



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE INGENIERIA

**ESTRUCTURA DE
BIOPELICULAS**



**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
I N G E N I E R O C I V I L
P R E S E N T A
O C T A V I O M I G U E L P E R E Z**

DIRECTOR DE TESIS: DR. OSCAR GONZALEZ BARCELO

MEXICO, D.F

2007

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Oscar González Barceló por su apoyo, motivación, conocimientos y las facilidades otorgadas para la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Simón González Martínez que con su aprobación hizo posible la participación en el proyecto de CONACYT No 3319.

La Dra. Marcela E. Aguilar Morales del Laboratorio de la reproducción animal, Edif.B Segundo Piso, Facultad de Ciencias, UNAM, por su valiosa cooperación y enseñanza en el desarrollo de técnicas histológicas.

A todo el personal del Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería, UNAM, por sus consejos y las facilidades dadas el manejo de equipos y sustancias utilizadas en la parte experimental del trabajo.

A los ingenieros Lorenzo Octavio Miranda Cordero, Ing. Enrique Barranco Vite, Ing. Luis Candelas Ramirez, M.I. Víctor Franco por dedicar parte de su tiempo, para realizar valiosas observaciones que ayudaron a mejorar esta tesis.

Al M.I. Enrique Heras Herrera por sus consejos y enseñanza dados durante el transcurso de la carrera de estudio.

Al M.I. Gabriel Moreno Pecero por escucharme y orientarme en los momentos difíciles.

Al Ing. Oscar E. Martínez Jurado que con sagacidad oriento mis ideas haciéndolas más prácticas y específicas.

Al M.I. Armando Gallegos Suárez que cambio la forma de entender las estructuras logrando hacerlas más amenas y menos complicadas.

Al M.I. Agustín Demeneghi Colina que motivo en mí el espíritu por la lectura, por su enseñanza y los momentos en el salón de clases que junto con todos los compañeros hacían interesante cada una de éstas.

De igual manera agradezco a todos aquellos que convivieron conmigo durante mi estancia en la facultad; Hermenegildo Flores, Perla Palma, Katy Cruz, Edgar Martínez, Sergio Ramirez, Daniel Alejandro García, Norberto Gustavo Aguilar, Benjamín Hernández, Mónica Fernández, Juan Trejo, Francisco Reyes, Mauricio Ramos, Marcia Pérez, Julián Soto, Pablo Zarate, Alfredo Montealegre, Héctor Rojas, Raúl Celis, Juan Aguilar, José Luís Navarrete, Jazmín Cuevas, Damián Negrete , Ismael Palacios , Elizabeth Coria, Aidé Bravos, Miguel Ángel Castro, Arturo Frías, y muchos otros que compartieron conocimientos y experiencias.

A mis diferentes compañeros y jefes de trabajo, que me apoyaron y guiaron de alguna u otra manera mi formación personal y profesional.

A todos mis profesores de clases de la Facultad de Ingeniería que dejaron en mi conocimiento, consejos y experiencias que me formaron como profesional; de los cuales me siento muy agradecido.

DEDICATORIAS

A mi padre Odilón Miguel Cruz (†) que forjo en mí el carácter y fortaleza necesaria para superarme y obtener lo que deseo.

A mi madre Imelda Pérez Rodríguez quien con su valentía, sabiduría, humildad y su ternura, complemento en mí un espíritu que me hace afrontar los retos que se presentan en la vida.

A mi hermana Verónica que cuida de los padres cuando yo me encuentro ausente; y a su hijo Julián, que le dio grandes momentos de alegría a su abuelo y que le sigue dando momentos de alegría y enojo a su abuela.

A mi hermano Fernando que me ayudó a comprender teorías y fórmulas que encontraba complicadas, por su apoyo y compañía.

A todos los integrantes de la familia Miguel, que me ayudaron con un consejo, una invitación a comer, una prenda de vestir, una risa, una palmada cuando era necesario, un techo, que en conjunto hicieron que todo esto tuviera sentido y se lograra el objetivo principal.

De igual manera a toda la familia Pérez, por estar ahí cuando yo no estaba, que con su ayuda hicieron posible la culminación de mis estudios.

Y a todas aquellas personas que participaron de alguna u otra forma en mi formación como ser humano y como profesional, gracias a todos.

Es un error capital teorizar antes de tener datos. Sin darse cuenta, uno empieza a deformar los hechos para que se adapten a las teorías, en lugar de adaptar las teorías a los hechos.

Sherlok Holmes de Sir Arthur Conan Doyle.

Educación es cuando lees las letras pequeñas. Experiencia es lo que obtienes cuando no.

Pete Seeger

Las cosas, una vez principiadas, ni se han de olvidar ni dejar, hasta ser acabadas, que es nota de poca prudencia muchos actos comenzados y acabado ninguno.

Mateo Alemán

No hay máquina capaz de reemplazar la chispa humana: el espíritu, la compasión, el amor y la comprensión.

Louis Gerstner

ESTRUCTURA DE BIOPELÍCULAS

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	4
1.1.1 Objetivo particular	4
1.2 Alcances	4
1.3 Hipótesis	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Naturaleza de las biopelículas	6
2.1.1 Estructura de biopelículas	7
2.1.2 Mecanismos y factores de crecimiento	9
2.1.3 Interacción de los microorganismos	13
2.2 Biopelículas y su influencia en contaminantes	21
2.2.1 Problemas asociados a la formación de biopelículas	21
2.2.2 Beneficios en la formación del biopelículas	24
2.3 Sistemas de tratamiento utilizando biopelículas	27
2.3.1 Características generales	27
2.3.2 Procesos más utilizados	31
2.3.2.1 Biodiscos	32
2.3.2.2 Filtros percoladores	34
2.3.2.3. Biotorres	37
2.3.2.4 Sistema convencional de lodos activados	38
2.3.2.5 Lagunas aireadas	40
2.3.2.6 Reactores discontinuos	41

3. METODOLOGÍA.....	44
3.1 Selección y descripción del medio de soporte	45
3.2 Preparación de especímenes para microscopio.....	48
3.2.1 Protocolo de tiempos orientativos preparación de especímenes.	51
3.2.2 Técnicas de tinción.....	54
3.3 Obtención de imágenes.....	57
3.4 Procesamiento de imágenes.....	59
4. RESULTADOS.....	60
4.1 Implementación de técnica para uso práctico.....	60
4.2 Descripción y discusión de imágenes.....	62
4.2.1 Análisis por tipo de tinción.....	63
4.2.2 Análisis por el tipo de microscopio utilizado.....	68
4.2.3 Análisis por la secuencia de cortes.....	69
4.2.4 Análisis por discusión de teorías y modelos.....	71
4.3 Comparación de métodos de obtención de imágenes.....	73
4.4 Aplicaciones en sistemas para tratamientos de aguas residuales.....	74
4.4.1 Sistemas con medio de soporte poroso.....	74
4.4.2 Proceso captor.....	75
4.4.3 Proceso linpor.....	75
5. CONCLUSIONES.....	77
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la humanidad enfrenta grandes problemas asociados al acceso del agua; principalmente en las grandes ciudades, así como también en diversos núcleos de población. Esto se debe al decremento en la disponibilidad media per cápita, y al grado excesivo de contaminación de los cuerpos de agua. Teniendo como principal escenario este último, en los múltiples retos asociados a detener y posteriormente resarcir dichos problemas deben de participar todos los sectores de la población y no dejar solamente esto a los gobiernos.

El pleno entendimiento de la problemática permite saber cuál debe ser el papel de la sociedad en un futuro no muy lejano. Cada individuo debe prepararse para aplazar y de alguna manera contener la contaminación de los ríos, mares y de los mantos freáticos. El concepto tradicional del agua debe ser modificado, de manera tal, que se logre cambiar las tendencias en cuanto a demanda de agua, y finalmente fortalecer los usos de otras fuentes de abastecimiento de agua.

Los procesos de depuración de las aguas residuales próximamente serán obligatorios, regidos por normas que en el presente muy pocos organismos operadores las cumplen y organismos regentes las hacen cumplir.

Las enfermedades causadas por las descargas de aguas residuales a las diversas fuentes de abastecimiento y su consumo posterior, son considerablemente razonables, tanto en cuestiones económicas, sociales, políticas; y en lugares donde aunado a la deficiente salubridad de las regiones pasa a ser un problema de conflicto social.

Ante esto solo resta cuidar las fuentes de abastecimiento, creando conciencia en los usuarios finales y revisando los sistemas de distribución, otra forma de

lograr mitigar estos efectos es dar tratamiento a las aguas residuales municipales e industriales para mejorar su calidad, por los diversos métodos o procesos que hasta la fecha se han utilizado y que sean aplicables de acuerdo con las posibilidades económicas de cada lugar. Si esto no es posible se tiene que innovar con nuevos procesos que sean más asequibles a todos los lugares y que no sea motivo de descuido y deterioro de sus condiciones ambientales predominantes.

Las biopelículas están siempre presente en los sistemas de distribución de agua, ya sea en forma de delgadas e irregulares colonias o en múltiples capas superficiales. Estas sustancias proveen un posible hábitat para microbios, donde se protegen contra los desinfectantes, particularmente si se localizan en las áreas corroídas. Asimismo, están relacionados con el agua negra y los malos olores, así como en la corrosión de los metales, materiales minerales y polímeros sintéticos (H. C. Flemming *et al.*2000).

Las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a la superficie gracias a la secreción de un exopolímero. Estas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes y capacidad de comunicación intracelular que las convierte en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen.

El propósito de estas formaciones es muy variado y depende del metabolismo de cada agrupación; como ejemplo está mejorar la eficiencia de procesos biológicos; pero en otros campos de estudio son un problema la formación de las mismas, teniéndose un escenario contradictorio en donde no se puede decir su grado de beneficio o perjuicio. En la naturaleza constituyen un modo de crecimiento protegido que permite la supervivencia de las bacterias en un

medio hostil. Las estructuras que forman estas micro colonias contienen canales por los que circulan los nutrientes (Costerton, 1999).

El presente trabajo estudia características de biopelículas formadas en un medio de soporte (hule espuma de poliuretano) presente en un reactor piloto cuyo propósito es la remoción de nitrógeno y fósforo presentes en aguas residuales municipales, teniéndose condiciones aerobias y anaerobias en el citado reactor. Dado que el medio de soporte no permite que se realicen cortes finos de una manera práctica, se implementaron técnicas histológicas en el espécimen, es decir, dicha técnica requiere un proceso de deshidratación, fijación, e inclusión en parafina. Esto permite, trabajar sobre el mismo para realizar un análisis exhaustivo de las características de las biopelículas y lograr obtener información del mecanismo seguido en la formación de éstas.

El presente documento está dividido en 5 capítulos, además de la introducción (Capítulo 1), en el segundo capítulo se trata todo el marco teórico referente a las biopelículas, la naturaleza de las mismas, su interacción entre éstas y los medios en donde se forman, los problemas asociados a su formación y de igual manera su utilización en procesos de tratamiento de aguas residuales. En el capítulo tercero se define cuál es la metodología con la que se procedió en el desarrollo experimental de este trabajo, se da un énfasis esencial en las técnicas utilizadas para la preparación de muestras para su análisis al microscopio, para este último fin se utilizó un microscopio digital MIC-D y un microscopio óptico LEITZ.

Los análisis realizados se acotan a dos propósitos fundamentales, el primero es observar la estructura y crecimiento de la biopelícula y con esto poder comprobar o en su caso plantear hipótesis sobre el crecimiento de estas agrupaciones; la segunda, es tratar de identificar de una forma muy general cuáles son los microorganismos presentes.

En el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos, se discuten los mismos, las imágenes obtenidas y los métodos utilizados; se le da un énfasis a la aplicación en los tratamientos de aguas residuales para llegar así a plantear las conclusiones en el capítulo quinto.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Se determinarán las características más importantes de la biopelícula, se analizarán e identificarán en el mayor grado posible los microorganismos, aplicándose diversas técnicas de tinción recomendadas para cada caso (algas, protozoarios, etc).

1.1.1 OBJETIVO PARTICULAR

Se comprobará la veracidad de las teorías sobre las biopelículas, en lo referente a su formación, crecimiento y su posterior desprendimiento del medio de soporte, esto con base en la observación al microscopio de las muestras obtenidas

1.2 ALCANCES

Para el análisis al microscopio se utilizará un microscopio digital OLYMPUS, MIC-D.

Al igual se utilizará un microscopio óptico LEITZ con objetivos de 10x, 25x, 45x y 100x.

1.3 HIPÓTESIS

La naturaleza de las biopelículas es muy compleja, los mecanismos se regulan por diversos factores, el principal es la difusión, las hipótesis planteadas son hechas sobre el medio de soporte utilizado en este trabajo, las cuales son las siguientes:

- a) Las biopelículas con más crecimiento son aquellas por donde el flujo del agua realiza el menor esfuerzo.

- b) El crecimiento de la biopelícula en el medio de soporte poroso tenderá a ser irregular, ya que se respetarán los canales por donde circulen los nutrientes y el oxígeno.

