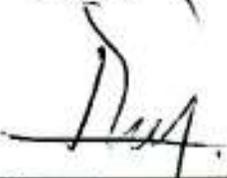
---

**Dr. Carlos Enrique Peña Limón**  
Director



---

**Dra. Kadiya del Carmen Calderón**  
Alvarado  
Co- Directora



---

**Dr. Luis Ángel Medina Juárez**  
Sinodal Interno



---

**Dra. Nohemí Gámez Meza**  
Sinodal Interno



---

**Dra. Denisse Serrano Palacios**  
Sinodal Externo

## **DEDICATORIA**

A mi familia, a mi madre, por todo su gran apoyo y haberme enseñado que mis sueños y metas pueden cumplirse con dedicación, paciencia y esfuerzo.

A mi pareja y mejor amiga por estar siempre a mi lado en todo momento, por animarme a dar siempre lo mejor de mí, a esforzarme para ser mejor persona cada día y por su apoyo incondicional en los momentos cuando más la he necesitado.

A todos mis sinodales que me han ayudado a enriquecerme con sus conocimientos durante esta etapa de mi vida.

Por último, pero no menos importante a Jonathan Parades, que no solo es un excelente compañero de trabajo si no un gran amigo que me ha prestado su amistad por tantos años y siempre me ha apoyado.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Sonora, al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas y al Posgrado 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 apoyarme económicamente con una beca estudiantil y hacer posible la culminación de este trabajo.

A la Dra. María Teresa Certrucha Barragán del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia quien gracias a su gran apoyo nos permitió realizar parte de este trabajo en sus instalaciones.

A mis directores de tesis Dra. Kadiya Calderón y el Dr. Carlos Peña por haberme enseñado a desarrollar gran parte de mis habilidades y conocimiento.

Al Dr. Luis Medina por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su gran apoyo accesibilidad y consejos brindados los cuales me ayudaron a desarrollarme académicamente.

A la Dra. Nohemí Gámez y la Dra. Denisse Serrano, quienes siempre me han orientado, con sus observaciones, recomendaciones y por su gran paciencia.

A mi gran compañero y excelente amigo Jonathan Parades, por haber ayudado con la culminación de este trabajo, por brindarme su apoyo y amistad a lo largo de estos años.

Sin más que decir me resta expresar a todas esas increíbles personas que han formado parte de mi vida tanto personal como profesional a doctores, maestros compañeros y amigos, un cordial y sincero gracias.

## RESUMEN

El tricloroetileno (TCE) es un compuesto comúnmente utilizado en las industrias de electrónicos como detergente y disolvente de grasa, considerado como cancerígeno por la Agencia de Protección Ambiental (EPA). El límite máximo permitido en agua por la EPA es de 0.5 µg/L. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la biorremediación de agua contaminada con TCE mediante un consorcio de bacterias oxidantes de amonio (AOB) en un biorreactor de lecho sintético empacado. Para ello, se llevó a cabo un proceso de aislamiento mediante un reactor de tanque agitado continuo inoculado con lodos activos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas y alimentado con medio de cultivo recomendado para *Nitrosomonas europea*. La presencia de bacterias nitrificantes de amonio (AOB) y bacterias nitrificantes de nitrito (NOB) se confirmó mediante técnicas moleculares. Posteriormente, se fijaron las bacterias aisladas en un biorreactor con hule espuma como lecho empacado y se evaluó la capacidad de degradación de TCE por cromatografía de gases. Los resultados mostraron que las bacterias nitrificantes aisladas fueron capaces de degradar 58.66% del TCE total. Este método es un potencial proceso para la biorremediación de TCE en sistemas ambientales.

## ABSTRACT

Trichlorethylene (TCE) is a compound commonly used in the electronics industries such as detergent and grease solvent, considered as a carcinogen by the Environmental Protection Agency (EPA). The maximum limit allowed in water by the EPA is 0.5 µg/L. Therefore, the objective of this work was to evaluate the bioremediation of contaminated water with TCE by a consortium of ammonium oxidizing bacteria (AOB) in a synthetic packed bed bioreactor. For this, an isolation process was carried out by means of a continuous stirred tank reactor inoculated with activated sludge from an urban wastewater treatment plant and fed with the recommended culture medium for *Nitrosomonas europea*. The presence of ammonium nitrifying bacteria (AOB) and nitrite nitrifying bacteria (NOB) was confirmed by molecular techniques. Subsequently, the isolated bacteria were fixed in a packed bed bioreactor with foam rubber as carrier to evaluate the degradation capacity of TCE by gas chromatography. The results showed that the isolated nitrifying bacteria were able to degrade 58.66% of the total TCE. This method is a potential process for TCE bioremediation in environmental systems.

## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
APROBACIÓN .....	<i>i</i>
DEDICATORIA .....	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS .....	<i>iii</i>
RESUMEN .....	<i>iv</i>
ABSTRACT .....	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS .....	<i>viii</i>
ÍNDICE DE TABLAS .....	<i>ix</i>
INTRODUCCIÓN .....	1
I. ANTECEDENTES .....	3
I.1 Tricloroetileno (TCE) .....	3
I.2 El TCE y su impacto en la salud y medio ambiente .....	4
I.3 Bacterias nitrificantes para la remoción de TCE .....	5
I.4 Biodegradación de tricloroetileno .....	8
I.5 Sistemas de nitrificación biológica .....	11
II. HIPÓTESIS .....	15
III. OBJETIVO GENERAL .....	16
III.1 Objetivos Específicos .....	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
IV.1 Aislamiento y desarrollo de biomasa .....	17
IV.2 Diseño de un biorreactor de tanque agitado para el aislamiento y desarrollo de biomasa de bacterias nitrificantes de amonio (AOB) y bacterias nitrificantes de nitrito (NOB) .....	19
IV.3 Monitoreo del aislamiento y desarrollo de biomasa .....	20
IV.4 Análisis de especies nitrogenadas .....	21
IV.5 Análisis moleculares para la determinación de bacterias AOB y NOB .....	21
IV.6 Fijación de biopelícula y diseño de biorreactor de lecho fijo .....	22
IV.7 Evaluación de degradación de TCE .....	24
IV.7.1 Evaluación de la degradación de TCE en viales .....	24

IV.7.2 Evaluación de la degradación de TCE en el biorreactor de lecho sintético empacado .....	24
IV.7.3 Cuantificación de TCE por cromatografía de gases .....	25
IV.8 Análisis de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) .....	26
IV.9 Análisis estadístico .....	26
V. RESULTADOS .....	27
V.1 Aislamiento y desarrollo de biomasa .....	27
V.2 Monitoreo del aislamiento y desarrollo de biomasa .....	27
V.3 Especies nitrogenadas .....	29
V.4 Confirmación molecular de la presencia bacterias tipo AOB y NOB	31
V.5 Fijación de biopelícula y análisis de microscopia electrónica de barrido .....	32
V.6 Degradación del TCE por el consorcio bacteriano nitrificante .....	35
VI. DISCUSIÓN .....	37
VI.1 Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales para la selección del inóculo .....	37
VI.2 Aislamiento y desarrollo de biomasa .....	38
VI.3 Especies nitrogenadas .....	39
VI.4 Confirmación molecular de la presencia de bacterias AOB y NOB	40
VI.5 Fijación de biopelícula y análisis de microscopia electrónica de barrido .....	41
VI.6 Diseño de biorreactor de lecho sintético empacado .....	42
VI.7 Degradación del TCE por cromatografía de gases .....	43
VII. CONCLUSIONES .....	45
VIII. RECOMENDACIONES .....	46
IX. LITERATURA CITADA .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Fórmula química de tricloroetileno (TCE) .....	3
2	Ciclo del nitrógeno .....	6
3	Ruta de biodegradación de tricloroetileno por hidrogenólisis .....	10
4	Proceso de formación de biopelícula. ....	14
5	Biorreactor de tanque agitado para el aislamiento de bacterias nitrificantes de amonio (AOB) y nitrito (NOB). ....	19
6	Diseño de biorreactor para la formación y establecimiento de biopelícula. ....	23
7	Biorreactor de lecho sintético empacado con hule espuma para la degradación del TCE. ....	25
8	Cinética de la turbidez durante el aislamiento hasta los 57 días dentro del biorreactor de tanque agitado. ....	28
9	Sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el biorreactor de tanque agitado en función del tiempo. ....	28
10	Proceso de nitrificación en el biorreactor de tanque agitado tipo batch después del aislamiento del consorcio bacteriano nitrificante (AOB) y (NOB). ....	30
11	Amplificación con 2 µl de ADN de NOB (A) Gen: <i>nxrA</i> (Fragmento de 322 pb) y AOB (B) Gen 16S rRNA (Fragmento de 465 pb). ....	31
12	Biopelícula producida en el biorreactor de lecho sintético empacado (hule espuma), (A) lecho sintético antes de la formación de biopelícula y (B) lecho sintético después de la formación de biopelícula. ....	33
13	Micrografías de biopelícula formada en el lecho sintético mediante microscopía electrónica de barrido. ....	34
14	Tiempo de retención del tricloroetileno por cromatografía de gases....	35

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Medio de sales de amonio ATCC Medium: 2265. ....	20
2	Caracterización fisicoquímica del agua residual urbana de las dos plantas tratadoras de agua seleccionadas. ....	27
3	Materia orgánica e inorgánica en el reactor de tanque agitado después de 128 días de crecimiento. ....	29
4	Especies nitrogenadas en el reactor de tanque agitado y en el medio de cultivo. ....	30
5	Materia orgánica dentro del biorreactor de lecho empacado a los 100 días de recirculación del consorcio bacteriano. ....	33
6	Degradación de tricloroetileno en función del tiempo en viales y biorreactor de lecho sintético empacado. ....	36

## INTRODUCCIÓN

La aparente simplicidad estructural de los microorganismos y su extraordinaria capacidad de adaptarse a los múltiples microambientes son características que han sido explotadas desde hace décadas por el hombre como estrategia para tratar residuos tóxicos de aguas, aire y suelos. Estas estrategias conocidas como biorremediación utilizan el potencial metabólico de los microorganismos para absorber, degradar o transformar contaminantes ambientales en compuestos más simples no tóxicos. Los microorganismos como bacterias, hongos, levaduras e incluso organismos superiores como las plantas se pueden utilizar para depurar suelo o aguas contaminadas tanto de mares, lagos o ríos (Galli *et al.*, 2013; Glazer y Nikaido, 1995; Schmidt, W. 2002; Herrero *et al.*, 2013).

La biotecnología ha desarrollado diversas estrategias y tecnologías con el fin de restaurar el suelo y la calidad ambiental de acuerdo con el impacto y alcance del nivel de contaminación. Los microorganismos transforman, metabolizan o cometabolizan de manera aeróbica los hidrocarburos y otros compuestos orgánicos hasta formas más simples e incluso dióxido de carbono, agua y fuentes de alimento para sustentar su crecimiento y reproducción (Torres, 2009; Herrero *et al.*, 2013).

Como consecuencia de la intensa actividad industrial de la química básica y el crecimiento exponencial de la población, se han producido grandes cantidades de residuos peligrosos, así como accidentes durante su almacenamiento, transporte o trasvase de sustancias y la disposición clandestina e incontrolada de residuos, lo cual, contribuye en gran medida a la contaminación de suelos y acuíferos (SEMARNAT. 2012).

Las tecnologías de remediación representan una alternativa para la degradación de desechos peligrosos que no han sido tratados y sus capacidades o posibilidades de éxito bajo las condiciones específicas de un sitio pueden variar ampliamente (EPA. 2001). Las rutas de biodegradación de los contaminantes pueden variar en función de su estructura química y de las especies microbianas degradadoras (Eweis *et al.*, 1998).

La biorremediación emplea el uso de microorganismos propios del sitio contaminado o de otros sitios, puede realizarse *in situ* o *ex situ* y en condiciones aerobias o anaerobias, para tratar

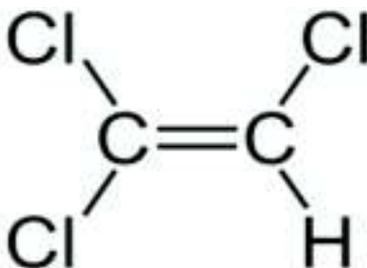
suelos, lodos y aguas contaminados con xenobióticos como hidrocarburos del petróleo, solventes (benceno y tolueno), clorofenoles, pesticidas, e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Eweis *et al.*, 1998; Semple *et al.*, 2001).

En el presente trabajo de investigación se aisló un consorcio de bacterias nitrificantes de amonio (AOB) y de nitrito (NOB), el cual fue inoculado en un biorreactor de lecho sintético empacado (hule espuma) con la finalidad de formar una biopelícula, para evaluar la remoción de tricloroetileno (TCE).

## I. ANTECEDENTES

### I.1 Tricloroetileno (TCE)

El Tricloroetileno (TCE) también conocido como vitran o triclenu es un xenobiótico altamente clorado, líquido, incoloro, no inflamable, de aroma y sabor dulce, encontrado en ciertos productos para el hogar, tales como removedores de pintura y adhesivos, preservadores de madera; en las industrias como detergente para remover la grasa de partes electrónicas, maquilas y tintorerías (Figura 1) Su olor puede llegar a percibirse en el aire cuando este está en concentraciones mayores a 100 ppm (IDEM, 2013; ATSDR, 2016).



**Figura 1.** Formula química de tricloroetileno (TCE) (IDEM, 2013).

Las características físicas y químicas del TCE son; de apariencia incoloro, densidad 1.46 g/cm<sup>3</sup>, masa molar: 131.4 g/mol, punto de fusión: 200 K (-73 °C), y punto de ebullición: 360 K (87 °C). La principal fuente de contaminación de TCE es mediante la evaporación que se produce por las fábricas que lo utilizan, este se puede llegar a descomponer con altas temperaturas y en condiciones alcalinas produciendo dicloroacetileno y fosfógeno, sustancias altamente nocivas (IDEM, 2013; ATSDR, 2016).

Cuando el TCE se encuentra en superficies acuáticas este puede evaporarse fácilmente y pasar al aire, sin embargo, en aguas subterráneas este proceso puede llegar a ser más lento debido a que el proceso de evaporación demora más tiempo, mientras que en el suelo su permanencia puede llegar a ser indefinida (ATSDR. 2016).

## **I.2 El TCE y su impacto en la salud y medio ambiente**

A pesar de que este compuesto se evapora fácilmente, el TCE puede infiltrarse en el suelo o en aguas subterráneas como residuo de derrames y disposición inapropiada. Así mismo, por el mecanismo de intrusión de vapores, es capaz de viajar a través de los poros del suelo y grietas de las rocas pudiendo evaporarse desde las aguas subterráneas (Shah *et al.* 1996; Moran *et al.*, 2007).