- c) Los microorganismos presentes se adecuarán a las fases del crecimiento y su evolución variará con base en las condiciones presentes en dicho reactor (Reactor discontinuo).

2. ANTECEDENTES

2.1 Naturaleza de las biopelículas

Las *biopelículas* son comunidades complejas de microorganismos y polímeros extracelulares, fijas a una superficie, que pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes (Costerton, 1995).

Dichas comunidades están presentes en todos los ámbitos de la vida cotidiana, algunos ejemplos son la capa formada sobre la superficie de las piedras en los lechos de los ríos, o la película adherida en la superficie interna de la tubería que suministra o desaloja agua, aunado a los múltiples casos en donde se tiene la formación de estas agrupaciones; pero ¿qué tienen de común estos casos?; simplemente que se encuentran en un medio húmedo y están en contacto con nutrientes, esenciales en la formación de las mismas.

En las biopelículas se pueden encontrar una gran cantidad de microorganismos, los cuales forman a su vez una cadena alimentaria y que gracias a ésta, se pueden agrupar de muy diversas formas y tamaños. Entre las características principales de las mismas están su heterogeneidad, la adherencia (entre si y el medio de soporte), las condiciones de oxígeno, el pH, entre otras.

Las biopelículas se fijan fuertemente a una superficie, contra la repulsión inicial, y la modifican mientras captan más nutrientes y nuevas bacterias con las que iniciarán más cambios como por ejemplo, la síntesis del glicocálix, el polímero extracelular de tipo polisacárido que da estructura y protección a la comunidad.

El exopolímero que es producido por los mismos microorganismos, forma una matriz adherente en donde estos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos. Se ha visto, que los

microorganismos al ser variados dentro de esta organización presentan diferentes microambientes de pH, tensión de oxígeno, concentración de iones, carbono y nitrógeno.

Aunque la composición de estas agrupaciones es variable, esto en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario de la biopelícula es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz de la biopelícula es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos secretados por las propias células que forman parte del mismo.

2.1.1 Estructura de las biopelículas

La formación de biopelículas es un proceso que se ha descrito a profundidad por varios autores (Noguera *et al.*, 1998; Tjihuis *et al.* 1996, entre otros). La descripción más detallada de este proceso es la propuesta por Characklis y Marshall (1990). Estos autores distinguen dos tipos de adhesión para describir el proceso de la formación de biopelículas; inicialmente los primeros microorganismos se adhieren directamente al soporte (adsorción). Mientras el soporte disponga de superficie sin colonizar este proceso se puede seguir produciendo, pero, simultáneamente, ocurre el segundo mecanismo de adhesión; la adhesión de células o unidades formadoras de colonias que se unen a las células que ya están unidas al soporte, de forma que esta adhesión se lleva a cabo desde la fase líquida a la biopelícula (y no directamente al soporte).

La adhesión de la primeras células al soporte, denominada proceso de adsorción, se puede llevar a término de forma química (generalmente irreversible, y que se produce gracias a una interacción química, como, por ejemplo, enlace covalente o iónico) o mediante una adsorción física (reversible, más débil, mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces de coordinación...etc.). Una posibilidad habitual de adsorción irreversible es la que se realiza mediante sustancias poliméricas extracelulares producida por los microorganismos.

Tanto el proceso de adsorción al soporte como la adhesión de biomasa a la biopelícula, están influenciados principalmente, por tres factores: el tipo de flujo existente (laminar o turbulento), la micro rugosidad del soporte (o biopelícula) y el estado fisiológico de los microorganismos.

En los primeros trabajos realizados sobre estructura del biopelículas, una de las cuestiones que surgía con mayor reiteración era cómo las bacterias del interior de la biopelícula podían tener acceso a los nutrientes o al oxígeno.

Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta zonas más profundas de la biopelícula. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro de la biopelícula se puedan encontrar con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro de la biopelícula y dificulta su estudio.

2.1.2 Mecanismo y variación de crecimiento

En el desarrollo de la biopelícula intervienen varios procesos (Figura 2.1). Transporte y difusión de los sustratos (incluyendo el oxígeno) a través de la fase líquida y hasta la biopelícula, transporte de células hasta el soporte, adsorción/deserción de células al/del soporte, crecimiento celular, formación de producto y muerte en la fase de la biopelícula/fase líquida. La evolución de grosor de la biopelícula sigue normalmente una función sigmoidea (Characklis y Marshall, 1990).

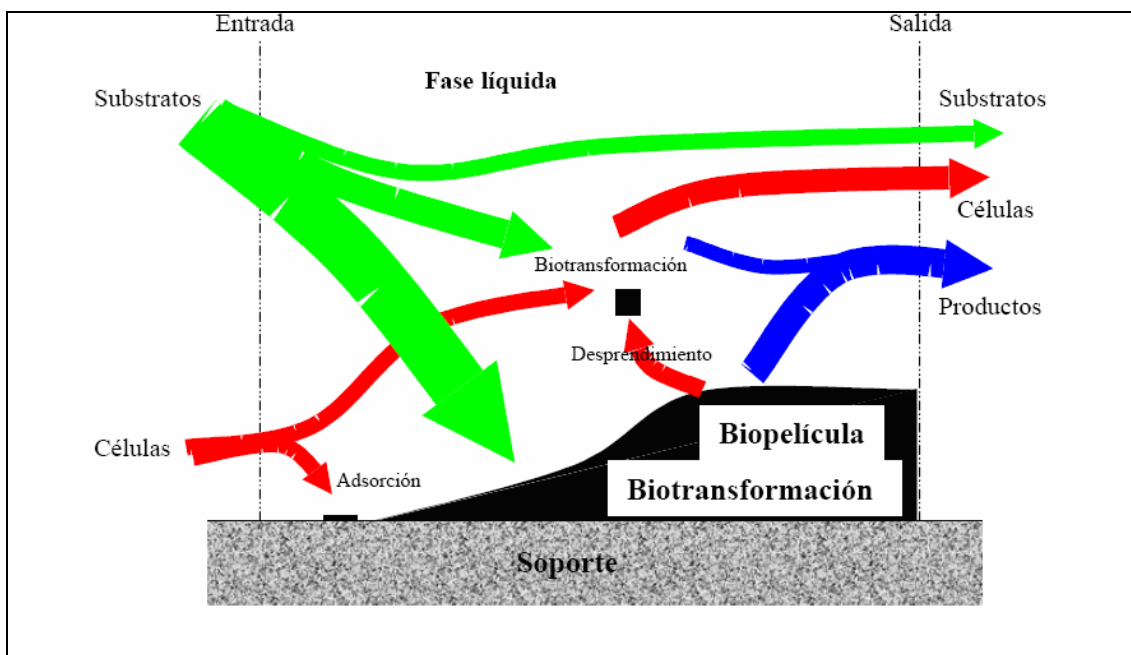


Figura 2. 1 Representación esquemática de los procesos que contribuyen al desarrollo de la biopelícula (adaptado de Characklis y Marshall,1990).

La formación y desarrollo de la biopelícula (Figura 2.2) sobre un medio de soporte se puede describir macroscópicamente, mediante varias etapas (Capdeville, 1992):

- I. Fase de latencia: el soporte no está cubierto de biomasa.
- II. Crecimiento dinámico: el soporte se recubre de una biopelícula.

- III. Fase de crecimiento lineal: la biomasa se acumula proporcionalmente al tiempo.
- IV. Desprendimiento: ocurre cuando la biopelícula se ha desarrollado plenamente.

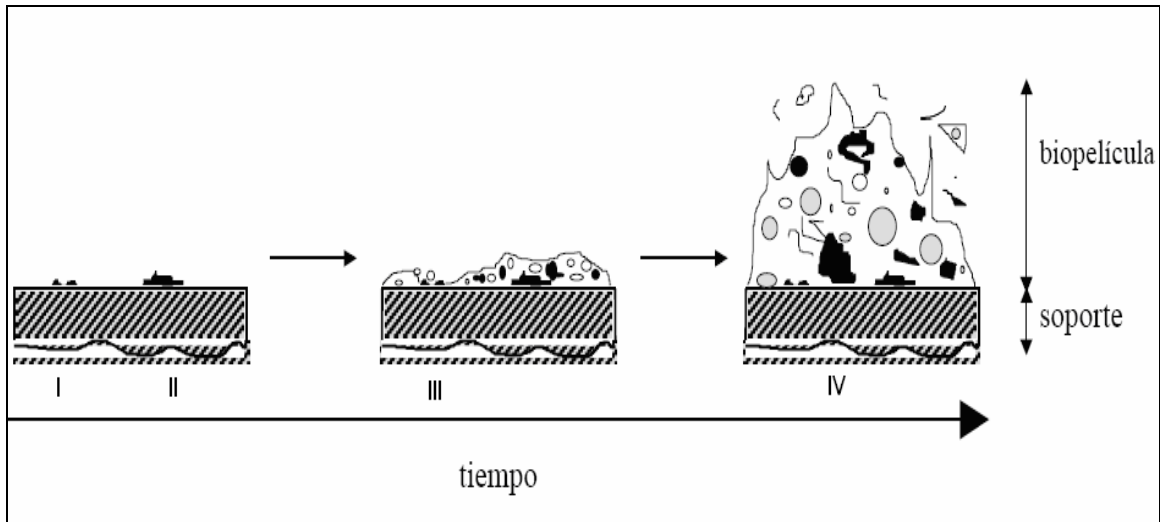


Figura 2.2 Representación esquemática de la formación de la biopelícula (modificada de Wiffels, 1994)

Otros autores, (Noguera *et al.*, 1995), diferencian tres estados en el proceso de colonización del soporte por parte de las células (fases I y II en la anterior descripción). Ver figura 2.3

- I. Adhesión de las células.
- II. Formación de biopelículas en las concavidades del soporte (la biopelícula no recubre el soporte de forma homogénea).
- III. Extensión de la biopelícula desde las áreas colonizadas al resto de superficie (hasta que el soporte está cubierto de forma completa u homogénea).

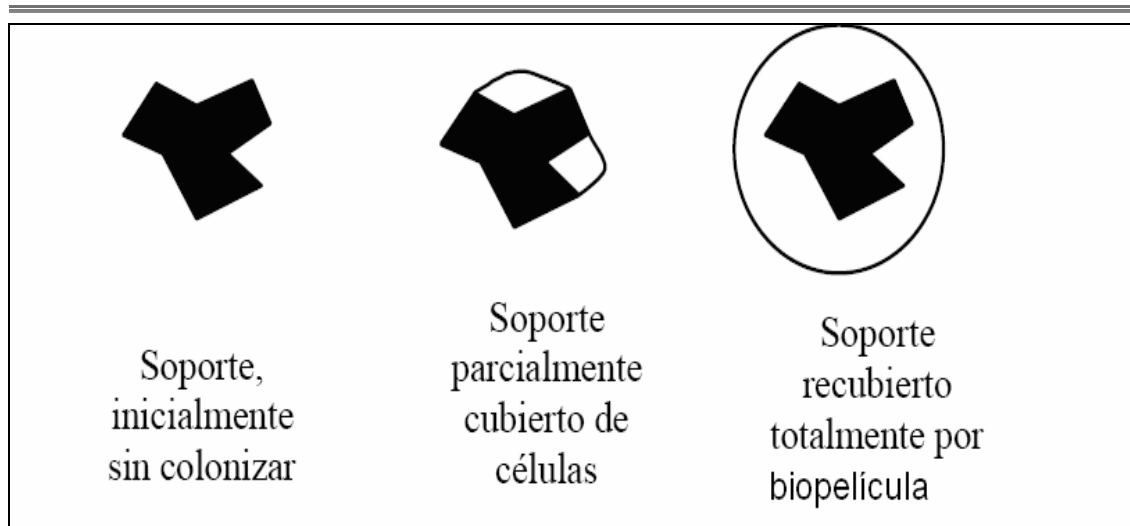


Figura 2.3 Representación esquemática de las fases en el proceso de formación de biopelícula (adaptado de Tjihuis *et al.*, 1995)

Luna *et al.*, (1990) detallan que el asentamiento de una comunidad biológica en un hábitat determinado depende de las condiciones físicas, químicas y biológicas del medio.

De manera muy general, se puede definir que el proceso de formación de la biopelícula sobre una superficie se divide en tres fases:

- a) Inducción: Comprende la adsorción de los compuestos orgánicos sobre la superficie húmeda de manera óptima para que los microorganismos colonicen las superficies pulidas formando una matriz gelatinosa.
- b) Acumulación: Se tiene un crecimiento logarítmico de los microorganismos, aumentando el grosor de la película, haciendo factible la generación de los estratos más profundos de procesos anaerobios.
- c) Estabilización: En esta fase se mantiene un espesor constante, esta condición de estabilidad persiste hasta que los nutrientes difundidos a través de la biopelícula terminan. En ese momento los organismos de

las capas basales mueren. La integridad estructural de la base de la película se pierde y ocurre un desprendimiento masivo.

Por otro lado Iwai y Kitao (1994) reportan que existen factores que determinan la colonización de las superficies: se conoce que son dos los principales factores fisicoquímicos que afectan la adhesión de los microorganismos a un material de soporte:

- 1) *Acción electrostática.* La carga eléctrica en la superficie de un microorganismo, está dada por la disociación de radicales amino, fosfato y otros similares y por el pH del medio. Se considera que una célula microbiana en agua cercana a la neutralidad tiene una carga eléctrica negativa. Por lo tanto, una fuerza electrostática actuará entre dicha célula y una partícula y/o superficie con carga positiva permitiendo una fácil adhesión. En tanto que la adhesión a un soporte con carga negativa se dificultará.
- 2) *Grado de hidrofilia.* El grado de hidrofilia de la célula microbiana y del material de soporte son determinantes. La regla general es que dos sustancias hidrófobas o dos sustancias hidrofílicas se atraen. De forma que materiales con superficie altamente hidrófoba, tales como el polietileno, poliamida y poliestireno absorben fácilmente microorganismos hidrófobos; y superficies hidrofílicas como el dióxido de silicón adsorben microorganismos hidrofílicos.

Otros factores que también influyen en la adhesión de los microorganismos son la rugosidad del material de soporte y la velocidad de flujo. Esta última, puede retrasar la adhesión primaria de los microorganismos colonizadores (Iwai y Kitao, 1994). Velocidades de circulación elevadas incrementan la turbulencia del flujo del agua residual y optimizan la difusión de substratos hacia la biopelícula fomentando su desarrollo (Nielsen, 1987; Holder, 1994). En el otro

extremo, estas mismas velocidades generan tensiones de fricción sobre las paredes de las conducciones y tienden a limitar el espesor máximo de la biopelícula (Holder, 1994).

Algunos autores tales como Norouzain y Deloya (1984, citados por Luna *et al.*, 1990), reportan que primero deben ser adsorbidos nutrientes orgánicos y sales minerales por el material de soporte para que los microorganismos puedan colonizar la superficie de los mismos. Posteriormente estos microorganismos forman una matriz gelatinosa que permite la adhesión de otros microorganismos y partículas.

2.1.3 Interacción de los microorganismos.

El crecimiento de los organismos depende básicamente de la disponibilidad del agua. Los hongos ya se desarrollan a partir de un contenido de agua en el sustrato del 12%, las bacterias sólo cuando es superior al 20%. Para sintetizar sustancia celular se requieren materias nutritivas. En total tienen que estar en el medio en forma de compuestos utilizables todos los elementos que se requieran para la formación de la sustancia celular. Los macroelementos se requieren en grandes cantidades: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, quedando representados como :C, O, H, N, S, P, K, Ca, Mg, Fe.

Las aguas residuales contienen incontables microorganismos vivos. Estos son la parte activa de la materia orgánica que se encuentra en las aguas residuales, y su efectividad en el proceso incluyendo la degradación y descomposición, depende de su éxito como comunidad.

Los organismos, en general, se clasifican de acuerdo a diversos parámetros (H. G. Schlegel., 1988):

→ De acuerdo a su consumo de oxígeno

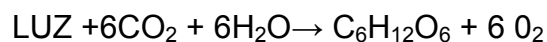
- Aerobios.- Necesitan oxígeno libre molecular: O₂ para vivir.
- Anaerobios.- Viven en ausencia de oxígeno.
- Facultativos.- Prefieren ambiente con oxígeno, pero pueden vivir sin él.
- Anóxicos.- En ausencia de oxígeno disuelto emplean el oxígeno combinado. Por ejemplo nitratos NO₃⁻

→ A su temperatura

- Mesofílicos.- viven en el intervalo 15 a 40 °C.
- Psicofílicos.- viven de 0 a 15°C.
- Termofílicos.- viven de 40 a 70 °C.

→ Tipo de energía que emplean

- Fotótrofo.- Utilizan la luz como fuente de energía.



- Quimiótrofos.- derivan su energía a partir de reacciones químicas.



→ Según su fuente de abastecimiento de carbono

- Autótrofos.- Sintetizan su propio material orgánico a partir de compuestos inorgánicos (CO₂).
- Heterótrofos.- Sintetizan su material orgánico a partir de compuestos orgánicos (carbón orgánico, principalmente glucosa).

→ Tipo de microorganismos

- Algas.- requieren luz para realizar sus funciones vitales (vegetales). En ausencia de luz viven de forma quimiosintética y consumen oxígeno.
- Bacterias.- Forma de vida más pequeña capaz de sintetizar el protoplasma de su ambiente.
- Hongos.- Son organismos microscópicos no fotosintéticos. Se alimentan de materia orgánica muerta o como parásitos de huéspedes vivos son quimiosintéticos.
- Protozoarios.- Forma animal más pequeño que se reproduce por fisión binaria (organismos unicelulares) varía de 10 a 100 μm . Son más complejos en sus funciones que bacterias o virus pueden vivir solos o ser parásitos.
- Virus.- Estructura más ligera que contiene toda la información genética necesaria para su reproducción. Su tamaño varía entre 0.01 y 0.3 μm . Todos son parásitos, requieren un medio transmisor. Por su tamaño, la remoción de ellos por procesos convencionales de tratamiento de agua no es segura, pero los provistos de desinfección los dejan inactivos.

En este trabajo se centra la atención en las *bacterias* las cuales se clasifican en dos grupos, las arqueobacterias y las eubacterias; estas últimas son las bacterias típicas. Por ejemplo *Escherichia coli*. Se trata de microorganismos unicelulares procariontes, cuyo tamaño oscila entre 1 y 10 micras, adaptados a vivir en cualquier ambiente, terrestre o acuático, pues en las diferentes estirpes bacterianas pueden observarse todas las formas de nutrición conocidas. Las hay autótrofas: fotosintéticas y quimiosintéticas, y heterótrofas: saprofitas, simbióticas y parasitarias. Esta notable diversidad de funciones convierte a las bacterias en organismos indispensables para el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos que permiten el reciclaje de la materia en la biosfera.

La mayor parte de las bacterias adoptan formas características, aunque en ocasiones la configuración puede verse influida por las condiciones del medio de cultivo. Son unicelulares, pero también aparecen agrupadas cuando se mantienen unidas tras la bipartición. Entre las formas más comunes destacan las siguientes:

Cocos, de aspecto redondeado, que aparecen aislados o en grupos de dos: diplococos, otras veces forman cadenas arrosariadas: estreptococos, grupos arracimados: estafilococos, o masas cúbicas: sarcinas. Esta diversidad depende de que la división de las células se dé a lo largo de uno, dos o tres ejes.

Las bacterias con forma de cocos tienen una relación superficie/volumen mínima, son bacterias con poca relación con el exterior, muy resistentes y se transmiten por el aire. Son pequeñas y exigentes con el medio de cultivo. Suelen ser patógenas: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, etc.

Bacilos, alargados y cilíndricos, en forma de bastón; a veces se presentan en cadenas lineales o ramificadas. Presentan mayor relación superficie/volumen que los cocos y obtienen nutrientes con mucha mayor efectividad, por lo que pueden vivir en lugares pobres en nutrientes (vías urinarias, agua....). Por el contrario, son menos resistentes, susceptibles a los cambios ambientales y no pueden transmitirse por el aire, sólo lo hacen por líquidos o superficies húmedas. Los más grandes (*Baccillus* y *Clostridium*) desarrollan endosporas para resistir los períodos de condiciones precarias.

Espirilos, con forma de hélice o espiral; las espiroquetas tienen un aspecto similar, pero con la espiral más acusada. Las formas espirales se mueven en medios viscosos avanzando en tornillo. Su diámetro muy pequeño, lo hace que puedan atravesar las mucosas; por ejemplo: *Treponema pallidum*, causante de la sífilis. Son más sensibles a las condiciones ambientales que los bacilos, por

eso cuando son patógenas se transmiten por contacto directo (vía sexual) o mediante vectores, normalmente artrópodos hematófagos.

Vibrios, que son muy cortos y curvados, en forma de coma. Ejemplo: *Vibrio cholerae*.

En la Figura. 2.4 se muestran las formas clásicas de las bacterias

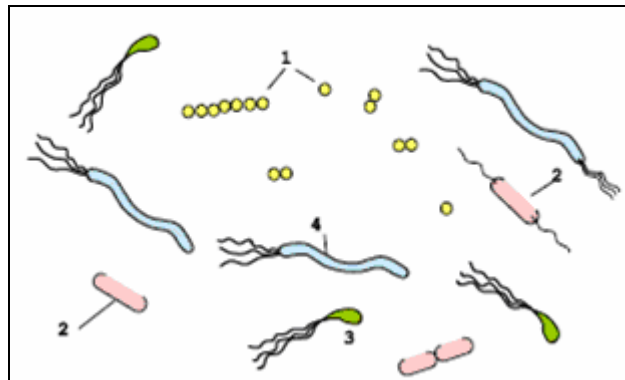


Figura 2.4 1) Cocos. 2) Bacilos. 3) Vibrios. 4) Espirilos.

En otro contexto, los *protozoarios* son parte importante en la cadena alimenticia en el tratamiento biológico. Estos son organismos formados por una sola célula, es decir, poseen la estructura típica de una célula eucariótica animal, aunque en ocasiones presentan una mayor complejidad en su organización. Tienen una membrana plasmática que los rodea y delimita, algunos forman un caparazón duro, calizo o silíceo, o bien una fina envoltura de quitina.

Su forma y tamaño son variables, pero casi todos ellos son microscópicos por lo que deben observarse al microscopio. Algunos viven libres en aguas dulces o saladas. Cuando se deseca el medio en que viven forman un caparazón y se enquistan. Otros viven como parásitos en animales o vegetales produciendo enfermedades, o bien, simbiosis con ellos. Se suelen reproducir por bipartición simple, aunque algunos tienen otras modalidades e incluso se conocen procesos de reproducción sexual.

Los protozoarios pueden ser indicadores de diversos parámetros de proceso, entre los que cabe mencionar la calidad del influente, la calidad del efluente y la concentración de oxígeno disuelto del líquido de mezcla.

En conjunto degradan muchos compuestos que no son metabolizados por organismos superiores, empleando complejos procesos basados en su nutrición, siendo los sistemas aerobios los que más energía liberan.

El conjunto de estos procesos sucede en el interior de reactores, generalmente en serie que constituyen los procesos unitarios de tratamiento de las aguas residuales. De forma resumida puede lograrse la muerte o eliminación de los organismos patógenos mediante tres procesos fundamentales:

- Por la creación de condiciones adversas extremas, como sucede en la digestión termofílica, que promueve una muerte rápida.
- Por la permanencia prolongada de los organismos dentro del reactor (tiempos largos de retención hidráulica), que favorecen la muerte natural, como se verifica en las lagunas de estabilización.
- Por la aceleración de las tasas metabólicas y estimulación de las cadenas alimentarias como ocurre en los lodos activados, donde la oxigenación apropiada y la relación alimento/microorganismo estimula el consumo rápido de la materia orgánica.

Los organismos fotosintéticos y los que obtienen energía por oxidación de compuestos inorgánicos suelen usar generalmente CO₂ como fuente única o principal de carbono (autótrofos). Pero, la mayoría de los microorganismos de laboratorio son heterotróficos, es decir necesitan fuentes de carbono orgánico y nitrógeno asimilables, así como sales minerales y en ciertos casos vitaminas. Pueden sintetizar todos sus constituyentes celulares a partir de un único compuesto orgánico que sirve tanto de fuente de carbono y de energía, y de una fuente inorgánica u orgánica de nitrógeno.

Además del carbono, los nutrientes primordiales son nitrógeno y fósforo que se incorporan como amonio o nitrato, y fosfato. Otros nutrientes, tales como vitaminas o iones metálicos, se requieren en pequeñas cantidades (micro nutriente) y suelen estar, como contaminantes. Cuando el oxígeno es necesario para el metabolismo, la fuente usual de suministro es el aire filtrado.

Un microorganismo puede producir metabolitos que hagan el ambiente desfavorable para el desarrollo de otros o que perturben su metabolismo hasta el punto de que mueran o sean incapaces de reproducirse. El fenómeno recibe el nombre de antibiosis o antagonismo.

El modelo conceptual de la biopelícula desarrollado por Costerton *et al* (1994), predice que el crecimiento de microorganismos es en forma de “hongo”. Las microcolonias están situadas en la parte superior del “hongo” constituyendo una capa límite. Algunos de estos “hongos” crecen juntos y se fusionan, pero dejan canales de agua abiertos de tal manera que el agua puede penetrar a la mayor parte de la biopelícula mediante flujo convectivo.

Costerton (1995) definió a las biopelículas como la mayor expresión fenotípica del género bacterial e infirió que la estructura del “hongo” de la biopelícula no es accidental, sino directamente de acuerdo con el crecimiento controlado de bacterias debido a complejos mecanismos de comunicación celular.

La microcolonia sigue creciendo en volumen y las bacterias que están cerca del epitelio tienen un acceso difícil a los nutrientes del medio externo. Sólo aquellas localizadas en las capas superiores continúan multiplicándose, situación que crea poblaciones bacterianas con diferencias en su metabolismo.