En el 2012, la agencia de protección del medio ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) identificó alrededor de 1428 sitios en Estados Unidos donde se encontraron desechos peligrosos; donde en al menos 861 de estos se reportó la presencia de TCE (ASTDR, 2016). Todos estos sitios pertenecen a la lista de prioridades nacionales y fueron designados por el gobierno federal para su intervención a largo plazo (ATSDR, 2016). Considerado como un contaminante por sus efectos tanto al ecosistema como a la población humana ha sido considerado como un cancerígeno. Tomar o respirar niveles altos de TCE puede producir efectos dañinos al sistema nervioso central, hígado, pulmón, corazón, coma y posiblemente la muerte (Selmin *et al.*, 2014).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos encontró una concentración máxima de 6 ng/mL de TCE en leche materna en 7 de 20 madres de Nogales, Arizona. Esta concentración se correlacionó significativamente con la presente en el agua utilizada para uso doméstico ( $p = 0.59$ ,  $p = 0.008$ ) (Beamer *et al.*, 2012). Por otra parte, los niveles de TCE en el lugar de trabajo son regulados por la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional en Estados Unidos (OSHA, por sus siglas en inglés), quien estableció un límite de exposición para una jornada de trabajo de 8 horas, en una concentración promedio de 100 ppm en el aire. Así, la mayoría de las personas pueden empezar a percibir el olor de este químico en el aire cuando se encuentra en dicha concentración, sin embargo el promedio de exposición en el aire por 15 minutos es de 300 ppm (ASTDR. 2016).

Estudios toxicológicos basados en el uso de ratones y ratas han sugerido que niveles altos, es decir por encima de 0.5 ppm por tiempos prolongados de TCE, pueden producir cáncer de hígado y/o del pulmón, mientras que en organismos superiores como seres humanos expuestos por largo tiempo a niveles altos de TCE en el agua potable o en el aire del ambiente de trabajo,

pueden provocar un desarrollo y aumento en la tasa de cáncer. Una vez en el cuerpo el TCE puede metabolizarse produciendo ácido dicloroacético (DCA), ácido tricloroacético (TCA), hidrato de cloral y 2-cloroacetaldehído, productos altamente tóxicos (ATSDR. 2016).

En estudios ambientales previos, se ha visto que el TCE tiene una vida larga en el medio ambiente dado que no es metabolizable por la comunidad microbiana del suelo. Sin embargo, se ha encontrado que el TCE es oxidado por bacterias nitrificantes en la presencia de su sustrato natural (Shah *et al.*, 1996).

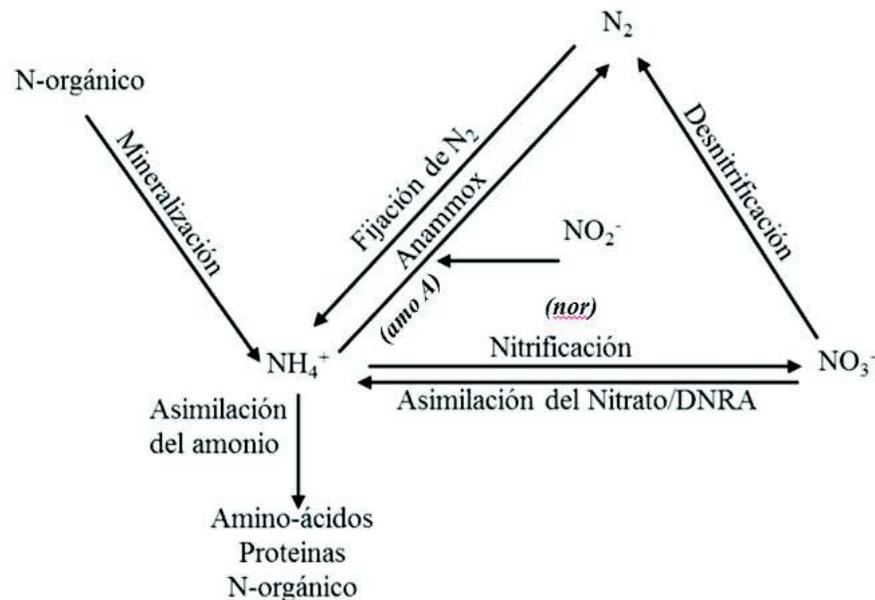
### **I.3 Bacterias nitrificantes para la remoción de TCE**

En el agua, la materia nitrogenada se puede encontrar en forma orgánica e inorgánica. La fracción inorgánica está representada por el nitrógeno amoniacal, que puede estar de forma libre como amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) o ionizada como ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Sin embargo, en las aguas residuales urbanas comúnmente se encuentra en forma de nitrógeno orgánico y amonio originados por el metabolismo de proteínas del cuerpo humano. Los compuestos nitrogenados inorgánicos son característicos de vertidos industriales y fertilizantes agrícolas, mientras que, los orgánicos se encuentran en los residuos domésticos y agrícolas (Tejero y Cuevas, 2003).

El creciente aumento de los procesos industriales, así como agrícolas, además del crecimiento exponencial de la población humana y la ampliación de la urbanización en los últimos años, han llevado a un peligroso aumento de las disposiciones de compuestos nitrogenados y clorados hacia el medio ambiente (Benedek *et al.*, 2016).

En los sistemas de depuración de aguas residuales, las bacterias oxidantes de amonio y nitrito de la familia *Nitrobacteraceae* son las principales responsables del proceso de nitrificación. Esta familia bacteriana comprende dos grupos dentro de ella: bacterias oxidantes de amonio (AOB) y las bacterias oxidantes de nitrito (NOB), por sus siglas en inglés, todas ellas son Gram negativas. Los distintos géneros que oxidan amonio son *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*; mientras que las que oxidan nitrito son *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrospira* (Campos, 2000; Terada *et al.*, 2013).

El crecimiento de las bacterias nitrificantes de amonio está limitado a la cantidad de amonio presente y su mecanismo de oxidación a nitrito está dada por la conversión a hidroxilamina por medio de la enzima amonio monooxigenasa (*amoA*), la cual está asociada a proteínas de membrana, seguido por la oxidación de la hidroxilamina a nitrito (*hao*), siendo este paso el que permite extraer energía a las bacterias oxidantes de amonio (Correa-Galeote, 2016) (Figura 2). Mientras que la oxidación del nitrito a nitrato por parte de las bacterias oxidantes de nitrito se produce por intermedios de reacción, y se realiza mediante la enzima nitrito oxidorreductasa (*nor*), el sistema de oxidación de nitrito de *Nitrobacter* está asociado a membrana (Campos, 2000).



**Figura 2.** Ciclo del nitrógeno (modificado de Correa-Galeote, 2016).

Bajo condiciones de laboratorio controladas, los procesos de nitrificación biológica pueden llegar a presentar distintos tipos de limitantes, por lo que es necesario conocer los aspectos esenciales que pueden llegar a afectar tales procesos.

Bazin *et al.* (1982) estudiaron las causas potenciales de la nitrificación incompleta en una columna de lecho fijo colonizada por cepas axénicas de *Nitrosomonas europaea* y *Nitrobacter agilis*, y concluyeron que no existía limitación por CO<sub>2</sub>. Sin embargo, se puede presentar una inhibición por O<sub>2</sub> debido a que las bacterias nitrificantes requieren una cantidad importante de oxígeno. El amonio y nitrito son la fuente de energía de las bacterias que oxidan amonio y de las que oxidan nitrito, respectivamente. Debido a esto es que se consideran los principales factores limitantes del crecimiento junto con el oxígeno (Hunik, 1994).

Por otra parte, en la limitación del crecimiento de las bacterias nitrificantes debido al pH se pueden diferenciar dos causas; la primera es que el pH afecta a la actividad enzimática, lo que provoca la consiguiente pérdida de actividad en las células; la segunda, es que la concentración de protones (H<sup>+</sup>) que afecta al equilibrio ácido-base de los substratos, siendo el pH óptimo de las bacterias nitrificantes entre 7.5 - 8.5 (Prosser, 1989). Al igual que para todas las bacterias, el crecimiento de las bacterias nitrificantes varía con la temperatura; el valor óptimo se sitúa en 26-30 °C. La temperatura, por lo tanto, afecta a los valores de las constantes de equilibrio ácido/base, gas/líquido, la solubilidad de las sustancias, los coeficientes de difusión y a la actividad enzimática (Pérez, 2002).

En 2004 la EPA publicó que la degradación de TCE por microorganismos metanótrofos en conjunto con una cepa pura de *Nitrosomonas europaea*, resultaba en la oxidación de este compuesto por las monooxigenasas que los microorganismos usaban para metabolizar sus substratos naturales, como el metano y amoniaco, respectivamente. Entre las enzimas más comúnmente asociadas al cometabolismo del TCE, predominan las monooxigenasas, que tienen una dependencia estricta de oxígeno molecular. El cometabolismo de TCE es catalizado por una enzima amonio monooxigenasa no específica, la cual, según un modelo descrito por Ely *et al.* (1995) incorpora la inhibición enzimática (causada por la presencia del cometabolito), la inactivación (resultado de la toxicidad de un cometabolito), y la recuperación asociada a la síntesis bacteriana de enzimas en respuesta a la inactivación. Dicho modelo fue posteriormente empleado para explicar la inhibición de la oxidación de amoniaco e inactivación enzimática por efecto de diferentes hidrocarburos alifáticos clorados (HACs) entre los cuales destaca el (TCE).

#### **I.4 Biodegradación de tricloroetileno**

El cometabolismo bacteriano se basa en la transformación o degradación de un compuesto que no provee una fuente de carbono o energía a la bacteria, sin embargo, en presencia de su sustrato natural durante el metabolismo, este compuesto es degradado o transformado por enzimas con las que presenta cierta afinidad (García y Peralta, 2008). En degradación sintrófica, también denominada cometabolismo, los microorganismos pueden oxidar o reducir compuestos tanto aerobia como anaeróbicamente (Hazen, 2010).

En el cometabolismo aerobio los contaminantes son oxidados mediante enzimas o un cofactor producidos durante el metabolismo bacteriano, mientras que el cometabolismo anaerobio el contaminante es reducido por una enzima o cofactor, sin embargo, en ambos casos el microorganismo no utiliza el compuesto tóxico ni como fuente de carbono ni como fuente de energía, sino que obtiene ambos a partir de otras sustancias. Así, la degradación de los compuestos tóxicos no aporta un beneficio aparente para el microorganismo y es el producto de reacciones catalizadas por enzimas que tienen otros usos en el organismo (García y Peralta, 2008). Sin embargo, la presencia del cosustrato en el medio no produce una respuesta inductora para que el microorganismo genere actividad enzimática, debido a que este proceso es colateral a la biodegradación del sustrato, el cual si genera una respuesta inductora para la actividad enzimática (García y Peralta, 2008).

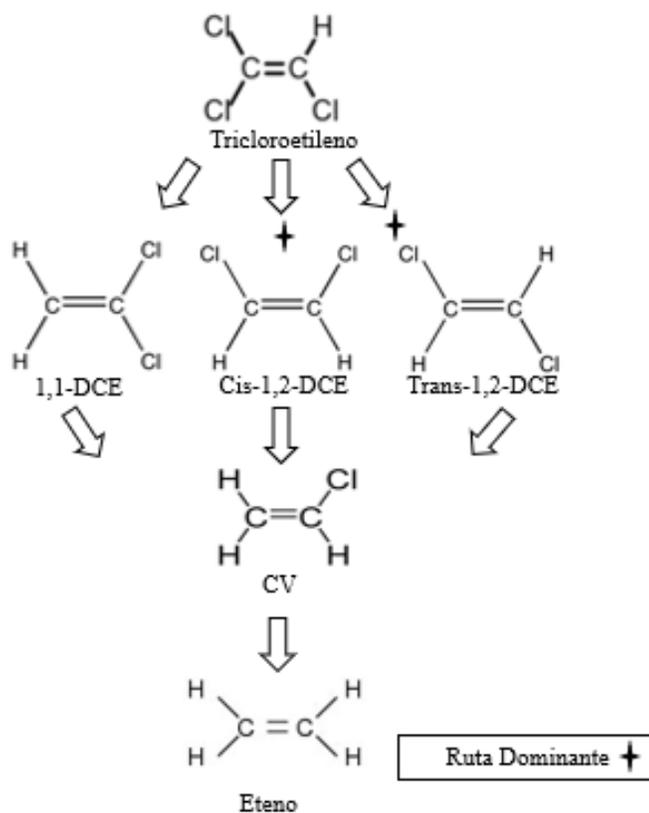
Procesos aerobios que conducen a la cometabolización mediante oxigenasas catabólicas, o procesos caracterizados por la acción de microorganismos metanotróficos y nitrificantes son capaces de degradar al TCE (Pankow y Cherry, 1995); mientras que procesos anaerobios como la deshalogenación reductiva, en los cuales los compuestos de tipo cloroetilénico que actúan como aceptores de electrones son transformados sucesivamente desde percloroetileno (PCE) hasta TCE, DCE, CV y eteno (Semprini *et al.*, 1995).

Tanto en condiciones aerobias como anaerobias se puede llegar a obtener una biorremediación cometabólica, sin embargo, las rutas y resultados por las cuales se dan estos procesos pueden llegar a diferir unas de otras. El cometabolismo aerobio producido por bacterias cuya fuente de energía puede ser el metano, propano, butano, n-pentano, n-hexano, tolueno,

amonio y cloruro de vinilo, pueden producir una rápida y completa decloración de un amplio grupo de compuestos clorados entre ellos el TCE (Frasconi *et al.*, 2013).

Compuestos clorados como el TCE, cloruro de vinilo (CV), *1,1*-Dicloroetenos (DCE's), *cis* y *trans*-policloroetano (PCE) pueden tomar el rol de aceptores de electrones en un proceso llamado halorespiración, proceso en que se utilizan enzimas deshalogenasas para reducir compuestos clorados tomando el papel de aceptores de electrones en el metabolismo bacteriano (Guerrero-Barajas *et al.*, 2014).