Ocasionalmente, por razones puramente mecánicas se desprenden algunas bacterias o, más normalmente algunas dejan de producir estos exopolisacáridos para “desprenderse” en el medio (ver Fig. 2.5). A este

fenómeno en el que algunas bacterias dejan de expresar unos determinados genes se le denomina variación de la fase. Estas células individualizadas son las que intentan colonizar otras superficies u otros individuos para crear nuevas microlonias (Baselga, 1994).

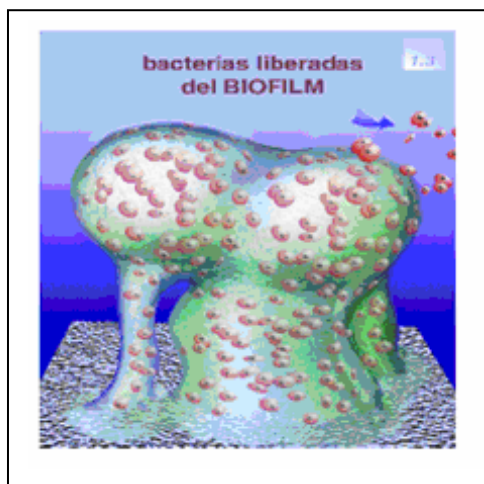


Figura 2.5 Microcolonia constituida de la que escapan bacterias sin exopolisacáridos (en variación de fase) para colonizar otros tejidos (Baselga, 1994).

Los microorganismos de las biopelículas son anaerobios en parte, cuando principalmente son usados procesos aerobios. Evidentemente el espesor del estrato aerobio es constante bajo condiciones constantes de operación, porque el espesor aerobio del estrato se incrementa debido al crecimiento microbiano.

Sin embargo, un sistema con elevada diversidad de biota es un sistema estable que permite inevitablemente tener un sistema de tratamiento estable. Esas bacterias, que utilizan substrato y que lo asimilan lentamente son substratos con bajo valor de rendimiento de crecimiento, siempre relativamente en un pequeño rango de crecimiento específico. Por lo tanto, el proceso de biopelícula tiene excelente rendimiento en remoción de tales substratos.

El control del grosor de la biopelícula es un importante factor en funcionamiento de los sistemas de biopelícula fija. El grosor dependerá entre otras cosas de los organismos podadores (gusanos, larvas y rotíferos) o por inducción hidráulica a

través del incremento de la tasa de flujo. Los organismos podadores forman un importante factor para los sistemas con muy baja carga hidráulica.

2.2 Biopelículas y su influencia en el medio.

Generalmente las agrupaciones de biopelículas se ven cotidianamente, solo que el ser humano no está familiarizado con sus características como su nombre específico, su estructura, el porqué se forman. Pero lo que se tiene presente son los problemas que pueden causar, como ejemplo, está la biopelícula formada en los dientes que debilita el esmalte y consecuentemente se presenta la caries dental, que en nuestro país las cifras de esta problemática son alarmantes. Sin embargo, en otros aspectos, es importante la formación de las biopelículas. En los sistemas de tratamientos de aguas residuales son utilizadas para mejorar la calidad de aguas contaminadas y que al finalizar el tratamiento cumplan con una cierta calidad que exigen las normas existentes en cada país.

2.2.1 Problemas asociados a la formación de biopelículas.

Como se mencionó anteriormente, las biopelículas son agrupaciones de microorganismos que se adhieren a una superficie. Dichas agrupaciones logran aumentar considerablemente su nivel de vida en estas agrupaciones en valores aproximados a 100 %.

La presencia de biopelículas en el agua potable ha sido bien evidenciada desde 1930 con el reporte de problemas de la existencia de crecimiento de bacterias *Coli*. Otros siete años pasaron hasta que investigaciones confirmaron que los microbios eran capaces de multiplicarse en las paredes de las pipas de distribución de agua por citar un ejemplo. A pesar de la acumulación de evidencia que confirma la presencia de biopelículas en el agua potable, es hasta recientemente que cualquier implicación de la salud asociada a su crecimiento se está documentando, particularmente la biopelícula proporciona un medio seguro para el crecimiento de patógenos, virus y de protozoarios.

El agotamiento del oxígeno disuelto, la reducción de sulfato a sulfuro de hidrógeno, la producción de mal olor, y el color puede resultar de la actividad microbiológica.

Dentro del agua potable, el principal motivo de preocupación es la proliferación de coliformes y bacterias heterótrofas dentro de la biopelícula. Entre los factores que afectan el crecimiento de éstos se incluyen:

1. Temperatura
2. Ineficiencias en la remoción y desinfección de organismos en los tratamientos de potabilización
3. Desinfección dosis/tipos
4. La hidrodinámica del sistema de distribución

Los principales lugares en donde las biopelículas se pueden desarrollar son en las pipas abastecedoras de agua potable, en tuberías, en válvulas, sistemas contra incendio, juntas sellantes; por lo tanto el énfasis se debe de poner en investigar materiales en donde no se puedan desarrollar estas agrupaciones y con ello reducir la gran cantidad de problemas asociados.

Por otro lado, las bacterias englobadas en la biopelícula son extremadamente resistentes a los tratamientos antibióticos. Esta resistencia puede explicarse por tres hipótesis que no son necesariamente excluyentes (Costerton, 1999, Gracia 1999):

- 1) Aunque los antibióticos pueden penetrar en la biopelícula, no alcanzan una concentración suficiente en algunas partes del mismo.
- 2) Las bacterias en la base de la biopelícula son metabólicamente inactivas y por ello resisten a algunos antibióticos.
- 3) Existen mecanismos de degradación activa de los antibióticos que evitan que en algunas partes de la biopelícula se alcancen concentraciones efectivas.

De igual manera, se han realizado estudios en tuberías hechas con diversos materiales y se ha observado la variación del coeficiente de Manning, consecuencia de la disminución del diámetro de la tubería, en donde la biopelícula es el principal protagonista.

En fechas recientes los problemas asociados a la formación de las biopelículas han logrado captar la atención de los gobiernos, y los costos asociados revelan cifras multimillonarias, siendo un objetivo el diseñar nuevos materiales que no permitan la formación de estas agrupaciones, y en segundo término, estudiar la estructura de las biopelículas, para saber de una u otra forma las acciones a tomar para erradicar la formación y crecimiento de éstas.

2.2.2 Beneficios de la formación de las biopelículas

Algunas depuradoras de aguas (residuales y de industrias alimentarias) actúan por imitación de los procesos que ocurren naturalmente en el medio ambiente, en los que la biopelícula se encarga de mantener y recuperar la calidad del agua. Las bacterias de estas biopelículas compiten con las del agua en unas condiciones que les resulten favorables. Además también biodegradan la materia orgánica y la mayor parte de los compuestos tóxicos, y así actúan como agentes desintoxicantes y también resultan útiles para el monitoreo de estos compuestos en el medio en donde vivan (Fuchs *et al*, 1996).

Los procesos para el tratamiento de las aguas residuales son prácticamente sistemas de cultivo microbiano a gran escala que utilizan biopelículas en las cuales las sustancias orgánicas de los desechos se degradan a dióxido de carbono, gas metano y otros nutrientes orgánicos.

Las aguas residuales domésticas e industriales son ricas en materiales orgánicos y deben ser tratadas en alguna forma antes de devolverlos al ambiente. El agua residual se trata dentro del fondo de un tanque donde se pone en contacto con lodos o agregados de biopelículas unidos a partículas muy pequeñas. La degradación anaerobia de los sustratos orgánicos ocurre en el lecho del lodo y allí mismo se genera gas metano como uno de los productos finales; este gas tiene una utilidad valiosa porque puede ser recolectado por un sistema de tuberías para generar energía.

Tiene que destacarse que alguna de las materias primas disponibles, sobre todo en grandes cantidades, como el petróleo, el gas natural o la celulosa solo pueden ser utilizados por microorganismos y pueden ser transformados ya sea en material celular (biomasa) o en productos intermedios que son segregados

por la célula. Los microorganismos ocupan una posición monopólica en la mejora de las materias primas no convencionales tales como el petróleo, el gas natural y el carbón. La explotación de estas materias primas mediante tratamiento biológico acaba de comenzar.

Si el objetivo es la remoción de nitrógeno, los principales factores que afectan la nitrificación en los sistemas de biopelícula son el tiempo de retención hidráulico y la concentración de oxígeno. Asimismo, el valor del pH del agua a tratar, la temperatura, la alcalinidad y presencia de sustancias tóxicas afectan al desarrollo de los microorganismos responsables de la nitrificación.

La influencia del oxígeno disuelto sobre la nitrificación produce controversia, en parte debido a que la concentración de oxígeno en el agua es distinta a la del interior de la biopelícula donde se consume. Generalmente la penetración media del oxígeno dentro de la biopelícula es alrededor de 100 a 200 μm (De Beer *et al*, 1993).

Por otro lado, altas cargas orgánicas favorecen el desarrollo de heterótrofos (mayor velocidad de crecimiento), por lo tanto acapararán todo el oxígeno y nutrientes disponibles obstaculizando la nitrificación (Hem *et al*, 1994).

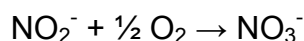
La nitrificación consiste en la conversión del amonio a nitrato mediante la acción microbiana. Este proceso es llevado a cabo por las bacterias nitrificantes Gram negativas, quimiolitótrofas aerobias estrictas Gram negativas capaces de oxidar el amoniaco. El proceso tiene lugar en dos fases: Por una parte, las bacterias pertenecientes al género *Nitrosomonas* básicamente (bacilos con sistemas de membrana periféricos) oxidan el amoniaco a nitrito. Posteriormente, éste es oxidado a nitrato por las bacterias oxidadoras de nitrito del género *Nitrobacter* (bacilos cortos que se reproducen por gemación y con sistemas de membranas organizados como una capa polar).

El proceso final se realiza en 3 etapas (dos para la oxidación a nitrito mediante un paso intermedio de hidroxilamina y una para nitrato):

Bacterias nitrosificantes (Nitrosomonas):

1. $\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$
2. $\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$

Bacterias nitrificantes (Nitrobacter):



La desnitrificación es el proceso mediante el cual los NO_3^- y NO_2^- producidos en el primer proceso son reducidos a las formas gaseosas N_2 u óxido nitroso (N_2O). Este último puede constituirse como un fuerte contaminante del aire.

La mayor parte de las bacterias que utilizan el NO_3^- como receptor de electrones son heterótrofas anaerobias facultativas o anaerobias aerotolerantes pertenecientes a una gran variedad de géneros, tanto Gram negativos (*Pseudomonas*, *Spirillum*, *Rhizobium*, *Cytophaga*, *Thiobacillus* o *Alcaligenes*) como Gram positivos (*Bacillus*, *Propionibacterium* o *Corynebacterium*).

La secuencia que conlleva a la desnitrificación es la siguiente:

NO_3^- (+nitrato reductasa) \rightarrow NO_2^- (+ nitrito reductasa) \rightarrow NO (+ oxido nítrico reductasa) \rightarrow N_2O (+oxido nitroso reductasa) \rightarrow N_2 .

2.3 Sistemas de tratamientos utilizando biopelículas

Se ha mencionado anteriormente que en los tratamientos de aguas residuales, principalmente, son utilizados agrupaciones de biopelículas para realizar este tratamiento. En otras palabras, existen diversos procedimientos a base de procesos biológicos como el biodisco, filtros percoladores, sistema de lodos activados con sus variaciones, estanques y lagunas; clasificados generalmente como sistemas de lecho fijo y móvil, en donde la eficiencia que se alcanza es notablemente alta y su uso depende de diversos factores, entre los más importantes están el económico y el técnico.

En este caso específico, el reactor que se utilizó para el crecimiento de la biopelícula en el medio de soporte se agrupa dentro de los reactores de lecho móvil. Recientemente se han puesto de vanguardia la utilización de este tipo de reactores, principalmente en el área industrial, aplicables para reducir niveles de concentración de nitratos y fosfatos que conllevan a la problemática de la eutrofización (en el caso de cuerpos de agua) y degradación (en tierras), en los sitios en donde es descargada dicha agua residual, respectivamente.

2.3.1 Características generales

Los sistemas secundarios son sistemas biológicos de tratamiento cuyo fin es remover la materia orgánica presente en las aguas residuales; existen una diversidad de medios para realizar dicho proceso. En este caso particular se pondrá énfasis a los que utilizan los sistemas microbianos mencionados anteriormente, aunado a otros que se mencionarán a detalle más adelante.

Los procesos biológicos son parte esencial en el tratamiento de las aguas residuales. Éstos se pueden realizar en dos formas básicamente, aerobios o anaerobios, la eficiencia de éstos es muy variable pero esto depende del fin del tratamiento en específico.

Los procesos biológicos de cultivo en suspensión aerobio, consisten en provocar el desarrollo de un cultivo en suspensión de microorganismos aerobios capaces de asimilar la materia orgánica biodegradable presente en el agua residual, y a través de procesos biológicos de síntesis, oxidación y endogénesis, y realizar la eliminación del contaminante en el influente líquido. Los principales procesos de tratamiento de cultivo en suspensión son el proceso de lodos activados, las lagunas aireadas, y el proceso de digestión aerobia de lodos. De todos ellos, el proceso de lodos activados es el más ampliamente utilizado, por ello en el presente tema se centra el análisis de este tipo de procesos desde la óptica de eliminación del material orgánico biodegradable.

Existen factores que son parámetros a considerar en el diseño de este tipo de plantas, pero en general estos conceptos se aplican a la gran mayoría de los procesos u operaciones que se realizan cotidianamente en el ámbito de la ingeniería ambiental y de mejoramiento de las condiciones de calidad de las aguas residuales, los ríos, los lagos, las lagunas y en algún otro lugar en donde exista agua almacenada y que su calidad no sea muy adecuada.

Estos parámetros son los siguientes, tiempo de retención, demanda bioquímica de oxígeno, demanda biológica de oxígeno, cantidad de materia orgánica, oxígeno disuelto, pH, concentraciones de nitratos, sulfatos y la temperatura cuyo variación en algunas ocasiones actúa como catalizador de las reacciones químicas., entre otras características de contaminantes químicos, a continuación se mencionarán la características más importantes de estas.

a) DQO (Demanda química de oxígeno)

Demanda química de oxígeno, es un parámetro analítico de contaminación que mide el material orgánico contenido mediante oxidación química. Es una medida de la cantidad de oxígeno consumido por la porción de materia orgánica existente y oxidable por un agente químico oxidante fuerte. Específicamente representa el contenido orgánico total de la muestra.

b) DBO (Demanda bioquímica de oxígeno)

Medida de la cantidad de oxígeno utilizado por los microorganismos en la estabilización de la materia orgánica biodegradable, bajo condiciones aerobias. (Se mide el material biodegradable del contenido orgánico total.)

c) OD (Oxígeno disuelto)

Es la cantidad de oxígeno que se encuentra disponible en el agua para la supervivencia de los microorganismos durante un determinado momento, el cual va decreciendo exponencialmente con el paso del tiempo.

d) pH (Potencial hidroxilo)

Grado de acidez o basicidad de una muestra de agua, se mide en la escala de pH que en realidad mide la concentración de iones de hidrogeno presentes.



$$\text{pH} = -\text{Log}_{10}[\text{H}^+] = \text{Log}_{10} 1/[\text{H}^+]$$

Controla reacciones químicas y las actividades biológicas; se restringe a una escala entre 6 y 8. De 0-7 Ácido, de 7- 14 Básico o Alcalino y si es 7 es Neutro

e) NITROGENO

Los compuestos de nitrógeno son de gran interés para ingenieros ambientales, debido a su importancia en los procesos vitales de todas las plantas y animales. La química del nitrógeno es compleja debido a su variedad de estados de valencia que puede asumir y al hecho de que estos pueden ser efectuados por organismos vivos.

Las diferentes formas del nitrógeno son:

- Nitrógeno amoniacal (presente en la orina)
- Nitritos
- Nitratos
- Nitrógeno orgánico

f) FOSFATOS

Esencial en el crecimiento de plantas y animales, considerado como uno de los nutrientes que controla el crecimiento de las algas. El uso de detergentes ha aumentado el contenido de fósforo en las aguas residuales y contribuyen a la eutroficación.

- Ortofosfatos
- Polifosfatos
- Fosfatos orgánicos (Detergentes biológicos)

g) AZUFRE

Tanto en la purificación de agua como en el tratamiento de aguas residuales se presentan diferentes formas químicas del azufre, éstas son las siguientes:

- Sulfatos
- Sulfuros
- Sulfitos

Sulfuros.- comunes en aguas residuales domésticas e industriales; aunque se presentan en aguas subterráneas por descomposición anaerobia. Causan malos olores, incrementan demanda de cloro, además oscurece pinturas hechas a base de plomo; produce atmósferas letales. Ocasionan corrosión en los metales y concretos.

Sulfitos.- se encuentran en residuos industriales y en aguas contaminadas. En general no se encuentran en agua naturales ya que reaccionan con el oxígeno para formar sulfatos, estos promueven la corrosión y son tóxicos para los peces y en general para la vida acuática.

Aunado al pH existen otros parámetros físicos importantes en los exámenes que se realizan, tales como los sólidos totales, disueltos, volátiles, suspendidos, que de grosso modo indican qué tan turbia es el agua que se analiza.

2.3.2 Procesos más utilizados

Como ya se ha mencionado existen diversos procedimientos para realizar el tratamiento de las aguas residuales, a continuación se detallarán los más utilizados en los tratamientos secundarios.

Para el caso de los tratamientos secundarios que básicamente consisten en la conversión biológica de compuestos orgánicos disueltos y coloidales en biomasa, misma que puede ser removida a continuación por sedimentación. El contacto entre microorganismos y compuestos orgánicos se logra suspendiendo la biomasa en el agua residual, o bien haciendo pasar el agua residual sobre una película de biomasa adherida a una superficie sólida.

En el tratamiento biológico los microorganismos usan los compuestos orgánicos presentes en el agua residual como fuente de alimento y los

convierten en células biológicas denominadas biomasa. Los microorganismos que toman parte en el tratamiento de aguas residuales en las plantas de tratamiento se controlan mediante reactores cuidadosamente diseñados para optimizar la rapidez y terminación de la remoción de compuestos orgánicos.

Entre los principales sistemas de tratamiento clasificados como de cultivo adherido, se tienen los siguientes:

2.3.2.1 Biodiscos

El desarrollo moderno se inició en Alemania; actualmente, los biodiscos son sistemas ampliamente utilizados y son considerados como uno más de los sistemas convencionales para tratamiento de aguas residuales.

Entre las ventajas se encuentran los bajos requerimientos de energía, tiempos de retención hidráulica cortos, capacidad de soportar cargas orgánicas variables, baja producción de lodos, mantenimiento mínimo y un punto adicional es que no se requiere de personal técnico especializado para su operación. Cabe destacar que la inversión inicial asociada a su construcción y arranque es alta (Antonie, 1975).

Los biodiscos son una adaptación única en el género del sistema de cultivo adherido. Los medios de soporte fabricados comúnmente de poliestireno, polietileno y poliuretano, que pueden llegar a medir desde 0.5 hasta 5.0 m y hasta 10mm de espesor. Estos son planos, montados en una flecha común y que rotan en tanques que tienen un contorno curvo y en los que el agua residual fluye de manera continua.

Los discos se sumergen en el agua residual hasta aproximadamente el 40% de su diámetro y rotan mediante energía suministrada a la flecha, usando sistemas de impulsión mecánicos o inducidos por aire. De esta manera,

aproximadamente el 95% del área superficial se sumerge en el agua residual, y después se expone a la atmósfera, de manera alternada. La velocidad de rotación varía de 1 a 2 rpm., y debe ser suficiente para el desprendimiento de la biomasa y para mantener suficiente turbulencia que mantenga a los sólidos en suspensión conforme el agua pasa por el tanque.

En general, el sistema está constituido por un sedimentador primario, biodiscos y un sedimentador secundario (Ver Figura. 2.6).

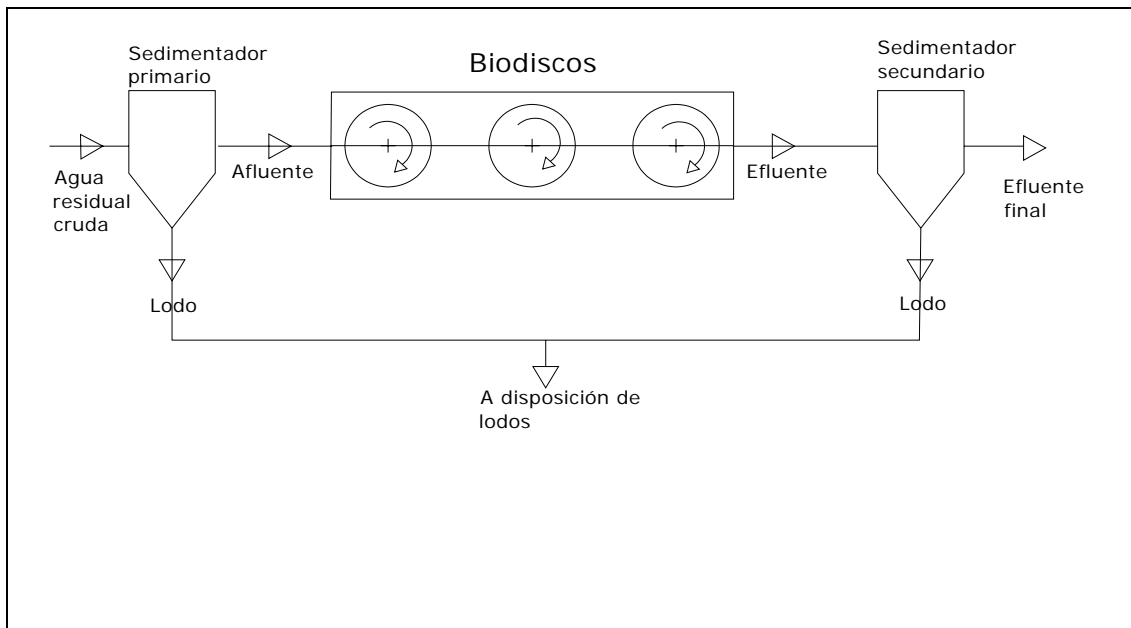


Figura 2.6 Sistema típico de biodiscos

Algunas ventajas de los biodiscos sobre el proceso convencional de lodos activados son las siguientes, algunas de las cuales se han mencionado anteriormente:

- a) Bajo consumo de energía y mantenimiento más sencillo.
- b) Ya que es posible tener en cada etapa un cultivo biológico diferente se cuenta con un grado adicional de flexibilidad en el proceso. Puede conseguirse bastante nitrificación desarrollando cultivos de bacterias nitrificantes selectivas en las últimas etapas.

-
- c) La biomasa presenta en general buenas características de sedimentación con lo que se disminuye el costo de la clarificación secundaria.
 - d) No se necesita reciclado de la biomasa.

Debe mencionarse como desventaja la presencia de una pequeña película líquida de gran superficie sobre la zona húmeda de los discos expuesta al aire ambiente, lo que lleva al peligro de la congelación en el caso de operación en climas fríos. En tales casos las unidades de tratamiento deben alojarse en un edificio cerrado lo que incrementa el costo de inmovilizado.

2.3.2.2 Filtros percoladores

El filtro biológico es uno de los procesos de tratamiento que se han desarrollado con la intención de encontrar un método económico y eficiente para desarrollar los medios naturales de purificación. En forma simple, se trata de proveer una superficie en la cual la población microbiana mixta, en forma de lama adherida a ella, pueda crecer al exponer esta superficie en forma continua a las aguas residuales y al aire para la asimilación de materia orgánica con aireación. Así el método consiste en dejar escurrir el agua residual en un tanque empacado con piedra o con algún medio sintético; en la superficie del medio o empaque se desarrollan crecimientos biológicos que biooxidán la materia orgánica presente en el agua y el efluente es recolectado en el fondo del filtro.

El filtro percolador moderno consiste en un reactor en el que se coloca al azar o en paneles un medio sólido de soporte, cuya superficie servirá para el crecimiento de la biopelícula. Se requiere además un sistema de distribución del agua residual sobre el medio y otro para conducir el efluente. El término "filtro" usado para denominar a este proceso es inexacto dado que sólo se

presentan en él unos cuantos fenómenos físicos que se asocian con la filtración a través de medios granulares. Más bien son la adsorción y subsecuente oxidación biológica los mecanismos principales de remoción del sustrato.

Las características más importantes del medio de soporte son su área superficial específica y la porosidad; la primera es la medida del espacio en donde puede crecer la biopelícula y la segunda es una medida de los vacíos a través de los cuales puede pasar el agua residual y el aire para la ventilación de los gases producidos.

La comunidad biológica presente en un filtro se compone principalmente de protistas, incluyendo bacterias facultativas, aerobias y anaerobias, hongos, algas y protozoos. Las bacterias facultativas son los microorganismos predominantes en el filtro percolador y, junto con las bacterias aerobias y anaerobias, su misión es decomponer la materia orgánica del agua residual. Entre las especies bacterianas normalmente asociadas con el filtro percolador están *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. En las zonas más bajas del filtro, se encuentran las bacterias nitrificantes *Nitrosomas* y *Nitrobacter*.

El agua es alimentada en la parte superior del filtro por medio de brazos giratorios. Los brazos distribuidores son alimentados por el centro, haciendo girar la misma fuerza del agua estos brazos; cuando no, son hechos girar por motores. Los brazos están provistos de orificios y difusores para la distribución uniforme del agua en el medio. Los distribuidores rotatorios se fabrican para estanques con diámetros de 6 a 60m.