La biodegradación del tricloroetileno es realizada principalmente por reacciones de decloración como la hidrogenólisis reductiva la cual consiste en la sustitución de un átomo de cloro por un átomo de hidrógeno produciendo la liberación de una molécula de HCl (Figura 3.), la reducción hidrolítica también conocida como deshidrocloración, actúa formando un radical dicarbono al ser removidos dos átomos del halógeno, que posteriormente el radical dicarbono reacciona con átomos de agua, y finalmente la deshalogenación. Dicha reacción puede ocurrir de diferentes formas; una de estas llamada deshalogenación enzimática específica, donde el disolvente clorado actúa como aceptor de electrones, o deshalogenación no específica, la cual es llevada a cabo por acción cometabólica en donde el microorganismo sintetiza enzimas que degradan los compuestos clorados sin obtener un beneficio (Guerrero-Barajas *et al.*, 2014).



**Figura 3.** Ruta de biodegradación de tricloroetileno por hidrogenólisis (modificado de Guerrero-Barajas, 2007).

Estos tipos de biorremediación proporcionan un amplio campo de estudio debido a que puede ser simulada bajo condiciones de laboratorio controladas a concentraciones bajas de contaminantes. Kou *et al.* (2004) demostraron el cometabolismo aerobio del TCE en un acuífero utilizando como sustrato tolueno, obteniendo una degradación del 90%. El cometabolismo del TCE fue más eficiente cuando el tolueno se aplicó en concentraciones menores a 10 µg/L. Por otro lado, Kim *et al.* (2004) demostraron un incremento en la tasa de desaparición de los tóxicos mediante la biodegradación cometabólica *in situ* de los HACs por bioestimulación de la flora nativa. Rosas (2007) reportó que al incrementar la actividad sulfato reductora de la comunidad bacteriana en presencia de TCE es posible que se lleve a cabo la degradación del compuesto clorado, ya que resultados obtenidos en experimentos de degradación mostraron una reducción del 97% de TCE al cabo de 76 días de incubación. García (2010) realizó la biodegradación de

TCE a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en microcosmos bajo condiciones de lactato como sustrato obteniendo como resultado una biodegradación de hasta 89% en 8 días, y utilizando ácidos grasos volátiles como donadores de electrones, logrando degradar 70% de TCE a una concentración inicial de 260  $\mu\text{M}$ .

Posteriormente, en un biorreactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) por sus siglas en inglés, en sistema anaerobio inoculado con suelo marino y enriquecido con  $\text{SO}_4^{2-}$  para desarrollar biomasa sulfato reductora, dichos autores lograron porcentajes de biodegradación del 77% de TCE a una concentración de 260  $\mu\text{M}$  con un Tiempo de Retención Hidráulico (TRH) de 8 h y 74% para una concentración de 300  $\mu\text{M}$  con un TRH de 12 h. Más recientemente, Guerrero-Barajas *et al.* (2014), llevaron a cabo la degradación utilizando ácidos grasos volátiles como sustrato en botellas con sello de 125 mL y añadieron 55 mL de una mezcla de líquido y sedimento, dejando un espacio de 70 mL de headspace. El buffer y los contaminantes fueron añadidos al medio de cultivo y finalmente se agregaron 15g de sedimento húmedo para sellar los recipientes obteniendo porcentajes de degradación del 97.33% de TCE.

En las últimas décadas el TCE ha sido objeto de estudio debido a su amplio uso y distribución como contaminante, no obstante, se sabe que los solventes clorados de uno o dos carbonos son transformados por cometabolismo de bacterias nitrificantes obteniendo porcentajes de degradación mayores al 90% en biorreactores de lechos empacados y fluidizados (Arp *et al.*, 2001).

## **I.5 Sistemas de nitrificación biológica**

Los sistemas de nitrificación biológica consisten en biorreactores, los cuales proporcionan las condiciones idóneas (temperatura, pH, sustrato y oxigenación) para la proliferación de bacterias nitrificantes y utilizar así su potencial metabólico en procesos de nitrificación y desnitrificación (Tejero y Cuevas, 2003).

Existen diferentes sistemas en los cuales se puede desarrollar los procesos de nitrificación biológica, entre estos destacan principalmente dos tipos: los sistemas con biomasa en suspensión

y los sistemas con biomasa inmovilizada o adherida a una superficie específica (Tejero y Cuevas, 2003).

En los sistemas con biomasa en suspensión debido a la lenta velocidad de crecimiento de los microorganismos implicados en el proceso ( $0.045 \mu_{max}$ ). (especialmente los responsables de la oxidación del amonio y del nitrito), se requieren grandes tiempos de residencia celular e hidráulica y grandes volúmenes de aireación para una eliminación eficiente de los compuestos nitrogenados (Pérez, 2002; Tejero y Cuevas, 2003).

Por otro lado, se encuentran los sistemas con biomasa inmovilizada o adherida, en los cuales, los microorganismos responsables de la nitrificación se fijan en algún tipo de soporte de naturaleza orgánica o inorgánica, con una estructura porosa o rugosa que favorezca su colonización y alcanzan velocidades de nitrificación más elevadas (Pérez, 2002).

La inmovilización de los microorganismos sobre un soporte sólido se puede definir como el confinamiento físico de células en un soporte permitiendo que éstas mantengan la actividad deseada. Mediante la inmovilización, el tiempo de residencia de la fase líquida de un biorreactor que opera de forma continua, puede establecerse de forma independiente de la velocidad de crecimiento específico de los microorganismos que intervengan en dicho proceso. También es posible obtener mayores concentraciones de microorganismos para un mismo tiempo de residencia hidráulico, dado que estos quedan retenidos en el reactor. De esta manera, se pueden alcanzar capacidades de nitrificación mayores (Pérez, 2002).

Hasta la fecha, existen varios estudios que demuestran que los procesos con biomasa fija tienen ventajas sobre los sistemas de biomasa en suspensión para los procesos de remoción de contaminantes y desechos nitrificados. Ejemplo de ello es la disminución de la sensibilidad ante bajas temperaturas o el aumento de la tolerancia de la toxicidad en presencia de agentes inhibitorios, la ausencia de sustrato o elevadas concentraciones de compuestos tóxicos (Hunik *et al.*, 1994). La biomasa más interna posee, por tanto, un papel importante como biomasa tampón que permite al sistema enfrentarse mejor a condiciones adversas (Martins dos Santos *et al.*, 1998).

Para crear un proceso con células inmovilizadas es necesario fijar o adherir estas a un soporte o una superficie, es decir, formar biopelículas, lo que supone una ventaja para los

procesos de nitrificación. Otro aspecto importante que destacar de los sistemas de biomasa adherida es que, dada la reversibilidad del proceso, un correcto diseño de la operación de los reactores permite ejercer un control sobre la cantidad de biomasa inmovilizada, sin necesidad de detener la operación, característica muy favorable para el desarrollo de biopelículas (Martins dos Santos *et al.*, 1998).

Materiales capaces de proporcionar una gran superficie específica y estructura porosa la cual facilita la colonización de microorganismos son usados ampliamente como materiales de empaque para biorreactores, tales materiales son llamados lechos fijos, los cuales actúan como un soporte inmóvil y los lechos fluidizados, los cuales cumplen la función de un soporte en movimiento (Khavanin *et al.*, 2006).

Los sistemas más utilizados en la actualidad en el caso de la nitrificación biológica en el campo de las aguas residuales son; los filtros percoladores, los biodiscos, filtros sumergidos y lechos móviles (Calderón *et al.*, 2012). Debido a que el área específica de este tipo de sistemas es relativamente baja, la capacidad de nitrificación que tienen es limitada. Para mejorar dicha capacidad es necesario aumentar el área específica del soporte, aspecto que se consigue utilizando partículas más pequeñas. Este sería el caso de sistemas de lecho fijo y de lecho fluidizado, los cuales contienen partículas sólidas de diámetro reducido, entorno a las cuales se adhiere y desarrolla la biopelícula integrada por los microorganismos nitrificantes (Martins dos Santos *et al.*, 1998).



**Figura 4.** Proceso de formación de biopelícula (modificado de Borges *et al.*, 2015).

El proceso de formación de la biopelícula se divide en cuatro fases o etapas. La primera conocida como adherencia; consiste en que los microorganismos suspendidos en el líquido son transportados a la superficie por difusión creando una débil adherencia con la superficie sólida (Figura 4). La segunda etapa llamada colonización, en la cual se produce una adhesión irreversible por los microorganismos. La tercera etapa llamada crecimiento y maduración, que depende principalmente de la disponibilidad de nutrientes, por lo que la disponibilidad y difusión de estos tienen un peso fundamental en la formación de la biopelícula y finalmente; la etapa de dispersión, en la cual parte de las células que conforman la biopelícula son desprendidas al medio circundante (Stoodley *et al.*, 2002; Nadell *et al.*, 2009).

Una forma relativamente sencilla para observar y monitorear el desarrollo, así como la formación de una biopelícula, es mediante la utilización de técnicas microscópicas como microscopía electrónica de barrido (MEB) (Purswani *et al.*, 2011; Guisado *et al.*, 2016).

## II. HIPÓTESIS

La biomasa de bacterias oxidantes de amonio (AOB) tipo *Nitrosomona* spp. aislada a partir de un consorcio microbiano proveniente de una planta de tratamiento de agua residual, producida en un biorreactor continuo, será capaz de degradar TCE al ser establecida en un lecho fijo.

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la biorremediación de agua contaminada con tricloroetileno mediante un consorcio de bacterias oxidantes de amonio fijas en un biorreactor de lecho sintético empacado.

#### **III.1 Objetivos Específicos**

1. Determinar un consorcio de bacterias oxidantes de amonio tipo *Nitrosomonas* spp. mediante su aislamiento a partir de lodos activos de una planta de tratamiento de agua residual urbana.
2. Desarrollar biomasa de bacterias oxidantes de amonio en un biorreactor de flujo continuo.
3. Operacionalizar un biorreactor de lecho empacado con biomasa de bacterias oxidantes de amonio inmovilizadas para la degradación de TCE.
4. Determinar la eficiencia de biorremediación de agua contaminada con TCE.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1 Aislamiento y desarrollo de biomasa

Para llevar a cabo el primero objetivo se realizó una caracterización fisicoquímica de los lodos provenientes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas. Los valores fisicoquímicos determinaron la selección de la planta de tratamiento de agua residual para la obtención de las muestras de lodos que sirvieron como inóculo para el biorreactor donde se llevó a cabo el proceso de aislamiento y posteriormente la producción de biomasa de bacterias oxidantes de amonio (AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (NOB).

Los lodos provenientes de las plantas de tratamiento de agua residual urbana fueron; la primera, procedente de la planta *Los Lagos* ubicada en Hermosillo Sonora, la cual trata aproximadamente 5 millones de litros por día, con un sistema de tratamiento biológico de tanques aireado, anóxico y con sedimentación con un TRH de 33 horas. El segundo lodo evaluado fue proveniente de la planta *Domos*, ubicada en Ciudad Obregón, Sonora, la cual trata alrededor de 63 millones de litros por día, basada en un sistema de lagunas de oxidación aireadas, facultativas y de sedimentación, con un TRH de 24 horas. Ambas muestras de lodos fueron tomadas de la zona aerobia en frascos de plástico de 1 litro dejando un espacio de 5 cm entre la boca y la muestra para su posterior almacenamiento a 4°C por no más de 24 horas para su análisis.

La caracterización fisicoquímica que se realizó a dichos lodos consistió en: demanda química de oxígeno (DQO) que fue determinada por el método de dicromato de potasio mediante un digestor marca HACH (DRB 200) siguiendo la metodología del Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la cual se determinó por el método DBO<sub>5</sub>, donde la determinación de oxígeno inicial y final fue determinada por la técnica de Winkler siguiendo el procedimiento de Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). La DQO es la cantidad de oxígeno consumida en la oxidación química total de constituyentes orgánicos a productos inorgánicos finales. El grado en el cual los resultados de prueba se aproximan al valor teórico depende principalmente de qué tan completa es la oxidación. Un gran número de compuestos orgánicos

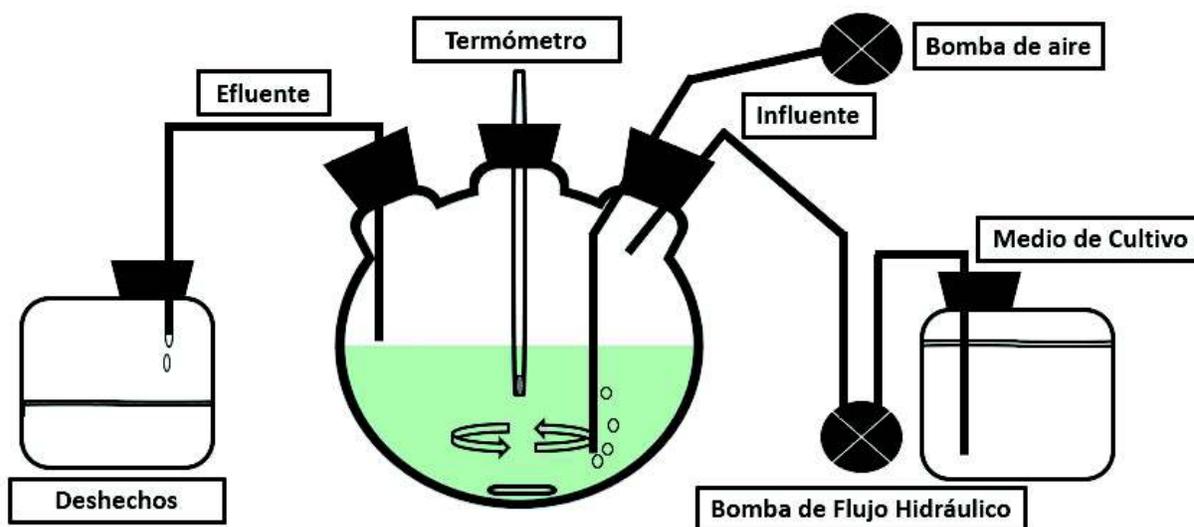
se oxidan en una proporción del 90 % al 100 %. Para aguas en las que estos compuestos predominan, tales como las descargas municipales, el valor de DQO es una medida real de la demanda de oxígeno teórica. (NMX-AA-030, 2012).

La DBO<sub>5</sub> determina los requerimientos relativos de oxígeno de aguas residuales, efluentes y aguas contaminadas, para su degradación biológica, expresa el grado de contaminación de un agua residual por materia orgánica degradable por oxidación biológica (NMX-AA-028-SCFI, 2001).