En los filtros percoladores se usaba comúnmente roca triturada como medio de soporte debido a que es fuerte, durable y químicamente resistente para el crecimiento de la biopelícula. Con tamaño de roca de 50 a 100 mm se consigue

un área superficial específica de 50 a 65 m^2/m^3 , con porosidades de 40 a 50%. También se utilizan medios de soporte de plástico de formas variadas, con la ventaja de que puede determinarse con precisión el área superficial específica y la porosidad; con los medios de plástico a granel se consigue hasta 200 m^2/m^3 de área y porosidad de 95%. Además existen medios de soporte modulares fabricados con madera o plástico (Ver Figura 2.7).

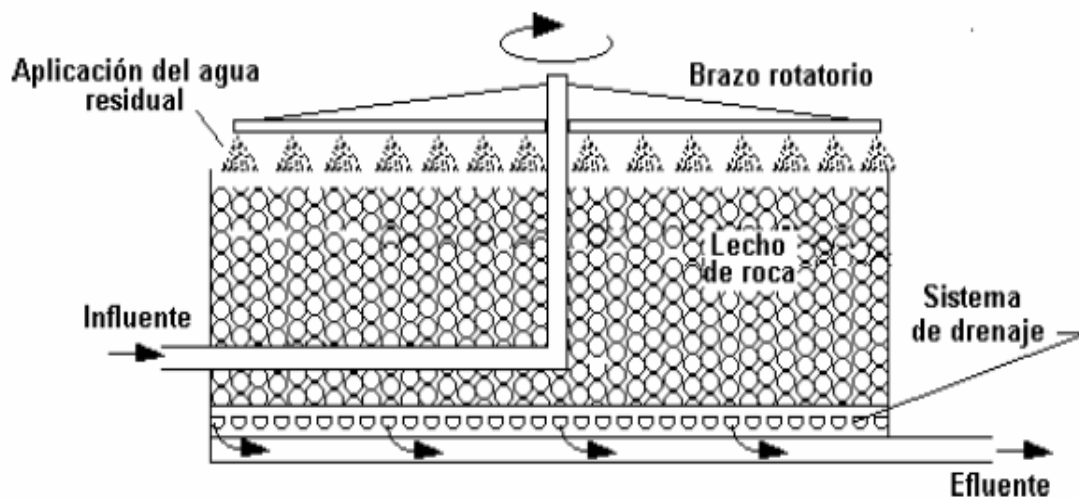


Fig. 2.7 Esquema de la sección transversal de un filtro percolador.

El efluente del filtro biológico deberá pasar a través de un sedimentador secundario para colectar la biomasa desprendida. En los filtros con medio de roca, es necesaria la sedimentación primaria para minimizar los problemas de obstrucción. Por otro lado, si los sólidos presentes en el agua residual han sido tratados con desmenuzadores o trituradores no se requiere la sedimentación primaria y el medio de soporte deberá ser preferentemente de plástico corrugado o material con un gran número de espacios vacíos que es directamente proporcional al área superficial.

Para rendimientos en la disminución de la DBO de aproximadamente el 60%, se ha encontrado que normalmente los filtros percoladores son más económicos que el proceso de lodos activados, en particular para caudales

pequeños. Para rendimientos superiores en la disminución de la DBO (90% o más) el proceso de lodos activados es más económico debido a que el costo del material del relleno podría resultar demasiado elevado. Los factores más importantes que afectan la operación de los filtros percoladores son:

- a) Carga hidráulica
- b) Carga orgánica
- c) Temperaturas del agua y del aire del ambiente

2.3.2.3 Biotorres

Las biotorres operan de manera similar a los filtros percoladores de alta tasa. Las características de dispersión de los módulos de plástico son menos efectivas que en los medios empacados y la tasa de carga hidráulica debe mantener un valor grande para asegurar que todas las superficies se mojen en toda la profundidad. Comúnmente se practica la recirculación directa de 1 a 3 veces el flujo de entrada. El metabolismo del sustrato diluido está en la fase de respiración endógena en la mayor parte de la profundidad de la torre. En las porciones superiores del medio generalmente se satisface la DBO carbonácea; si el contenido de carbono del agua residual disminuye a menos de 20 mg/l, las bacterias nitrificantes se vuelven competitivas y el amoníaco es convertido a nitrato. Una biotorre bien operada debe ser capaz de producir un efluente nitrificado.

Las biotorres tienen varias ventajas en comparación con los filtros percoladores clásicos: mayores tasas de carga y minimización de la obstrucción debido a la porosidad y naturaleza del medio de soporte y mejor ventilación que resuelve los problemas de olor bajo la mayoría de las condiciones de operación. Sus desventajas son: mayor costo de bombeo requerido por la recirculación de un

gasto grande y la mayor pérdida de carga hidráulica a través de toda la profundidad del lecho.

En los procesos de tratamiento con microorganismos en suspensión, la agitación producida para aireación permite un mejor y más continuo contacto entre los microorganismos encargados de la estabilización de la materia por estabilizar, lográndose un proceso más rápido y más eficiente.

Entre los principales sistemas de cultivo en suspensión, se tienen los siguientes:

2.3.2.4 Sistema convencional de lodos activados, proceso convencional

Cuando se agita en presencia de oxígeno un agua residual previamente pasada por un sistema de tratamiento primario, se forma un flóculo de lodo en el que se desarrollan muchas bacterias y organismos vivos, con lo que dicho flóculo se vuelve activo, oxidando y absorbiendo materia orgánica. De aquí que se denomina lodo activado. Los lodos sedimentados que contienen microorganismos vivos o activos, se regresan al reactor para incrementar la biomasa disponible y acelerar las reacciones. La mezcla de las aguas a tratar con los lodos de retorno recibe el nombre de licor mezclado. De esta manera, el proceso de lodos activados es un proceso de cultivo suspendido con recirculación de lodos y puede ser un proceso completamente mezclado o un proceso de flujo pistón.

En el proceso de lodos activados, la bacteria es el microorganismo de mayor importancia, ya que ésta es responsable de la descomposición de la materia orgánica. En general, las bacterias presentes en el proceso son Gram-negativo e incluyen miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Zooglea*, *Achrombacter*, *Flavobacrium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium* y las bacterias

nitrificantes *Nitrosomas* y *Nitrobacter*. Adicionalmente, varias formas filamentosas tales como *Sphaerotilus*, *Beggiotoa*, *Thiothix* y *Geotrichum* pueden también estar presentes. Mientras que las bacterias son los microorganismos que realmente degradan la materia orgánica, las actividades metabólicas de otros organismos son también importantes en el proceso del tratamiento.

El proceso de lodos activados tiene como objetivo la remoción de materia orgánica, en términos de DBO, de las aguas residuales. La remoción de la DBO se logra por la conversión biológica, en presencia de oxígeno molecular, por microorganismos, de la DBO en CO_2 y H_2O y en nuevas células de microorganismos. Los lodos en el reactor biológico están sujetos a un proceso de autoxidación, conocido como respiración endógena, proceso que también consume oxígeno.

El oxígeno requerido para el funcionamiento del proceso se suministra por medio de aireadores mecánicos o por medio de difusores. Los aireadores mecánicos pueden ser con turbina sumergida o superficial de alta o baja velocidad.

Las principales variables de diseño de los reactores de lodos activados son:

- ⇒ Tasa de carga volumétrica.
- ⇒ Relaciones sustrato a biomasa.
- ⇒ Tiempo medio de residencia celular.

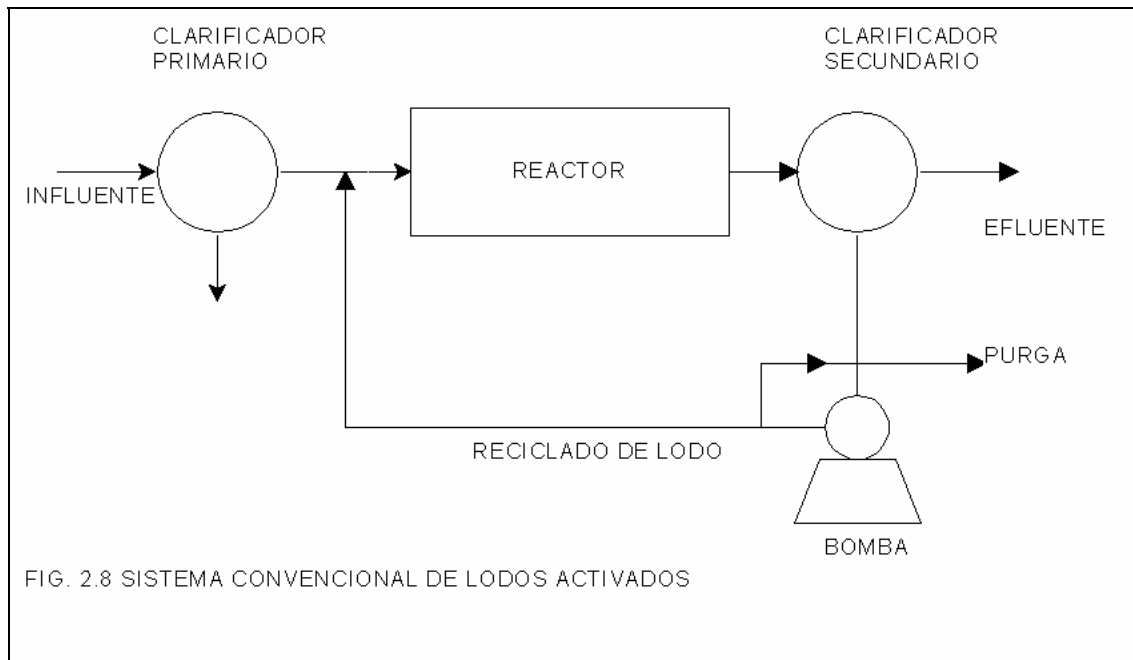


Figura 2.8 Sistema convencional de lodos activados

2.3.2.5 Lagunas aireadas

Las lagunas aireadas son tanques con profundidades de 1 a 4 m en las que la oxigenación de las aguas residuales se realiza mediante unidades de aireación, bien sean superficiales, turbinas o difusores. La diferencia fundamental entre lagunas aireadas y el sistema de lodos activados es que en éste se lleva a cabo la recirculación del lodo como forma de controlar la cantidad de lodo biológico en el reactor de aireación. Las lagunas aireadas son sistemas sin reciclado de lodos. La concentración de sólidos en las lagunas es función de las características del agua residual y del tiempo de residencia. Dicha concentración está comprendida entre 80 y 200 mg/l, esto es, mucho menor que la que se utiliza en las unidades de lodos activados convencionales (2000-3000 mg/l). El nivel de turbulencia en las lagunas es la base para su clasificación en dos categorías: de mezcla completa y lagunas facultativas.

El proceso de lagunas aireadas es esencialmente el mismo que el de lodos activados de aireación prolongada convencional, excepto que se usa un depósito excavado en el terreno como reactor, y que el oxígeno requerido por el proceso es suministrado por aireadores de superficie o difusores. En los sistemas de lagunas aireadas es posible realizar nitrificación, tanto estacional como continua. El grado de nitrificación depende del diseño y de las condiciones de operación dentro del sistema y de la temperatura del agua residual. Generalmente, cuanto más alta sea la temperatura del agua residual y menores las cargas (aumento del tiempo de retención de los lodos), mayores serán los grados de nitrificación que puedan alcanzarse.

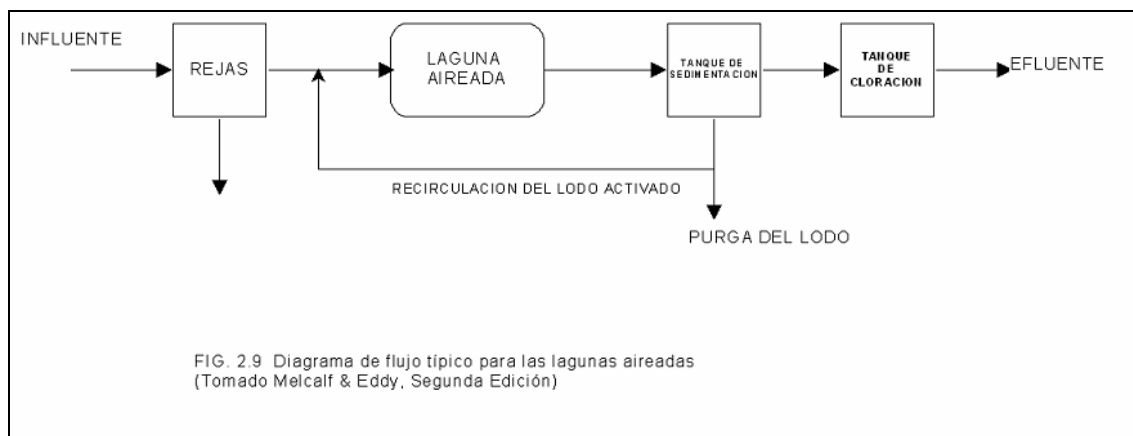


Figura 2.9 Diagrama de flujo típico para las lagunas aireadas (tomado Melcalf & Eddy, Segunda Edición, años)

2.3.2.6 Reactores discontinuos

Los reactores de operación discontinua conocidos como SBR (sequencing batch reactor) representan una variación del sistema de lodos activados de llenado y vaciado. En contraste con el sistema continuo, el agua residual es introducida al reactor en un tiempo definido de antemano. La remoción bioquímica de contaminantes y la separación posterior de la biomasa se llevan a cabo en el mismo tanque a diferentes tiempos de operación. Una diferencia

básica con relación a los sistemas continuos es que las fases del proceso son secuenciales y se repiten de forma periódica, mientras que en los sistemas continuos son secuenciales en espacio, es decir los procesos se llevan a cabo en tanques distintos (WEF y ASCE, 1998).

Dentro de los aspectos a considerar en el diseño se encuentran el gasto o caudal cambiante; el volumen de llenado; el tiempo de vaciado; el número de reactores, que depende de la curva de volúmenes acumulados de agua diaria; tanque de almacenamiento, que depende de la cantidad de reactores y de la forma de la curva diaria de caudales del influente; en lo que se refiere a aspectos bioquímicos, la carga orgánica aplicada, la rapidez de utilización de oxígeno, el tiempo de retención celular, la duración del ciclo y el abultamiento de lodos son factores a considerar en el diseño.

Algunas ventajas y desventajas de los reactores discontinuos se enlistan a continuación de acuerdo a EPA (1992).

a) Ventajas

- Los procesos de igualación de caudales, sedimentación primaria (en la mayor parte de los casos), tratamiento biológico, y sedimentación secundaria pueden llevarse a cabo en un solo reactor.
- Flexibilidad de operación y control.
- Requerimientos mínimos de área.
- Reducción de costo de capital al ahorrarse los sedimentadores y otros equipos.

b) Desventajas

- Se requieren altos niveles de equipamiento para control, comparados con los sistemas convencionales, especialmente para grandes sistemas, en cuanto a unidades de medición de tiempo y controles.

-
- Altos niveles de mantenimiento, comparados con los sistemas convencionales, asociado con mayor sofisticación de controles, dispositivos automatizados y válvulas automatizadas.
 - Posibilidad de descargar sólidos suspendidos o sedimentados durante el vaciado o fase de decantación para algunas configuraciones.
 - Riesgo de obstrucción de los dispositivos de aireación durante los ciclos de operación seleccionados, dependiendo de los sistemas de aireación usados por el fabricante.
 - Posibilidad de requerimientos para regulación, igualación después del arranque del sistema, dependiendo de las sobrecargas del proceso.

La forma de operación de un reactor discontinuo consiste básicamente de los siguientes cinco pasos:

- a) Reposo
- b) Llenado
- c) Reacción
- d) Sedimentación
- e) Vaciado y espera

Estos tienen la flexibilidad de aceptar cambios en la secuencia de sus etapas de llenado y de reacción, dependiendo del objetivo del tratamiento, es decir, si se requiere solamente degradar la materia orgánica o si incluye también: 1) nitrificación, 2) eliminación de nitrógeno, o 3) remoción tanto de nitrógeno como de fósforo (EPA, 1992).

3. METODOLOGIA

En este capítulo se describe la forma en que se realizó el trabajo experimental, tanto en lo referente a lo realizado en la implementación de técnicas histológicas aplicables al medio de soporte elegido (hule espuma de poliuretano), así como también lo realizado en la obtención de imágenes con los diferentes microscopios utilizados.

Se detallan todos los pasos realizados en la preparación de especímenes, teniendo en cuenta que solo es aplicable en aquellos que necesiten analizarse internamente y que como principal característica es que dichas muestras estén carentes de una rigidez suficiente para poder realizar cortes a lo largo de alguna sección propia y de que estos cortes sean lo suficientemente finos.

Por lo tanto esta técnica se aplica a muestras en donde el análisis sea con fines destructivos, y también, en aquellos especímenes que no se puedan manejar con facilidad a la hora de realizar los cortes requeridos en cada caso sin alterar las condiciones originales. Entonces dicha técnica se tiene que modificar si se quiere aplicar a materiales tales como tezontle (utilizados como medio de soporte para el crecimiento de la biomasa), o algunos otros materiales duros que se quieran analizar.

3.1 Selección y descripción del medio de soporte

La finalidad de agregar cubos (hule espuma de poliuretano) dentro de algunos reactores, es de incrementar la concentración de biomasa activa, pues siendo un material altamente poroso, se garantiza el crecimiento de microorganismos dentro del material en una gran concentración, logrando con esto una mejor remoción de carga orgánica entre otros parámetros, y estos están sujetos a las condiciones con las que el reactor fue diseñado (Vargas, 2005).

En instalaciones típicas, los cubos de espuma plástica ocupan de un 10 a un 30% del volumen total del tanque. Típicamente se usan difusores de burbuja pequeña para poder mezclar el contenido del tanque más eficientemente y proveer el oxígeno requerido para mantener a los microorganismos vivos.

La selección del medio de soporte depende de diversos factores (Tyagi y Vembu, 1990).

- a) Resistencia a la abrasión
- b) Resistencia a la degradación microbiana
- c) Capacidad como medio de soporte
- d) Facilidad para el mezclado
- e) Tipo de agua residual por tratar
- f) Características de la superficie
- g) Características de sedimentabilidad y
- h) Costo del medio de soporte

El área superficial expuesta al crecimiento de la biopelícula depende de la cantidad, tamaño y porosidad del medio de soporte. Se ha observado que a mayor diámetro de la partícula, menor área superficial y a mayor porosidad del material, mayor área superficial expuesta. Por lo tanto, la eficiencia del sistema depende del número de partículas por unidad de volumen del reactor, así como de la forma, el tamaño, porosidad y densidad del material.

Para la selección del medio de soporte se analizaron dos variables importantes:
a) la resistencia y dureza del material y b) la densidad específica del material.

Se seleccionó hule espuma Elastoflex D-30 R extrasuperfirme, en láminas de 2000x1200x10mm con las siguientes características (tabla 3.1).

Tabla 3.1 Características del material hule espuma (Datos fabricante)

CARACTERISTICAS	UNIDADES	VALOR
Densidad	kg/m ³	30.13
Tensión	KPa	195.86
Elongación	%	201
Desgarre	Kg/m	37.20
Resistencia	%	37.2

Una condición para el medio de soporte fue la forma de la partícula, la cual tenía que simular un flóculo de biomasa suspendido dentro del mezclado del reactor. Se tenían, por lo tanto, dos posibles formas: esférica o cúbica. Se decidió por obtener elementos cúbicos por su facilidad; para ello se cortaron las láminas con las características señaladas con el fin de obtener cubos de un centímetro por lado.

Entonces se tiene que el medio de soporte es un cubo de poliuretano de 1 cm en sus aristas el cual, dada sus condiciones óptimas de densidad y porosidad, permiten la formación de biopelícula al estar en contacto directo con las aguas residuales de un reactor cuyo propósito es la remoción de fósforo y nitrógeno junto con la materia orgánica.

En dicho reactor se presentan cuatro etapas de seis horas cada una, formando ciclos de 24 horas:

- a) Llenado
- b) Reacción (anóxica-anaerobia)
- c) Aeración (anaerobia)
- d) Vaciado

Entonces se tienen distintas etapas en la formación de las biopelículas y por lo tanto una gran diversidad de microorganismos presentes, basándose en literatura en donde se explica que dada las condiciones citadas se tendrá la presencia de bacterias acumuladoras de fósforo, aunado a otros microorganismos.

En la figura 3.1, se observa el medio de soporte, hule espuma de poliuretano descrito anteriormente. El tamaño de poro oscila entre 500 y 1000 μm ; en la imagen se muestra un tamaño de poro de 500 μm , pero en otros puntos éste varia.

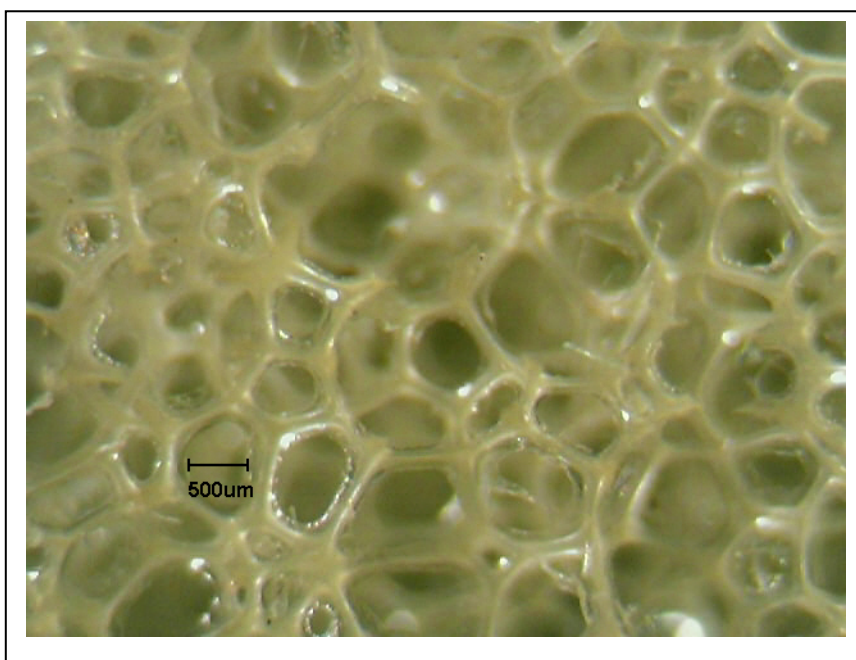


Figura 3.1 Hule espuma de poliuretano

3.2 Preparación de especímenes para microscopio

Como se muestra en la figura 3.1 (Página 47), los cubos de hule espuma carecen de una rigidez adecuada para poder realizar cortes. Aunado a que se introducirán en el reactor y al estar en contacto con las aguas residuales se tendrán condiciones más adversas para su manejo. El fin de este trabajo es precisamente estudiar y comprender cómo es la estructura de las biopelículas en dicho medio de soporte, para esto se tienen que estudiar todas las condiciones de dicho cubo; es decir analizar todo el cubo desde sus paredes externas hasta su estructura interna, y poder determinar cómo son las condiciones al interior del cubo. Para esto se implementaron técnicas histológicas a dicho medio con tal de obtener secciones delgadas y que al analizarlas al microscopio permitieran obtener imágenes y datos más precisos.

El procedimiento utilizado en las técnicas histológicas se adecua a los objetivos del trabajo; por un lado se desea analizar las condiciones más semejantes posibles cuando la muestra estaba en el reactor y con esto identificar la vida microbiológica presente. Por otro lado, poder realizar cortes transversales a dicho cubo y observar las variaciones que se presentan en el crecimiento de la biopelícula; generalmente para esto se realiza todo un proceso cuyos objetivos se mencionaron previamente. En general se sigue el siguiente procedimiento:

- 1) Fijación
- 2) Inclusión
- 3) Cortes
- 4) Tinción
- 5) Montaje
- 6) Observación

A continuación se detallan algunas etapas y, en su caso, los pasos intermedios necesarios, posteriormente en el protocolo de tiempos

1) Fijación y deshidratación

La fijación es un proceso que provoca la muerte rápida de las células, de tal manera que conserven lo mejor posible sus características morfológicas, químicas y estructurales, a fin de poder estudiar el mismo en el estado más semejante posible al que presentaba cuando estaba vivo.

Se utilizó para tal fin el fijador de Bouin, así como también formol al 10%. El fijador de Bouin es una solución que contiene 75 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 25 ml de formol y 5 ml de ácido acético glacial.

Las piezas al ser retiradas del fijador, y después de haberlas lavado quedan embebidas en agua, impidiendo que sean penetradas por la parafina. Por lo tanto, en primer lugar, se deben deshidratar los tejidos sumergiéndolos en líquidos anhidros, ávidos de agua. Para evitar alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se aconseja proceder escalonadamente utilizando, preferentemente, alcohol etílico de graduación creciente.

Se aplica una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor de agente deshidratante, por ejemplo, alcohol etílico o acetona. Iniciando con alcohol al 50 %, luego con una solución de 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y alcanzando de manera paulatina el alcohol al 100 % para eliminar el agua. Esto se hace porque si se colocara el tejido en una solución al 100% de alcohol inmediatamente, el agua saldría muy rápido del tejido y se deformaría.

2) Inclusión

A fin de que se puedan obtener cortes suficientemente finos para ser observados al microscopio, las muestras tienen que ser incluidas y envueltas por una sustancia de consistencia firme. Las sustancias usadas para este fin son: parafina blanda (punto de fusión de 46-49 °C) y parafina dura (punto de fusión de 51-56 °C).

3) Realización de los cortes

El material incluido se secciona mediante aparatos llamados *microtomos*, que proporcionan secciones, cuyo grosor se mide en micras. Los cortes normalmente se adhieren unos a otros para formar una cinta, que se recoge con ayuda de un pincel para no dañar el filo de la cuchilla. Si no se dispone de dicho aparatos, se secciona con herramientas tales como estuches de disección, o instrumentos similares.