Por otra parte, la cantidad de sólidos presentes en los lodos fue determinada como indicador de la cantidad de biomasa y materia inorgánica presente, por lo que los sólidos totales (ST), sólidos totales volátiles (STV), sólidos totales fijos (STF), sólidos suspendidos totales (SSV), sólidos suspendidos volátiles (SSF) y sólidos disueltos totales (SDT) fueron determinados siguiendo la metodología de Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Los sólidos totales (ST) es el residuo que permanece en una cápsula después de evaporar y secar una muestra a una temperatura de  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  (NMX-AA-034-SCFI, 2015). Los sólidos totales volátiles (STV): cantidad de materia orgánica e inorgánica que se volatiliza por el efecto de la calcinación a  $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los sólidos totales fijos (STF) son la cantidad de materia que no se calcina. Sólidos suspendidos totales (SST) es el material constituido por los sólidos sedimentables, los sólidos suspendidos y coloidales que son retenidos por un filtro de fibra de vidrio con poro de  $1.5\text{ }\mu\text{m}$  secado y llevado a masa constante a una temperatura de  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sólidos suspendidos volátiles (SSV) son aquellos sólidos suspendidos que se volatilizan en la calcinación a  $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los sólidos disueltos totales (SDT) se refiere al material soluble constituido por materia inorgánica y orgánica que permanece como residuo después de evaporar y secar una muestra previamente filtrada a través de un filtro de fibra de vidrio con poro de  $1.5\text{ }\mu\text{m}$  a una temperatura de  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  siguiendo la metodología de Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

## IV.2 Diseño de un biorreactor de tanque agitado para el aislamiento y desarrollo de biomasa de bacterias nitrificantes de amonio (AOB) y bacterias nitrificantes de nitrito (NOB)

Se diseñó y montó un biorreactor de tanque agitado continuo con aireación, en el cual se simulaban las condiciones aptas para el aislamiento y el posterior crecimiento del consorcio de bacterias oxidantes de amonio (AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (NOB), el cual consistió en un matraz bola de 3 bocas marca KIMAX de 2.0 L de capacidad, la boca central fue equipada con un termómetro para monitorear la temperatura, el influente y el efluente se encontraban en las bocas laterales (Figura 5). El flujo hidráulico fue suministrado por una bomba peristáltica BIORAD Econo Pump Modelo EP1, a un flujo de 1 mL/min para evitar que la tasa de dilución fuera mayor que la velocidad de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) de  $0.045h^{-1}$  reportado por Reina *et al.* (1996) para *N. europaea*. La aireación se suministró por medio de una bomba de aire marca Elite 802. Durante el experimento se mantuvo una temperatura de 30°C con ayuda de una chaqueta de calentamiento y la agitación fue continua con una placa con agitador magnético.



**Figura 5.** Biorreactor de tanque agitado para el aislamiento de bacterias nitrificantes de amonio (AOB) y nitrito (NOB).

El biorreactor fue inoculado con 1.4 L de lodos activos seleccionados de la zona aerobia de la planta de tratamiento de agua residual urbana *Domos*. La alimentación del reactor se realizó con un medio de sales de amonio, sus componentes se pueden observar en la Tabla 1. (ATCC Medium: 2265) modificado de Farges *et al.*, (2012).

El pH del medio fue monitoreado tomando 10 ml del efluente con un potenciómetro (Hanna HI 2221), se mantuvo controlado a lo largo del experimento entre  $7.5-8 \pm 0.2$  agregando periódicamente NaOH 6M al medio.

**Tabla 1.** Medio de sales de amonio ATCC Medium: 2265 modificado (Farges *et al.*, 2012).

<b>Fórmula</b>	<b>Nombre</b>	<b>g/L</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de amonio	1
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio	0.3968
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio	0.05
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio	0.02
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre	0.0001
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotásico	0.0022
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dipotásico	2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de hierro	0.0015
	EDTA	0.0063

### IV.3 Monitoreo del aislamiento y desarrollo de biomasa

Después de ser inoculado el biorreactor, se tomaron muestras cada 24 horas de 120 mL del efluente y se analizaron por turbidimetría mediante un turbidímetro Hellige, Inc. De esta forma se observó el proceso del aislamiento y su posterior crecimiento, el cual se vio reflejado en un aumento de la turbidez de la muestra (Benedek *et al.*, 2016).

Mediante la cuantificación de SST y SSV se determinó la cantidad de materia orgánica e inorgánica dentro del reactor (Standard Methods for Examination of Water and Wastewater APHA, 2012).

#### **IV.4 Análisis de especies nitrogenadas**

Con el fin de dar seguimiento a la presencia y variación de las especies nitrogenadas presentes en el proceso de aislamiento y determinar el proceso de nitrificación en el biorreactor de tanque agitado y el consumo de amoníaco y su transformación a nitrito y nitrato, se llevaron a cabo análisis colorimétricos de especies nitrogenadas  $\text{NH}_3\text{-N}$  (nitrógeno amoniacal),  $\text{NO}_2\text{-N}$  (nitrito) y  $\text{NO}_3\text{-N}$  (nitrato), mediante un espectrofotómetro HACH DR5000 en celdas de 10 mL, siguiendo los protocolos para agua de mar, aguas naturales y aguas residuales provistos por el fabricante (APHA, 2012). Para la determinación de  $\text{NH}_3\text{-N}$  dentro del reactor y en el medio de crecimiento, se utilizó el método 8155 Salicylate Method Nitrogen Ammonia, para la determinación de  $\text{NO}_2\text{-N}$  se utilizó el método 8153 Ferrous Sulfate Method, HR Nitrite, y para determinar  $\text{NO}_3\text{-N}$  se utilizó el método 8039 Cadmium Reduction Method, HR Nitrate.

#### **IV. 5 Análisis moleculares para la determinación de bacterias AOB y NOB**

Para confirmar la presencia del consorcio bacteriano asociado a bacterias oxidantes de amonio (AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (NOB) provenientes del aislamiento y determinar si este había sido exitoso, se realizaron extracciones de material genético (ADN) en las muestras iniciales del biorreactor al tiempo cero después de ser inoculado (T0), después del aislamiento (T1) y al final de la producción de biomasa (T2) con el kit de extracción FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante.

La presencia de las bacterias oxidantes de amonio se confirmó mediante la amplificación de un fragmento de 465 pb de el gen 16S rRNA, utilizando los primers o cebadores CTO189fAB, CTO189fC, CTO654r (Kowalchuk *et al.*, 1997), mientras que para las bacterias oxidantes de nitrito se amplificó un fragmento de 322 pb de el gen *nxrA* con los primers nxrAF1370, nxrAR2843 (Wertz *et al.*, 2008), por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

en un termociclador BIORAD T-100 Thermal Cycler. Dicha experimentación se realizó en el laboratorio de Biorremediación II del Departamento de Ingeniería Química y Metalúrgica de la Universidad de Sonora.

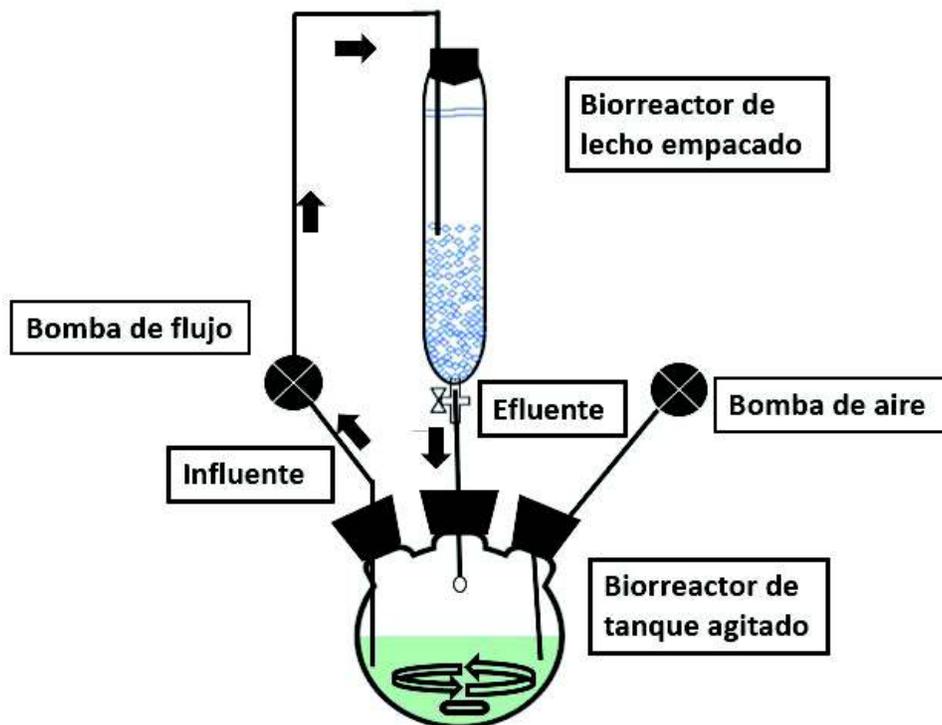
Las concentraciones finales para los reactivos de PCR para AOB fueron: 0.6  $\mu\text{M}$  para cada primer, 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 5% DMSO, 8ng/ $\mu\text{L}$  BSA, 1.5 U de Taq (Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase), 10X Hot Start PCR Buffer, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ . Con las siguientes condiciones de amplificación para el termociclador: 94°C 5min, seguido de 30 ciclos de 94°C 30s, 57°C 60s, 72°C 45s (+1s ciclo<sup>-1</sup>) con una extensión final de 72° C 7 min (Kowalchuk *et al.*, 1997). Mientras que las concentraciones finales de los reactivos para NOB fueron: 0.4  $\mu\text{M}$  para cada primer, 200  $\mu\text{M}$  de cada dNPTs, 1.75 U de Taq (Thermo Scientific Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase), 10X Hot Start PCR Buffer, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ . Con las siguientes condiciones de amplificación para el termociclador: 95 °C 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C 30s, 55°C 45s, 72°C 45s con una extensión final de 72°C 5 min (Poly *et al.*, 2008; Wertz *et al.*, 2008). Los productos de PCR fueron migrados en gel de electroforesis al 2% en TAE 1X, durante 80 min a 70 V. Se cargó 5  $\mu\text{L}$  de GeneRuler 1 kb DNA Ladder como marcador de peso molecular y 1  $\mu\text{L}$  de 6X DNA Loading Dye (Wertz *et al.*, 2008). Terminada la electroforesis se tiñó el gel en un baño con solución de bromuro de etidio y se visualizaron las bandas con ayuda de un fotodocumentador (Gel Doc™ XR+ Imaging System, Biorad) utilizando las indicaciones del fabricante.

#### **IV.6 Fijación de la biopelícula y diseño de biorreactor de lecho fijo**

Se empacó una columna de vidrio de 500 mL de capacidad, 22 cm de altura y 6.5 cm de diámetro con 60% de relleno usando como lecho hule espuma con un tamaño de 0.5  $\text{cm}^2$  (Figura 6), siguiendo la estrategia planteada por Pal *et al.* (2012).

Posteriormente se llevó a cabo el proceso de inoculación del cultivo de bacterias previamente aislado con la finalidad de producir una biopelícula sobre el lecho empacado. La columna fue conectada al reactor principal con ayuda de una bomba MasterFlex L/S modular econ.115v 600 rpm, la cual mantenía un flujo de alimentación estable de 1 mL/min y TRH de 12 h. El reactor se mantuvo conectado tanto el de tanque agitado como el del lecho empacado

(columna), suministrado por aire en continuo, un influente proveniente del reactor de tanque agitado hasta el reactor de lecho empacado, y de un efluente el cual se originó desde el reactor de lecho empacado y terminó al reactor de tanque agitado, con la finalidad de mantener una recirculación del consorcio microbiano y fomentar su fijación y la formación de la biopelícula sobre el lecho (Figura 6) (Shukla *et al.*, 2014).



**Figura 6.** Diseño de biorreactor para la formación y establecimiento de biopelícula.

Después de 100 días de recirculación del consorcio en suspensión aislado se tomaron 1.72 g de lecho (hule espuma) del biorreactor y se realizaron análisis para la determinación de sólidos suspendidos totales y Sólidos suspendidos volátiles para cantidad de materia orgánica fijada en el lecho.

## **IV.7 Evaluación de degradación de TCE**

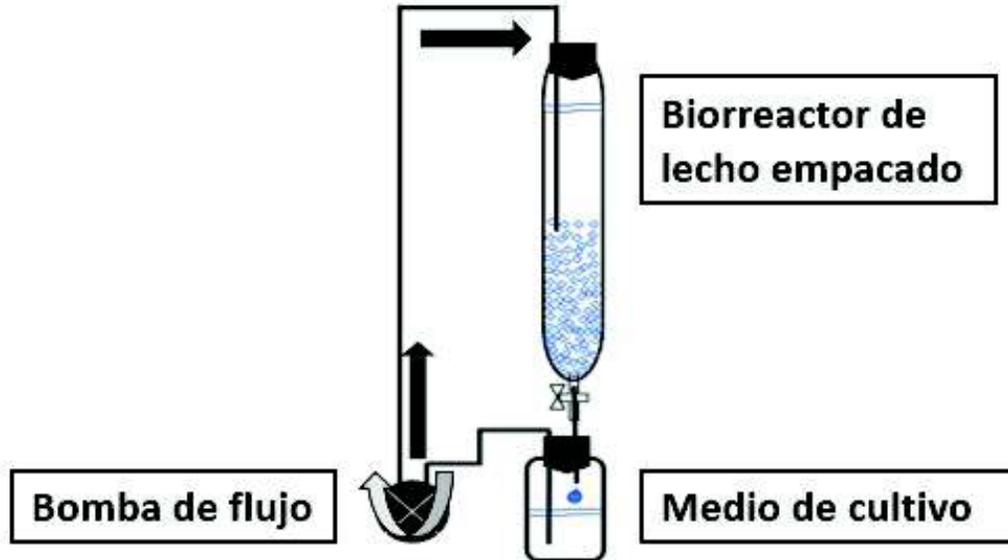
A partir de un stock de 99.5% de pureza de TCE se realizó una dilución en medio de sales de amonio con la finalidad de tener una concentración de 1000 mg/L y a partir de este se realizó una segunda dilución para tener una concentración final de 500 mg/L, la cual fue utilizada para los análisis de degradación de TCE.

### **IV.7.1 Evaluación de la degradación de TCE en viales**

Se llevó a cabo un experimento que consistió en tres réplicas de biomasa y biopelícula con TCE y tres blancos; para ello, en cada replica se centrifugó 1 mL de medio con bacterias (DO:  $0.371 \pm 0.0055$ ) proveniente del biorreactor de tanque agitado y se resuspendieron con 5 mL de medio de crecimiento con una concentración de TCE a 500 mg/L en viales de 25 mL con tapón de rosca, los cuales fueron colocados a temperatura ambiente (24°C) durante un periodo de 4 semanas, de los cuales se realizaron análisis cada 2 días por cromatografía de gases, siguiendo el protocolo descrito por Shukla *et al.* (2010).

### **IV.7.2 Evaluación de la degradación de TCE en el biorreactor de lecho sintético empacado**

Para evaluar la degradación de TCE en el biorreactor de lecho sintético empacado se llevó a cabo una recirculación de una disolución de 500 mg/L del compuesto disuelto en medio de cultivo en recipientes de 1L y se evaluó a través del tiempo por medio de cromatografía de gases (Figura 7) (Guerrero-Barajas *et al.*, 2014).



**Figura 7.** Biorreactor de lecho sintético empacado con hule espuma para la degradación del TCE.

Las extracciones de TCE del medio con biomasa a partir de los viales como del biorreactor fueron llevadas a cabo mediante la técnica de extracción líquido–líquido, utilizando *n*-pentano siguiendo el procedimiento del Standard Methods For Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Dicha técnica consistió en agregar 3 mL de *n*-pentano grado GC y se agitó con ayuda de un shaker por 1 min para lograr extraer TCE de la fase acuosa; posteriormente, se dejó reposar en frío para que se produjera la separación de las fases acuosa y solvente y una vez separadas ambas fases se procedió a recuperar la fase del solvente (pentano) (1.5 mL aprox.) y se depositó en un vial para ser inyectado en el cromatógrafo de gases.

#### **IV.7.3 Cuantificación de TCE por cromatografía de gases**

La cuantificación del TCE se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890B (Santa Clara, USA) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar SPB 624 Supelco Sigma (30 m x 0.25 mm d.i., 1.4  $\mu$ M de grosor de la película, Bellefonte, 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). (Wahman *et al.*, 2005; Guerrero-Barajas *et al.*, 2014).

Debido a que el TCE es un compuesto altamente volátil se tomaron medidas estrictas para evitar la pérdida de este, desde sellar correctamente con parafilm los viales donde se realizó la degradación hasta el momento de realizar las extracciones con *n*-pentano para su análisis por cromatografía de gases.

#### **IV.8 Análisis de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)**

Para llevar a cabo los análisis de Microscopia Electrónica de Barrido se tomaron muestras del lecho fijo con biopelícula formada antes y después de la adición de TCE y estas fueron almacenadas en tubos eppendorff para su fijación.

Primeramente, se llevó a cabo una fijación con glutaraldehído al 5% durante 24 horas en refrigeración (4°C), posteriormente se llevaron lavados con una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M hasta la desaparición del olor a glutaraldehído, seguido de la fijación con tetraóxido de Osmio (2 horas a 4°C). Posteriormente se lavó con disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (Calderón *et al.*, 2011; Purswani *et al.*, 2011) y se procedió a la desecación paulatina con acetona, del 30, 40, 50, 70, 80 y 90% hasta grado absoluto. Cada disolución se añadió por duplicado con un tiempo de reposo de 15 minutos, a excepción de la acetona absoluta, la cual tuvo un tiempo de reposo de 20 minutos (Figuroa-Torres *et al.*, 2014). Finalmente, las muestras fueron llevadas a desecación a punto crítico, seguido de recubrimiento con carbón y se observaron al microscopio electrónico de barrido marca JSM-7800F (Jeol, Akishima, Tokio) en el departamento de física de la Universidad de Sonora.

#### **IV.9 Análisis estadísticos**

Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el software IBM SPSS (Armonk, NY). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de diferencias significativas de Tukey post hoc ( $P < 0.05$ ).

## V. RESULTADOS

### V.1 Aislamiento y desarrollo de biomasa

Se compararon dos plantas de tratamiento de agua residual urbana con la finalidad de conseguir una fuente de inoculo capaz de aportar el consorcio bacteriano nitrificante. En base a los valores obtenidos se determinó que la planta de tratamiento de agua residual urbana *Domos* fue la mejor fuente de inoculo para el aislamiento del consorcio microbiano (Tabla 2).

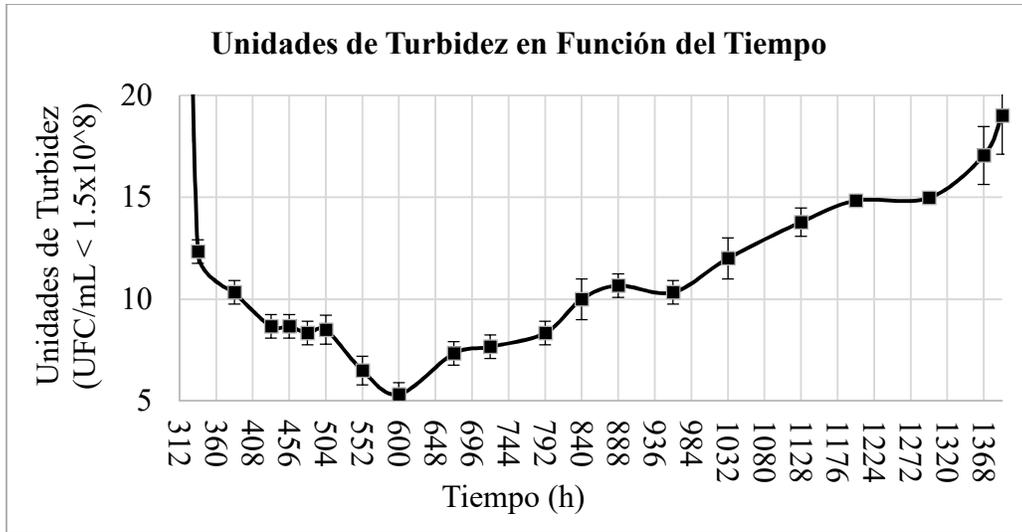
**Tabla 2.** Caracterización fisicoquímica del agua residual urbana de las dos plantas de tratamiento de agua seleccionadas.

Análisis	<i>Los Lagos</i>	<i>Domos</i>
DBO <sub>5</sub> mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	20 ± 0.2	71 ± 1 *
DQO mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	72 ± 17	238 ± 38 *
Sólidos Suspendidos Totales mg/L	2 635 ± 56	20 800 ± 8685 *
Sólidos Suspendidos Volátiles mg/L	1 661 ± 29	5 431 ± 2055 *
Sólidos Totales Fijos mg/L	974 ± 56	15 369 ± 6630 *

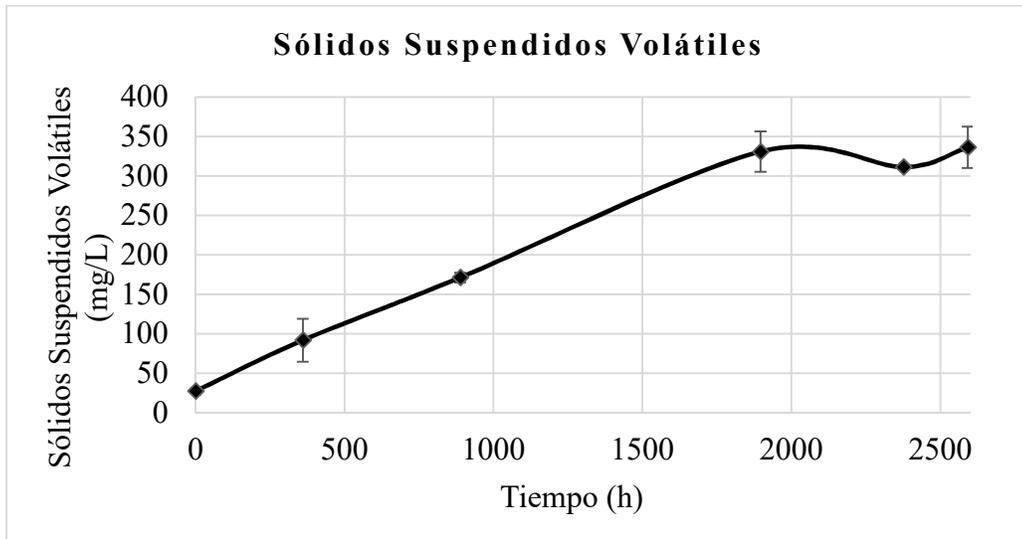
\* Diferencias significativas mediante el estadístico de análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de diferencias significativas de Tukey post hoc (P < 0.05).

### V.2 Monitoreo del aislamiento y desarrollo de biomasa

Conforme se generó el aislamiento, se presentó una remoción de la materia orgánica e inorgánica después de un periodo de tiempo de 600 horas (Figura 8) donde la muestra comenzó a aumentar su biomasa y turbidez, lo que indicó que el aislamiento había terminado y el crecimiento y producción de biomasa había comenzado.



**Figura 8.** Cinética de la turbidez durante el aislamiento hasta los 57 días dentro del biorreactor de tanque agitado.



**Figura 9.** Sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el biorreactor de Tanque Agitado en Función del Tiempo.

En la Figura 9 se puede observar cómo los sólidos suspendidos volátiles aumentaron en función del tiempo debido al aumento de la materia orgánica presente dentro del biorreactor de tanque agitado.

**Tabla 3.** Materia orgánica e inorgánica en el reactor de tanque agitado después de 128 días de crecimiento.

<b>Determinación</b>	<b>Valor</b>
Sólidos Suspendidos Totales (mg/L)	403 ± 55
Sólidos Suspendidos Volátiles (mg/L)	401 ± 8
Cantidad de materia orgánica (%)	99.3
Cantidad de materia inorgánica (%)	0.64

Los sólidos suspendidos totales incluyeron tanto la materia orgánica como inorgánica dentro del reactor y los Sólidos Suspendidos Volátiles definieron la cantidad de materia orgánica, en base estas dos determinaciones (Tabla 3). Se obtuvo el porcentaje de materia orgánica dentro del reactor de tanque agitado a los 128 días después del aislamiento el cual resultó en un 99.35%.

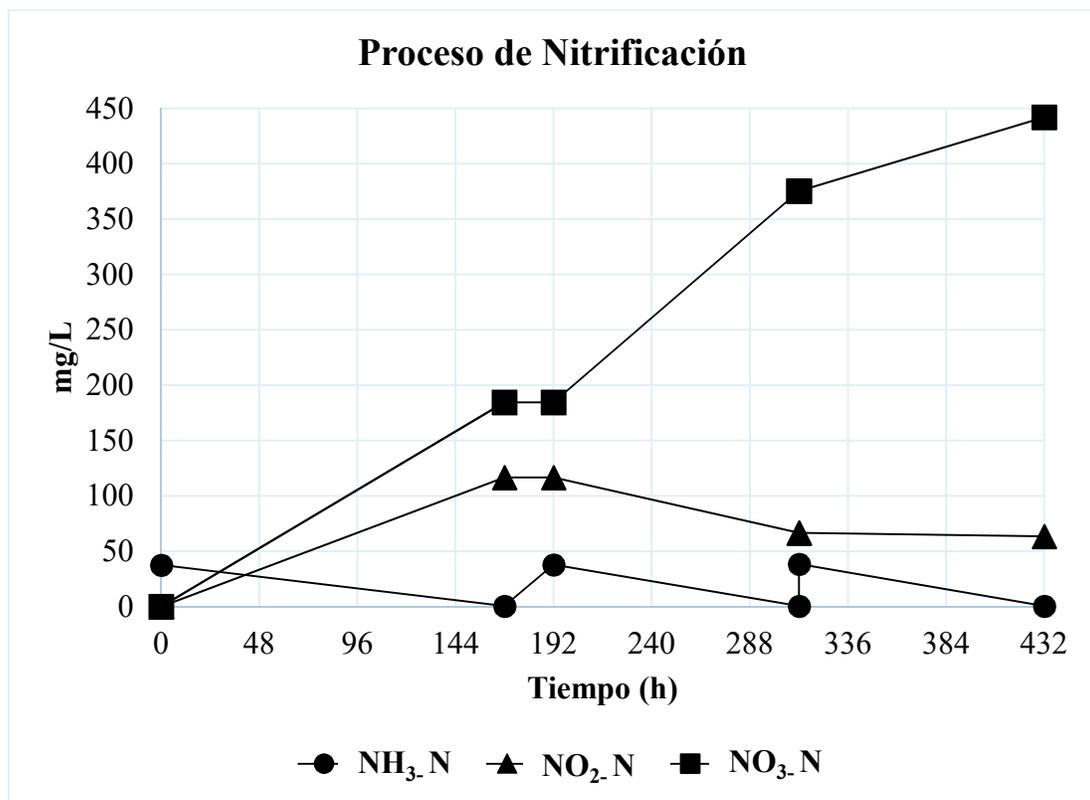
### **V.3 Especies nitrogenadas**

Para determinar el consumo del medio de cultivo de sales de amonio se llevaron a cabo análisis de especies nitrogenadas NH<sub>3</sub>-N (amoníaco), NO<sub>2</sub>-N (nitrito) y NO<sub>3</sub>-N (nitrato), los resultados de dichos análisis se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Especies nitrogenadas en el reactor de tanque agitado continuo y en el medio de cultivo.

Especies nitrogenadas mg/L	NH <sub>3</sub> -N (amoniaco)	NO <sub>2</sub> -N (nitrito)	NO <sub>3</sub> -N (nitrato)
Medio de cultivo	211.666 ± 42.524	ND	ND
Biorreactor	0.4 ± 0.1	11.666 ± 3.511	184.333 ± 84.913

ND = no detectado.

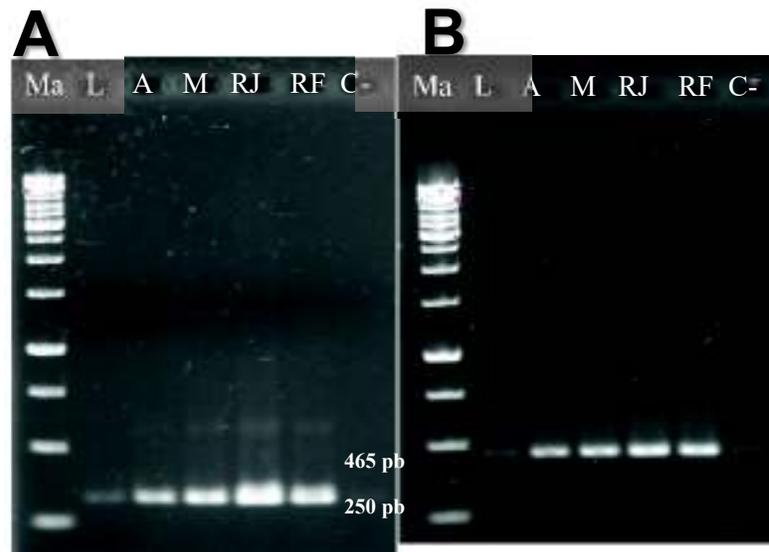


**Figura 10.** Proceso de nitrificación en el biorreactor de tanque agitado tipo batch después del aislamiento del consorcio bacteriano nitrificante (AOB) y (NOB).

Los análisis de especies nitrogenadas como  $\text{NH}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  y  $\text{NO}_3\text{-N}$  mostraron el consumo y transformación que se produjo el consorcio de bacterias oxidantes de amonio tipo *Nitrosomonas*, ya que estas al consumir el amonio en el medio de cultivo produjeron nitrito, el cual fue consumido por bacterias oxidantes de nitrito como lo hacen las bacterias tipo *Nitrobacter*, para finalmente producir nitrato como producto final. En la Figura 10. Fue posible determinar indirectamente la presencia de un consorcio bacteriano capaz de degradar amonio y nitrito similar a bacterias nitrificantes como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.

#### V.4 Confirmación molecular de la presencia de bacterias tipo AOB y NOB

Con el fin de determinar la presencia de bacterias AOB y NOB se realizaron procedimientos moleculares con ayuda de la herramienta de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos obtenidos de la amplificación fueron revelados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, donde se observaron las bandas correspondientes a las diferentes etapas de aislamiento y producción de biomasa, las cuales correspondieron con el tamaño del fragmento amplificado (Figura 11); para AOB se amplificó un fragmento de 465 pb de el gen 16S rRNA, mientras que para NOB se amplificó un fragmento de 322 pb del gen *nrxA*.



**Figura 11.** Amplificación con 2  $\mu\text{L}$  de ADN de NOB (A) Gen: *nrxA* (Fragmento de 322 pb) y AOB (B) Gen 16S rRNA (Fragmento de 465 pb).

Donde:

**Ma:** Marcador de peso molecular de 1 Kb.

**L:** Lodos activos muestra de la planta de tratamiento de agua residual *Domos* en Cd. Obregón la cual se utilizó como inóculo inicial.

**A:** Muestra tomada después del proceso de aislamiento.

**M:** Muestra tomada de matraces tipo batch.

**RJ:** Muestra tomada del reactor de 1.4 L y

**RF:** Muestra tomada del reactor de 0.7 L.

En la Figura 11 se observó que las bandas correspondientes al fragmento amplificado para NOB (A) y al fragmento amplificado para AOB (B) en cada una de las etapas, en la primera etapa que corresponde al inóculo inicial proveniente de la planta de tratamiento (L) en ambos geles se observó una banda tenue poco visible mientras que en las demás etapas se pudo observar bandas nítidas y claras, siendo las bandas pertenecientes a los reactores (RJ y RF) las de mayor intensidad.

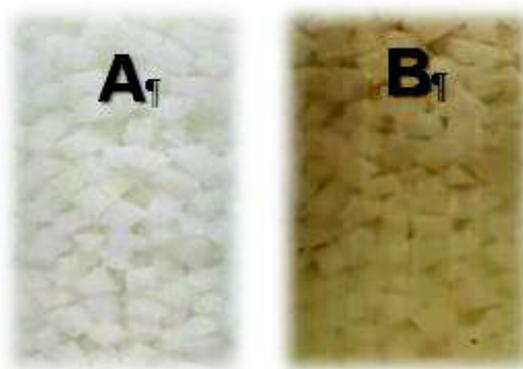
## **V.5 Fijación de la biopelícula y análisis de microscopía electrónica de barrido**

Con la finalidad de determinar la concentración de biomasa fijada en el lecho, se realizaron determinaciones Sólidos Suspendidos Totales y Sólidos Suspendidos Volátiles. Con ayuda de estos datos fue posible calcular el porcentaje de materia orgánica y a su vez la cantidad de materia orgánica por gramo de lecho (hule espuma) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Materia orgánica dentro del biorreactor de lecho empacado a los 100 días de recirculación del consorcio bacteriano.

Análisis	Valor
Sólidos suspendidos totales	1720 ± 10 mg/L
Sólidos suspendidos volátiles	933.33 ± 5.77 mg/L
Porcentaje de materia orgánica	54.26 %
Materia orgánica por gramo de lecho (Hule espuma)	0.026 g

En la Figura 12, se muestra el lecho sintético (hule espuma) dentro del biorreactor antes del proceso de formación de biopelícula (A) y después de 100 días de recirculación, referente al consorcio de bacterias nitrificantes aisladas en suspensión, en él se observa como el consorcio bacteriano fue establecido y formó la biopelícula (B).

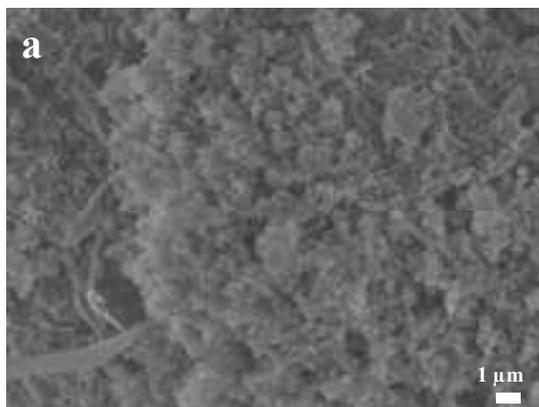


**Figura 12.** Biopelícula producida en el biorreactor de lecho sintético empacado (hule espuma), (A) lecho sintético antes de la formación de biopelícula y (B) lecho sintético después de la formación de biopelícula.

Las imágenes obtenidas a través de los análisis de microscopía electrónica de barrido mostraron una gran cantidad de materia orgánica en la muestra inicial de lodos activos, además de una clara formación de biopelícula en el lecho empacado por sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

Por otro lado, se observaron diferencias entre las muestras antes y después del tratamiento con TCE. En las muestras pre-tratamiento se observó la formación de biopelícula con morfologías bacterianas variadas (cocos y bacilos), mientras que en las muestras post-tratamiento se observaron áreas mayormente cubiertas, atribuido a un mayor desarrollo de biopelícula y con morfologías bacterianas principalmente de bacilos (Figura 13).

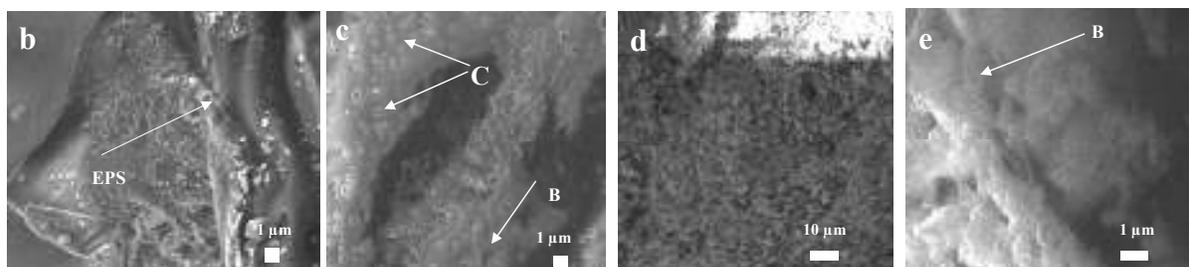
### Muestra de lodos activos



### Lecho empacado de poliuretano

#### 1) Pre-tratamiento

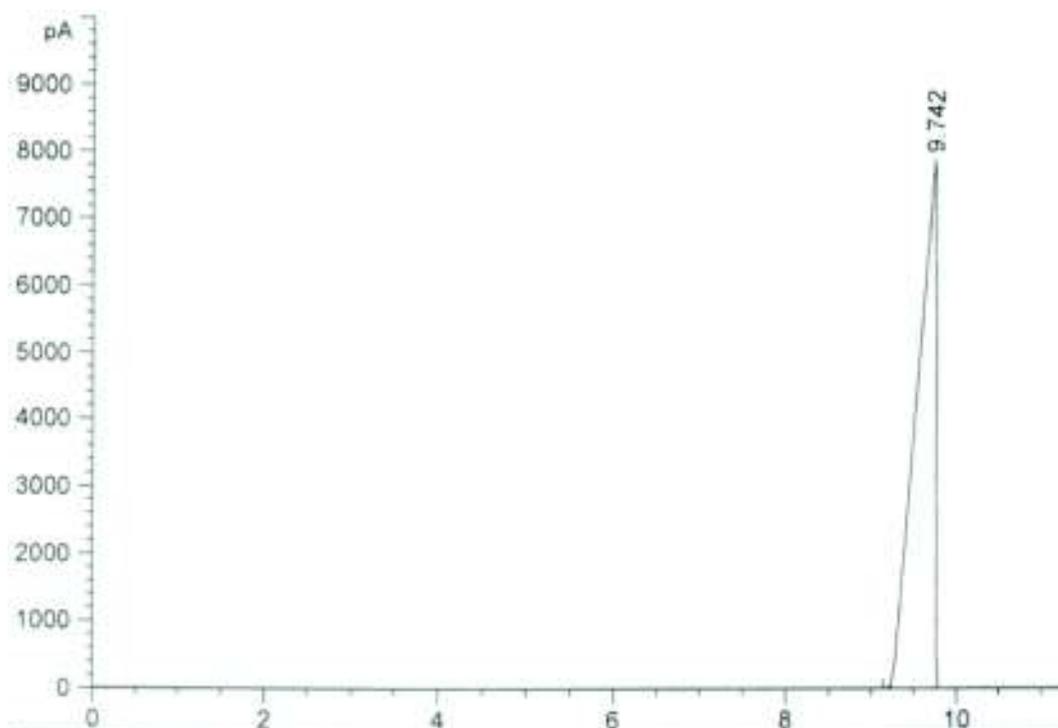
#### 2) Post-tratamiento



**Figura 13.** Micrografías de biopelícula formada en el lecho sintético mediante microscopía electrónica de barrido. (1) biopelícula presente antes del tratamiento con TCE, (2) biopelícula presente después del tratamiento con TCE. (a) muestra de lodos activos antes del aislamiento. (b) estructura del lecho parcialmente cubierta con biopelícula antes del tratamiento. (c) vista de cerca del lecho antes del tratamiento, se observan morfologías bacterianas similares a cocos (C) y bacilos (B) (d) estructura del lecho cubierta con biopelícula después del tratamiento con TCE (e) vista de cerca del lecho después del tratamiento, principalmente se observan morfologías mayoritariamente similares a bacilos (B).

## V.6 Degradación del TCE por el consorcio bacteriano nitrificante

Dado que el tiempo de retención puede llegar a variar según las características del equipo cromatográfico y las condiciones utilizadas, se realizaron pruebas preliminares que confirmaron el tiempo de retención del tricloroetileno en el cromatógrafo de gases. Para ello, se inyectó una muestra del stock al 99.5% de pureza, siendo en este estudio de 9.742 min (Figura 14).



**Figura 14.** Tiempo de retención del tricloroetileno (GC).

En las Tablas 6 se muestran los resultados en porcentaje de la degradación de una concentración inicial de TCE de 500 mg/L en función del tiempo en horas por el consorcio bacteriano nitrificante (AOB), en el cual a las 48 h en los viales se obtuvo un 42.51% de degradación de TCE. Tal degradación no aumentó significativamente con forme pasó el tiempo, ya que se monitoreó hasta las 216 h. Así mismo, la biodegradación por el consorcio bacteriano nitrificante (AOB) en el biorreactor de lecho sintético empacado mostró una degradación de 40.30 % a las 48 h con una tendencia similar a los datos obtenidos en los viales, con un ligero aumento en la degradación a las 144 h del 58.63 %.

**Tabla 6.** Degradación de tricloroetileno en función del tiempo en viales y biorreactor de lecho sintético empacado.

Tiempo (h)	% de degradación de TCE	
	Viales	Biorreactor de lecho sintético empacado
0	0	0
48	42.51 ± 4.84 <sup>*a</sup>	40.30 <sup>**a</sup>
96	ND	56.64 <sup>**</sup>
144	43.97 ± 0.80 <sup>*a</sup>	58.63 <sup>**b</sup>
216	46.47 ± 0.93 <sup>*</sup>	ND

ND: no determinado. <sup>\*</sup>Promedio de tres determinaciones ± desviación estándar (datos corregidos con base a la tasa de volatilización de TCE). <sup>\*\*</sup>Una réplica. Los valores en cada fila con diferentes letras (a-b) indican una diferencia significativa (p<0.05).

## VI. DISCUSIÓN

### VI.1 Caracterización fisicoquímica de las aguas residuales para la selección del inóculo

Las aguas residuales contienen una elevada concentración de materia orgánica y otros nutrientes, los cuales son utilizados por las bacterias como fuente de carbono y energía para su propio metabolismo, crecimiento y producción (Bitton, 2011). Las bacterias nitrificantes se encuentran en una gran variedad de hábitats, incluyendo agua dulce (agua potable y aguas residuales), agua de mar, agua salobre y en el suelo. Las principales especies presentes en los lodos activos son autótrofas, es decir, utilizan el dióxido de carbono o carbono inorgánico como fuente de carbono para la síntesis de material celular. Por cada molécula de dióxido de carbono asimilado, se oxidan aproximadamente 30 moléculas del ion amonio o 100 moléculas de nitrito (Gerardi, 2002). En este sentido, los resultados de la evaluación de las plantas de tratamiento de aguas residuales con el fin de encontrar la mejor fuente de inóculo con mayor carga biológica, demostraron grandes diferencias entre una planta y otra, siendo la planta *Domos* de Cd. Obregón la que demostró una diferencia significativa mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de diferencias significativas de Tukey post hoc ( $P < 0.05$ ) en todos los valores de los análisis fisicoquímicos. Estas diferencias se atribuyeron tanto al volumen de capacidad de cada planta, la cantidad de materia orgánica y nutrientes proporcionados por el influente, el tiempo de retención hidráulico y los sistemas de aireación. Todas estas características proporcionaron el mejor ambiente para el crecimiento y proliferación de las bacterias (Bitton, 2011).

Los valores obtenidos de los lodos activados en la planta de tratamiento *Domos* de DQO y DBO<sub>5</sub> fueron de 238 mg/L y 71 mg/L, respectivamente. En el caso de los Sólidos Suspendidos Totales y Sólidos Suspendidos Volátiles dieron como resultado 5431 mg/L y 15369 mg/L, respectivamente, estos datos pueden compararse con los reportados por Leyva-Díaz *et al.* (2016). Los autores trabajaron en un sistema de tratamiento de agua residual localizada en Granada, España, con una DQO: 185.80 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, DBO<sub>5</sub>: 73.50 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, SST: 65.47 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

Los valores obtenidos en este estudio se encuentran dentro de los rangos reportados por otros autores y demostraron ser una fuente de inóculo idónea para los procesos de remoción de contaminantes analizados en este estudio.

## **VI.2 Aislamiento y desarrollo de biomasa**

Una vez que se llevó a cabo el aislamiento en el biorreactor de tanque agitado, la concentración de bacterias nitrificantes de amonio y de nitrito aumentó debido a la remoción de materia orgánica e inorgánica perteneciente a la muestra inicial, la cual presentaba una gran y diversa comunidad bacteriana. De este modo, mediante el suministro de medio de cultivo de sales de amonio sin el exceso de materia orgánica e inorgánica dentro del biorreactor, el consorcio bacteriano referente a bacterias nitrificantes fue favorecido y tuvo la capacidad de crecer y proliferar sin ningún tipo de restricción o inhibición; este crecimiento se midió a lo largo del tiempo mediante los análisis de SSV por los cuales, se pudo determinar la cantidad de materia orgánica dentro del biorreactor a través del tiempo.

La concentración inicial de amonio en forma de  $\text{NH}_4\text{-N}$  con la que se alimentó el biorreactor continuo de tanque agitado de 1.7 L fue de  $211.66 \pm 42.524$  mg/L. En un estudio publicado por Pérez *et al.* (2002) se reportó una concentración de alimentación de amonio de 300 mg/L cuando trabajo con un biorreactor nitrificante de lecho fijo de 2 L de capacidad para la degradación de desechos nitrogenados, las cuales consideraron los autores fueron las concentraciones idóneas para la alimentación de consorcios bacterianos nitrificantes.

Conforme se obtuvo el aislamiento deseado, se presentó una remoción de la materia orgánica e inorgánica, después de un periodo de tiempo de 600 horas las muestras comenzaron a aumentar su biomasa y turbidez, lo que indicó que el aislamiento había terminado y el crecimiento y producción de biomasa había comenzado, ya que durante el proceso de aislamiento únicamente se suministró medio de sales de amonio para el crecimiento de bacterias oxidantes de amonio, lo que resultó idóneo ya que las demás bacterias no podían crecer sin fuente de carbono y estas fueron expulsadas del sistema en el proceso de remoción. Parte de este proceso se atribuyó mayormente a las condiciones proporcionadas por el biorreactor, como el flujo, la aireación y la temperatura, siendo esta última una de las características más importantes,

la cual se mantuvo a 30°C. En 2014, Zornoza *et al* determinaron que la temperatura en un biorreactor conformado por bacterias nitrificantes tipo AOB y NOB con la finalidad de tener un consorcio con capacidad de remoción de compuestos nitrificados en un rango de 14-29 °C, no presentó una influencia significativa sobre la abundancia de este tipo de bacterias.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron un porcentaje de materia orgánica del  $49.47\% \pm 0.16$  antes del aislamiento, es decir de los lodos activos y después del aislamiento de  $91.28\% \pm 0.10$ . En este sentido, Guerrero-Barajas *et al.* (2007) determinó el porcentaje de materia orgánica en tres diferentes muestras de sedimento para la biodegradación de TCE mediante la misma técnica analítica. Los resultados que se obtuvieron en ese trabajo fueron de  $59.55\% \pm 1.21$ ,  $61.80\% \pm 0.44$  y  $63.41\% \pm 0.36$ , porcentajes mayores a los lodos analizados en el presente trabajo, sin embargo, demostraron ser una fuente de inóculo idónea ya que después del proceso de aislamiento la cantidad de materia orgánica superaba el 90%.

Cabe destacar que una vez aislado el consorcio bacteriano se optó por extraer 100 mL de caldo de cultivo con bacterias en suspensión para su análisis y añadir seguidamente 100 mL de medio fresco cuando se agotaba el amonio. De este modo se transformó el biorreactor a una operación semi-continua.

### **VI.3 Especies nitrogenadas**

Una de las formas más comunes para la eliminación de compuestos nitrogenados en plantas de tratamiento de aguas residuales es a través de microorganismos capaces de llevar a cabo un proceso de nitrificación biológica donde las bacterias oxidan amonio a nitrito y este hasta nitrato (Tejero y Cuevas, 2003). Sin embargo, estudios demuestran que existen otros procesos microbiológicos por que se pueden llevar a cabo los procesos de nitrificación en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, tales como la desnitrificación aerobia y nitrificación heterótrofa (Robertson y Kuenen, 1990) y la oxidación anaerobia de amonio (Mulder *et al.*, 1995) o desnitrificación por bacterias autótrofas (Bock *et al.*, 1995).

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de nitrificación del consorcio bacteriano aislado en un biorreactor de tanque agitado continuo cuyos resultados mostraron un proceso de

nitrificación de más del 90% transformando el medio de cultivo conformado principalmente por sales de amonio ( $\text{NH}_3\text{-N}$ )  $211.66 \pm 42.52$  mg/L a nitrito ( $\text{NO}_2\text{-N}$ )  $11.666 \pm 3.51$  mg/L y este a nitrato ( $\text{NO}_3\text{-N}$ )  $184.333 \pm 84.91$  mg/L. Tejero y Cuevas (2003) determinaron la cantidad de amonio nitrito y nitrato en un biorreactor de biopelícula aerobio de lecho sumergido fijo y membranas de microfiltración, las cuales dieron como resultado 20 mg/L para amonio ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) mientras que para nitrito y nitrato las concentraciones fueron muy bajas, la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) fueron de 0.4 -2.3 mg/L, mientras que las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) presentaron concentraciones entre 15 y 30 mg/L. estos valores se consideran normales ya que el biorreactor fue alimentado con agua residual bruta, mientras que este proyecto el biorreactor fue alimentado con medio de cultivo rico en sales de amonio con la finalidad aislar y generar biomasa de un consorcio bacteriano nitrificante, de aquí los altos valores en las concentraciones de amonio lo que generó una acumulación de nitrito y nitrato en etapas tempranas del aislamiento, sin embargo conforme avanzaba el aislamiento estos valores se fueron mostrando más estables.

Pérez *et al.* (2002) evaluó en un biorreactor de nitrificación biológica de lecho fijo las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato obteniendo una nitrificación de hasta 90% con valores iniciales de amonio de 300 mg/L, nitrito 100 mg/L y nitrato de 170 mg/L, aumentando los tiempos de residencia hidráulico la concentración de amonio se redujo mientras que la de nitrito tuvo ligeras variaciones y la concentración de nitrato aumentó. Esto se debió a que al ser transformado el amonio por bacterias nitrificantes tipo AOB a nitrito éste fue rápidamente transformado a nitrato por bacterias nitrificantes tipo NOB, de esta manera se completó el proceso de nitrificación biológica.

#### **VI.4 Confirmación molecular de la presencia de bacterias AOB y NOB**

La utilización de PCR permite la amplificación de poblaciones bacterianas a partir del ADN extraído de muestras provenientes del medio ambiente sin la tarea de aislar o cultivar (Correa-Galeote, 2016). En este trabajo se utilizó la PCR para determinar la presencia del consorcio bacteriano AOB y NOB en todas las etapas del proceso; desde el inóculo inicial, durante y después del aislamiento. Para AOB se amplificó un fragmento de 465 pb de el gen 16S rRNA

utilizando primers específicos CTO189fAB, CTO189fC y CTO654r descritos por Reboleiro-Rivas *et al.* (2014) para determinar la abundancia de bacterias oxidantes de amonio (AOB) en un biorreactor de membrana fluidizado. Sin embargo, para tener un análisis más profundo de la comunidad microbiana dichos autores realizaron un análisis de secuenciación masiva mediante 454-pyrosequencing utilizando primers modificados (28F/519R), teniendo como objetivo las regiones hipervariables *V1-V3* del gen 16S rRNA.

Para NOB se amplificó un fragmento de 322 pb del gen *nrxA* utilizando los primers *nrxAF1370*, *nrxAR2843* descritos por Poly *et al.* (2008), que posteriormente Wertz *et al.* (2008) utilizó para determinar la diversidad y abundancia de *Nitrobacter* mediante DGGE.

El objetivo de los análisis moleculares en esta etapa fue detectar la presencia de los consorcios bacterianos AOB y NOB por lo que, para cumplir el objetivo fue suficiente la realización de PCR punto final. Sin embargo, para futuros estudios sería idóneo evaluar la abundancia y estructuras de estas comunidades, tal como realizó Zornoza *et al.* en 2014, quienes utilizaron la técnica de hibridación de fluorescencia in situ (FISH) con sondas marcadas con fluoróforos para la identificación de la comunidad general de bacterias en sedimento, así como de AOB y NOB.

## **VI.5 Fijación de la biopelícula y análisis de microscopía electrónica de barrido**

Para la formación de una biopelícula en un soporte es necesario que éste cumpla con ciertas características como proporcionar una gran superficie específica de contacto y estructura porosa lo cual facilitó la colonización de microorganismos (Khavanin, *et al.*, 2006). En este proyecto se utilizó hule espuma como material de soporte para la formación de biopelículas debido a que presentó todas las características necesarias para su utilización.

Las formas bacterianas encontradas en la biopelícula formada en el lecho fijo pueden compararse con las encontradas por Mora y Bravo (2016), quienes observaron por medio de microscopía electrónica de barrido la formación de una biopelícula anódica, la cual fue alimentada con agua residual de dos diferentes plantas de tratamiento una doméstica y la otra industrial y llegaron a la conclusión de que ambas biopelículas eran constituidas por diferentes tipos de bacterias. Para la biopelícula formada que fue alimentada con agua residual industrial

los autores reportaron la presencia de bacilos con extremos redondeados y achatados, bacterias filamentosas y espiroquetas, mientras que la biopelícula formada que fue alimentada con agua residual doméstica reportaron la presencia de formas que se asemejan a bacilos cocobacilos y cocos.

Las bacterias nitrificantes que pueden estar en el consorcio bacteriano aislado como *Nitrosomonas* spp. y *Nitrobacter* spp. presentan morfologías en forma de bacilos (Sinha y Annachhatre, 2006; Fang *et al.*, 2010), por lo que la presencia de morfologías bacilares en la biopelícula después de tratamiento con TCE podría deberse a bacterias tipo *Nitrosomonas* spp, las cuales son capaces de cometabolizar TCE y permanecer adheridas al lecho fijo (Rasche *et al.*, 1991).

## **VI.6 Diseño del biorreactor de lecho sintético empacado**

Pérez *et al.* (2002) utilizaron un reactor a escala piloto de aproximadamente 8 L de volumen total, y tres reactores a escala laboratorio de 0.65 mL de volumen total, donde desarrollaron biopelículas de la bacteria *Nitrosomonas europaea* (ATCC 19718) y *Nitrobacter winogradskyi* (ATCC 25391) inmovilizadas sobre cuentas de poliestireno (Biostyr®) en condiciones de oscuridad debido a que ciertas bacterias nitrificantes presentaban fotofobia, así como una temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH  $8.1 \pm 0.1$  y una velocidad de agitación de 300 rpm. Los autores observaron que, durante el periodo de formación de la biopelícula, al inicio, éste se centraba en la parte inferior del lecho, para posteriormente desplazarse al resto de este. A diferencia de los biorreactores comunes, los cuales están diseñados con un flujo ascendente, el biorreactor diseñado en el presente trabajo tenía un flujo descendente para un mejor manejo operacional, donde se observó que el origen de la formación de la biopelícula fue en la parte superior del lecho. Así, tal diferencia en la orientación de los flujos sugirió que puede llegar a afectar el origen de la formación de la biopelícula, pero no su funcionalidad.

Tejero y Cuevas (2003) emplearon rejillas de polietileno como material de soporte para la fijación de la biopelícula en un biorreactor de nitrificación biológica de 70 L para estudiar la eliminación biológica de compuestos nitrogenados en aguas residuales urbanas. Por otra parte, Reboleiro-Rivas (2014), utilizó polietileno de alta densidad como soporte para formar

biopelícula en un biorreactor de membrana fluidizada para el tratamiento biológico de aguas residuales.

Comparar la capacidad de degradación o de nitrificación entre biorreactores no es fácil debido a factores tales como las condiciones de operación, como son la temperatura, pH, oxígeno disuelto, flujo, entre otras. Además, al referir la capacidad de degradación o nitrificación al volumen del reactor, no siempre se tiene en cuenta la relación volumen de lecho / volumen de reactor, siendo que los valores de capacidad de degradación están directamente relacionados en el área específica (Martins dos Santos *et al.*, 1998; Campos, 2000; Pérez, 2002).

### **VI.7 Degradación del TCE por cromatografía de gases**

Malachowsky *et al.* (1994) utilizaron un inóculo único de *Rhodococcus*, el cual no tuvo la capacidad de degradar una concentración mayor de 10 mg/L de TCE, sin embargo, cuando el inóculo estaba constituido por diferentes especies de *Rhodococcus* este era capaz de degradar concentraciones de hasta 150 mg/L. Por otra parte, Cutright y Meza (2007), determinaron que utilizando un consorcio mixto formado por *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Nocardia parafinae*, las cuales fueron adaptadas previamente a TCE, demostraron tener la capacidad de degradar una concentración de 228 mg/L del compuesto en 24 h en condiciones aerobias. Por esta razón es de gran importancia la utilización de cultivos mixtos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron una degradación de 40.3 % de una concentración inicial de 500 mg/L de TCE en el biorreactor de lecho sintético empacado, a las 48 horas, mientras que en los viales presentó una degradación de TCE similar de 42.51 % a las 48 horas. Sin embargo, al ir progresando el tiempo de residencia la degradación de TCE en el biorreactor de lecho empacado aumentó hasta 58.63 % a las 144 y en los viales hasta 46.47 % a las 216 horas. Tales diferencias en el tiempo de degradación se pueden atribuir principalmente a que el consorcio bacteriano no fue adaptado previamente al contaminante, además de que al fijar las bacterias en un soporte como hule espuma aumentó su concentración al formar una biopelícula, aumentando su eficiencia al degradar TCE comparada con los viales los cuales solo tenían bacterias en suspensión.

Zornoza *et al.* (2011) demostraron que un consorcio compuesto por bacterias nitrificantes el cual fue expuesto a las características de toxicidad de contaminantes clorados, los tiempos en que los microorganismos degradaron por completo el contaminante fue mayoritariamente más corto y esto redujo los tiempos de degradación. Además, determinaron que los niveles altos de toxicidad no presentaron efectos negativos sobre la abundancia de bacterias nitrificantes como AOB y NOB.

## VII. CONCLUSIONES

1. De las dos plantas de tratamiento de agua residual urbana analizadas, la que resultó con una mayor carga orgánica para determinar el inoculo para el aislamiento del consorcio bacteriano fue la planta *Domos*, cuyos valores para DQO, DBO<sub>5</sub> y sólidos fueron siempre mayores que la planta *Los Lagos*.
2. Después del proceso de aislamiento y producción de biomasa en un biorreactor continuo de tanque agitado se logró exitosamente aislar un consorcio bacteriano nitrificante compuesto por bacterias oxidantes de amonio (AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (NOB).
3. Se diseñó un biorreactor de lecho sintético (hule espuma) empacado con una biopelícula de bacterias nitrificantes oxidantes de amonio (AOB) y bacterias oxidantes de nitrito (NOB) con la capacidad de degradar el TCE.
4. La eficiencia de biorremediación de agua contaminada con TCE alcanzó niveles similares a los reportados en otros estudios.

## VIII. RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones y aplicaciones para la obtención de mejores resultados, escalar el diseño de biorreactor a una planta piloto podría mostrar resultados más claros y proporcionar porcentajes de degradación mayores, lo que daría un gran avance hacia una depuración más eficiente de los residuos tóxicos. Por otra parte, evaluar la diversidad bacteriana perteneciente a las poblaciones dentro del consorcio microbiano con técnicas moleculares tales como secuenciación masiva de nueva generación e hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) podrían reflejar la dinámica y distribución poblacional presente. Finalmente, la optimización de las técnicas para la evaluación de la degradación de TCE por cromatografía de gases como el uso del espacio gaseoso pudiera arrojar resultados más precisos reduciendo pérdidas por volatilidad.

## IX. LITERATURA CITADA

- Agencia para sustancias toxicas y el registro de enfermedades. (ATSDR) 2016. Resúmenes de salud pública tricloroetileno.
- American Public Health Association. (APHA) 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.
- Arp, D., C. Yeager, y M. Hyman. 2001. Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation* 12: 81–103.
- Bazin, M. J., D. J. Cox, y R. I Scott. 1982. Nitrification in a column reactor: Limitations transient behaviour and effect of growth on a solid substratre. *Soil Biol. Biochem.* 14: 477-487.
- Beamer PI., C. E. Luik, L. S. M. E. Martínez y A. E. Sáez. 2012. Concentration of trichloroethylene in breast milk and household water from Nogales, Arizona. *Mel and Enid Zuckerman College of Public Health, University of Arizona* 85: 724.
- Benedek, P., T. Tibor, S. Erzsebet, F. Michel y K. Levente. 2016. High cell density cultivation of the chemolithoautotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Folia Microbiol.* 61: 191-198. DOI 10.1007/s12223-015-0425-8.
- Bitton, G. 2011. Wastewater microbiology. 746 p. Hoboken, NJ. John Wiley and Sons.
- Bock, E; H. Koop, H. Harms y B. Harles. 1995. The biochemistry of nitrifying organics. Variations in Autrophic life, Harcourt Brace Jovanovich Publ., New York, USA.
- Calderón K., B. Rodelas, N. Cabirol, J. Gonzáles-López, A. Noyola. 2011. Analysis of microbial communities developed on the fouling layers of a membrane-coupled anaerobic boreactor applied to wastewater treatment. *Bioresource Technology* 120: 4618-4627.
- 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.
- Campos, J.L. 2000. Eliminación biológica de nitrógeno en unidades de alta carga. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Correa-Galeote, D. 2016. Biodiversidad y Ecología Funcional de Bacterias Desnitrificantes. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Estación Experimental del Zaidín. Granada, España.

- Cutright T. J and L. Meza. 2007. Evaluation of the aerobic biodegradation of trichloroethylene via response surface methodology. *Environment International* 33(3): 338-345. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.11.012>
- Environmental Protection Agency (EPA). 2001. Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report. 10th Edition. Office of Solid Waste and Emergency Response.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2004. Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report. Office of Solid Waste and Emergency Response.
- Ely, R. L., K. J. Williamson, R. B. Guenther, M. R. Hyman y D. J. Arp. 1995. A cometabolic kinetics model incorporating enzyme inhibition, inactivation, and recovery: Model development, analysis, and testing. *Biotechnology and Bioengineering* 46: 218- 231.
- Ely, R., L. Williamson, R. B. Guenther, M. R. Hyman y D. J. Arp. 1997. Cometabolism of chlorinated solvents by nitrifying bacteria: Kinetics, substrate interactions, toxicity effects, and bacterial response. *Biotechnology and Bioengineering* 54: 520-534.
- Eweis, J. B., S. J. Ergas, D. P. Chang y E. D. Schroeder. 1998. *Bioremediation Principles*. 296 p. En: McGraw-Hill International Editions.
- Farges, B., L. R. Poughon, C. Creuly, C. G. Dussap y 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. <http://doi.org/10.1007/s12010-012-9651-6>
- Fang, X., R. Yu, B. Li, P. Somasundaran, K. Chandran. 2010. Stresses exerted by ZnO, CeO<sub>2</sub> and anatase TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Colloid and Interface Science* 348: 329-334. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.04.075>
- Frascari, D., S. Fraraccio, M. Nocentini y D. Pinelli. 2013. Aerobic/anaerobic/aerobic sequenced biodegradation of a mixture of chlorinated ethenes, ethanes, and methanes in batch bioreactor. *Bioresource Technology* 128: 479-486.
- Figuroa-Torres, G. M., M. T. Certucha-Barragán, F. J. Almendariz-Tapia, O. Monge-Amaya, E. Acedo-Félix, M. I. Pech-Canul, A. L. Leal-Cruz, C. I. Villa Velázquez-Mendoza. 2014. Effect of copper and iron on acidogenic biomass in an anaerobic packed bed reactor. *Adv. Biosci. Biotech.* 5:564-571.
- Galli, C. 2013. Degradación por medios bacterianos de compuestos químicos tóxicos. Comisión Técnica Asesora en: Ambiente y desarrollo sostenible, Buenos Aires, Argentina.
- García-Rivero, M., y M. R. Peralta-Pérez. 2008. Cometabolismo en la Biodegradación de Hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7: 1-12.

- García Solares, S. M. 2010. Biodegradación anaerobia de tricloroetileno (TCE) en un reactor UASB. Tesis de maestría. Instituto politécnico nacional. unidad profesional interdisciplinaria de biotecnología. México df.
- Gerardi, M. 2002. Nitrification and denitrification in the activated sludge process. 133-136 p. En: Wiley-Interscience, New York, USA.
- Glazer, A.N. y H. Nikaido. 1995. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. Freeman and Company, New York.
- Guerrero-Barajas C., A. Ordaz, C. Garibay-Orijel, S. M. García-Solares, F. Bastida-González, P. B. Zárate-Segura. 2014. Enhanced sulfate reduction and trichloroethylene (TCE) biodegradation in a UASB reactor operated with sludge developed from hydrothermal vents sediments: Process and microbial ecology. *International Biodeterioration & Biodegradation* 94: 182-191.
- Guerrero-Barajas C. 2007. Compuestos con actividad redox en la biodegradación anaeróbica de compuestos clorados. UPIBI.
- 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.
- Hazen, T. C. 2010. Cometabolic Bioremediation. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. p. 2505-2514. En: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Herrero, M., P. Havlík, H. Valin, A. Notenbaert, M. Rufino, P. K. Thornton, M. Blummel, F. Weiss, D. Grace y M. Obersteiner. 2013. Biomass use, production, feed efficiencies, and greenhouse gas emissions from global livestock systems. *PNAS*. 110:288-289.
- Hunik, J. H., C. G. Bos, M. P. Hoogen y J. Tramper. 1994. Co-immobilized *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* cells: validation of a dynamic model for simultaneous substrate conversion and growth in K-carrageenan gel beads. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 1153-1163.
- Indiana Department of Environmental Management. 2013. Tricloroetileno (TCE) Office of Land Quality-Science Services Branch.
- Khavanin, A., S. M Mousavian, S. B. Mortazavi, A. Rezaee y H. Asiliyan. 2006. Degradation of MTBE using fenton reagent. *Environ. Health Scie & Eng* 2:195-200.
- Kim, Y., L. Semprini y D. J. Arp. 2004. Aerobic cometabolism of chloroform and 1,1,1-trichloroethane by butane-grown microorganisms. *Bioremediation Journal* 2: 135-148.
- Kou, M., K. Liang, Y. Han, y K. Fan. 2004. Pilot studies for in-situ aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene-vapor as the primary substrate. *Water Research* 38: 4125-4134.

- Kowalchuk, G., J. Stephen, W. De Boer, J. Prosser, T. Embley y J. Woldendorp. 1997. Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the  $\beta$  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* 84: 1489-1497.
- Leyva-Díaz J. C., C. López-López, J. Martín-Pascual, M. Muñío y J. M. Poyatos. 2016. Kinetic study of the combined processes of a membrane bioreactor and a hybrid moving bed biofilm reactor-membrane bioreactor with advanced oxidation processes as a post-treatment stage for wastewater treatment. *ELSEVIER* 91: 57-66.
- Malachowsky, K. J., T. J Phelps, A. B. Teboli, D. E. Minnikin y D. White. 1994. Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by *Rhodococcus* species. *Appl Environ Microbiol* 60: 542–548.
- Martins dos Santos, A.A., J. Tramper y R. H. Wijffles. 1998. Integrated nitrogen removal in compact systems by immobilized microorganisms. *Biotechnology Annual Review. Elsevier Science B.V. Amsterdam, Holanda.* 4: 321-394.
- 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
- Mora, A., E. Bravo. 2016. Diversidad bacteriana asociada a biopelículas anódicas en celdas de combustible microbianas alimentadas con aguas residual. *Acta biológica. Colombia.* 22(1):77-84.
- Moran, M.J., J.S. Zogorski, P.J. Squillace. 2007. Chlorinated solvent in groundwater of the United States. *Environ. Sci. Technol.* 41, 74e81.
- Mulder, A., A. Van de Graaf, L. Robertson y J. G. Kuenen. 1995. Anaerobic Ammonium Oxidation Discovered in a Denitrifying Fluidized-Bed Reactor *Microbiology Ecology* 16: 177-184.
- Nadell, C.D., J.B. Xavier y K.R. Foster. 2009. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews.* 33: 206-224.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.130>.
- Pankow, J. F. y J. A. Cherry. 1995. *Dense Chlorinated Solvents and other DNAPLs in Groundwater.* Waterloo Press. Portland. Oregon.

- Pérez Cañestro, J. 2002. Aplicación de *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* en forma de biopelícula para la nitrificación biológica en reactores de lecho fijo. Universidad autónoma de Barcelona. Departamento de Ingeniería Química. Barcelona España.
- 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.
- Prosser, J. I. 1998. Autotrophic nitrification in bacteria. Science Direct. 30: 125-177.
- Purswani J., B. Juárez, B. Rodelas, J. Gónzales-López y C. Pozo. 2011. Biofilm formation and microbial activity in a biofilter system in the presence of MTBE, ETBE and TAME. Chemosphere. 85: 616-624.
- Rasche, M. E., Hyman, M. R., Arp, D. J. 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. 2014. Procesos Microbianos en Biorreactores de Membrana con Lechos Fluidificados en Tratamientos de Aguas Residuales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Departamento de Microbiología. Granada, España.
- Robertson, L. A., y J. G. Kuenen. 1990. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. Arch Microbiol 57: 139-152.
- Rosas L. 2007. Evaluación de la actividad enzimática de bacterias sulfato reductoras en la degradación de contaminantes recalcitrantes. Tesis de Ingeniería. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología. México, D.F.
- Schmidt, W. 2002. Suelos contaminados con Hidrocarburos: La Biorremediación como una solución Ecológicamente compatible. Cooperación Técnica Alemana.
- Selmin O.I., O. Makwana, R.B. Runyan. 2014. Environmental Sensitivity to Trichloroethylene (TCE) in the Developing Heart. In: Gilbert K., Blossom S. (eds) Trichloroethylene: Toxicity and Health Risks. Molecular and Integrative Toxicology. Springer, London.
- SEMARNAT. 2012. Estadísticas del Medio Ambiente: Informe de Situación del Medio Ambiente en México.
- Semple, K.T., B. J. Reid y T. R. Fermor. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environ. Pollution 112: 269-283
- Semprini, L., P. K. Kitanidis, D. H. Kampbell, y J. T. Wilson. 1995. Anaerobic transformation of chlorinated aliphatic hydrocarbons in a sand aquifer based on spatial chemical distributions. Water Research 31: 1051-1062.

- Shah, N., M. L. Hanna y R. T. Taylor. 1996. Batch Cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b characterization of poly-beta-hydroxybutyrate production under methane-dependent growth conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 161-171.
- Shukla, A. K., Upadhyay, S. N., Dubey, S. K. 2014. Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 8551(2):1–15. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.727080>
- Shukla, A. K., R. S.Singh, Upadhyay., S. K. Dubey. 2010. Kinetics of bio-filtration of trichloroethylene by metanotrophs in presence of methanol. *Bioresource Technology* 101: 8119-8126. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.040>
- Sinha, B., A. P. Annachhate. 2006. Assesment of partial nitrification reactor performance through microbial population shift using quinone profile, FISH and SEM. *Bioresource Technology* 98: 3602-3610. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.034>
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, J. W. Costerton. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Microbiology Research*, 56: 187–209.
- Tejero Monzón y G. Cuevas. 2003. Sistema mixto para la depuración biológica de aguas residuales combinando biopelículas y membranas de filtración.
- Terada A., S. Sugawara, T. Yamamoto, S. Zhou, K. Koba y M. Hosomi. 2013. Physiological characteristics of predominant ammonia-oxidizing bacteria enriched from bioreactors with different influent supply regimes. *Biochem. Eng.* 79:153–161.
- Torres, K., y T. Zuluaga. 2009. *Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Minas, Ingeniería Química. Colombia.
- Wahman, D. G., L. E. Katz, G. E. Speitel. 2005. Cometabolism of Trihalomethanes by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12):7980–7986.
- 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: 261-271.
- Zornoza R., F. Moreno, J. A. Acosta y A. Faz. 2011. stability, nutrient availability and hydrophobicity of biochars derived from manure, crop residues, and municipal solid waste for their use as soil amendments. *Chemosphere* 144: 122-130.