4) Tinción de los cortes incluidos en parafina

Tiene como misión teñir los diferentes componentes celulares y tisulares de forma que se facilite su observación. Para empezar se utilizará la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E). De una manera muy general, se comienza por sobrecolorear el corte en la solución correspondiente y después se elimina el exceso de color por el lavado (diferenciación), en un líquido adecuado. Antes de teñir es necesario desparafinar e hidratar con agua.

Después de haber realizado los cortes y haberlos fijado a los portaobjetos se procede a quitar la parafina para poder realizar la tinción. Para esto se tiene un tren de desparafinado el cual consiste en introducirlos en xilol, en primer lugar, y posteriormente para hidratar debe hacerse una inmersión de las

preparaciones en alcoholes de concentración decreciente hasta llegar al agua destilada.

Es importante tener presente lo que se quiera poner en evidencia, para ello se utilizan distintos tipos y técnicas de tinción.

3.2.1 Protocolo de tiempos orientativos de permanencia en los distintos líquidos (Anadón, 2002):

1. Fijación

Tiempo óptimo de fijación, 4- 18 h, (utilizaremos formol al 10%) a temperatura ambiente; pH ácido. Posteriormente se puede conservar en Alcohol 70%. Si se utiliza fijador de Bouin se recomienda como tiempo óptimo de fijación de 6-12 h.

1.2. Deshidratación

1. Lavar la pieza (agua del grifo) para eliminar el fijador (durante 15 min).
2. Deshidratación de la pieza por medio de una serie de alcoholes, de concentración creciente, en tubos o recipientes tapados:

Alcohol 70°	1 h
Alcohol 96°	1 h
Alcohol 96°	1 h
Alcohol absoluto ($\pm 99.5^\circ$)	1 h
Alcohol absoluto ($\pm 99.5^\circ$)	1 1/2 h

NOTA: Con alcohol absoluto conviene poner un poco de algodón en el fondo del recipiente, y la pieza encima, para que el agua al tener más densidad, vaya al fondo y la deshidratación sea completa.

- Líquido intermedio con xileno o tolueno.

Xileno/Tolueno	1 h
Xileno/Tolueno	1 h

2. Inclusión

De aquí en adelante en estufa

Parafina blanda (Punto de fusión 46-49°C)..... 10 min.

Parafina dura (punto de fusión 51-56°C)..... 15 min.

3. Obtención de secciones

Cuando se realicen cortes con *microtomo* (o cualquier otro instrumento), se debe tener un baño maría (con agua y grenetina en su interior; dentro de este no debe haber formación de burbujas). Cada corte obtenido se coloca dentro del baño maría se adhiere al portaobjeto, y se sacan con los cortes respectivos.

3.1. Desparafinado

1° Xilol..... 10 min

2° Xilol..... 10 min

3.2. Hidratación con agua

Alcohol absoluto (\pm 99.5%)..... 5 min

Alcohol 96%..... 5 min

Alcohol 70%..... 5 min

Agua destilada.....5 min

4. Tinción (Se utilizará la tinción Hematoxilina-Eosina)

Hematoxilina de Gill..... 1.5 min

Agua 5 min

Agua 2 min

En el procedimiento siguiente se tiene que tener especial atención ya que se realizan en secuencia, es decir no hay necesidad de tiempos específicos de permanencia (1, 2, 3, Significa: 3 inmersiones consecutivas).

- a) Alcohol acidulado..... 1, 2, 3
- b) Agua destilada..... 1, 2, 3
- c) Carbonato de litio..... 1, 2, 3
- d) Agua destilada..... 1
- e) Alcohol 50%..... 1, 2, 3
- f) Agua destilada..... 1, 2, 3
- g) Alcohol 70%..... 1, 2, 3
- h) Eosina..... 1
- i) Alcohol 96%..... 1

- Aclarado

- Alcohol 96%..... 5 min
- Alcohol absoluto..... 5 min
- Alcohol-Xilol..... 5 min

5) Montaje.

1. 1º Xilol
2. 2º Xilol
3. Se agrega una gota de bálsamo de Canadá sobre el cubreobjeto.
4. Se seca la cara opuesta del portaobjetos (donde no se tiene muestra), teniendo cuidado de no dejar secar mucho los mismos.
5. Posteriormente se sumerge nuevamente en xilol (entrada por salida) y se coloca sobre el cubreobjeto (el cual contiene la gota de bálsamo de Canadá).

Al realizar el procedimiento anterior se observará cómo se adhieren entre si los cristales, posteriormente se deben de poner verticales con el fin de permitir el flujo de excedentes. Se ponen a secar a temperatura ambiente o en su caso en estufa con una temperatura en su interior de 20-30 °C, esto último es lo más recomendable.

3.2.2 Técnicas de tinción

Con base en los objetivos particulares, existen diversas técnicas que ayudan a identificar los microorganismos esenciales para este trabajo. A continuación se citan las técnicas que resultaron más óptimas en este trabajo.

a) AZUL METILENO-ROJO RUTENIO

Material

- Azul de metileno.
- Rojo de rutenio.

Procedimiento

- a. Teñir durante 5- 10 min, en azul de metileno alumínico (1gr azul de metileno + alumbre: 10gr +agua destilada: 100ml).
- b. Lavar con agua destilada.
- c. Teñir 5-10min, en una solución al 0.1% de rojo de rutenio. Esto es sal (Sesqui cloruro de rutenio amoniacal).
- d. Lavar con agua destilada.
- e. Deshidratar en alcoholes graduales y montar.

b) SAFRANINA- AZUL DE METILENO

Colorantes

- Safranina.
- Azul de metileno.

Procedimiento

- 1) Teñir en safranina alcohólica 1% por 24 horas.
- 2) Lavar con agua destilada.
- 3) Teñir con azul de metileno 1% de 2 a 5 min.
- 4) Lavar con agua destilada.
- 5) Deshidratar con alcoholes graduales y montar.

c) AZUL DE TOLUIDINA**Colorante**

- Azul de toluidina.

Procedimiento

- 1) Teñir en azul de toluidina durante 1.5 min.
- 2) Lavar con agua destilada.
- 3) Deshidratar en alcoholes graduales y montar.

d) TINCIÓN DE GRAM**Colorante**

- Violeta cristal.
- Yodo lugol (yodo-yoduro de potasio).
- Safranina.

Existen muchas modificaciones del método, pero en general, comprenden los siguientes pasos:

1. Teñir con una solución de cristal violeta (cristal violeta 2 gr + alcohol metílico, 100 ml), durante 1 min.
2. Lavar con agua destilada.

-
3. Teñir en yodo-yoduro de potasio (actúa como mordiente), durante 1 min.
 4. Lavar con agua destilada.
 5. Efectuar la decoloración con alcohol o alcohol acetona.
 6. Lavar con agua destilada.
 7. Luego se efectúa una coloración de contraste con safranina, durante 1 min.
 8. Se coloca el preparado en posición vertical dejando que drene el agua y el frotis se seque.
 9. Se examina el frotis teñido con aceite de inmersión con el objetivo x100 del microscopio.

Es importante mencionar que primero se tiene que saber que se quiere poner en evidencia; aunado a lo anterior se debe disponer del tiempo necesario para la realización de dichas técnicas. Es aconsejable realizar primero el protocolo desde su inicio hasta la inclusión y posteriormente y con más calma se realiza la obtención de los cortes y la tinción aplicable en cada caso.

Debe disponerse de los materiales, reactivos y sustancias adecuadas para cada caso, al igual que un lugar específico de trabajo en donde se disponga de espacio suficiente.

Los tiempos que aquí se presentan son con base en experimentos realizados previamente, estos se pueden modificar.

3.3 Obtención de imágenes

En 1647 un tallador de lentes holandés de escasa formación científica llamado Antoni van Leeuwenhoek construyó diminutas lentes biconvexas montadas sobre platinas de latón que se sostenían muy cerca del ojo. A través de ellas podía observar objetos que montaba sobre la cabeza de un alfiler, ampliándolos hasta 300 veces. Fue el primero que vio los microbios.

Sin embargo, no fue sino hasta mediados del siglo XIX que Pasteur, en Francia, y Koch, en Alemania, demostraron que los microorganismos eran responsables de actividades biológicas específicas y causantes de algunas enfermedades como la tuberculosis.

Terminado el protocolo y teniendo las muestras lo suficientemente finas ya montadas sobre los portaobjetos y listas para observarse, cuyo espesor de corte oscila entre los 10 y 15 μm , se procedió a realizar el análisis al microscopio; éste se realizó utilizando dos tipos de microscopios: uno de ellos es un microscopio digital MIC-D que tiene un zoom de 22x a 270x, el segundo es un microscopio óptico LEITZ con cuatro objetivos oculares 10x, 25x, 45x y 100x.

Se utilizaron diversas técnicas de obtención de imágenes eligiendo aquellas más adecuadas, dependiendo de la muestra y del microscopio utilizado en cada caso.

En la literatura se explica que existen diferentes formas del crecimiento de la biopelícula, la más ampliamente aceptada es la forma sigmoidea, es decir en forma de “hongo”; ésta es la forma que sigue el crecimiento de las bacterias. Por otro lado, en los procesos secundarios o biológicos se utilizan microorganismos para eliminar el material orgánico disuelto. Estos procesos involucran la intervención de organismos de tipo procarionte como bacterias y de tipo eucarionte como protozoarios y metazoarios.

Desde el punto de vista de la ecología, los sistemas biológicos para tratamiento de aguas residuales representan ambientes microbiológicos muy complejos. La pirámide indicada en la fig. 3.2 representa los diferentes grupos nutricionales en una comunidad; cada sección horizontal se conoce como nivel trófico. Consta de dos partes principales:

- La base constituida principalmente por materia orgánica y sales minerales.
- La pirámide la cual representa los diferentes niveles tróficos presentes en el sistema.

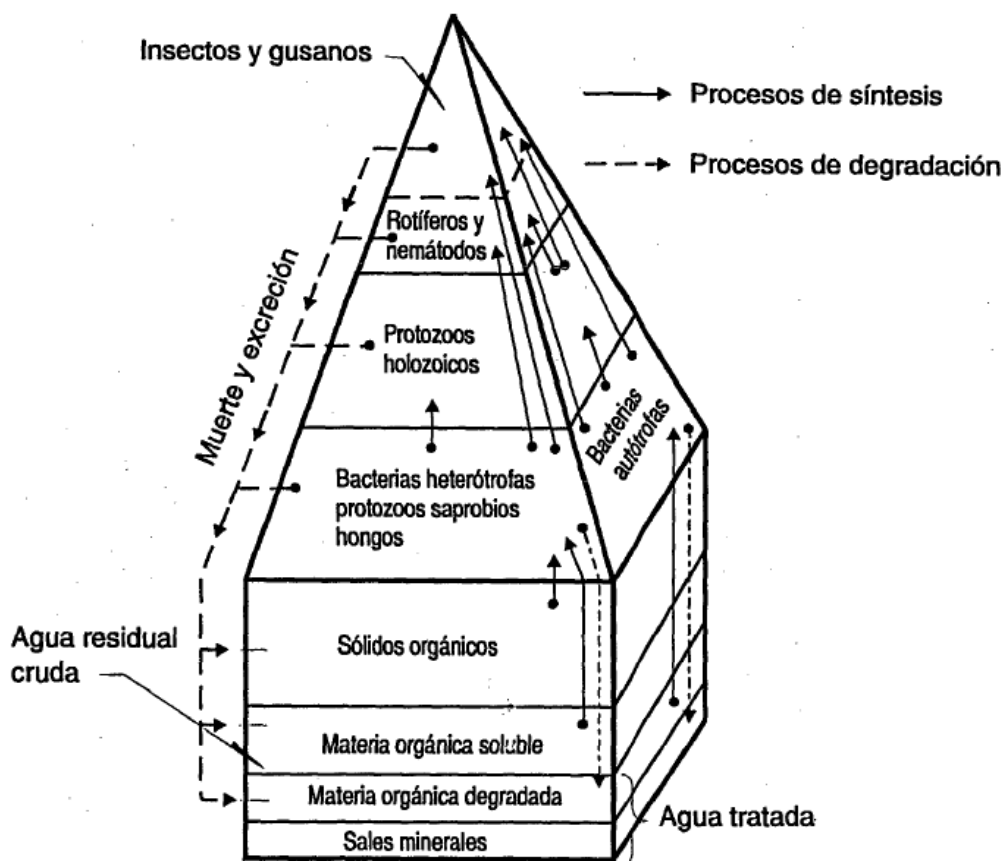


FIG. 3.2 Pirámide alimenticia (Diferente grupos nutricionales).

3.4 Procesamiento de imágenes

Las imágenes se procesaron para obtener su escala, en algunas de estas imágenes se modifica su nivel de contraste, su brillo, y algunos otros parámetros que pueden ser modificados y con esto lograr observar con más calidad las diversas imágenes. Esto fue realizado con diversos programas de manejo y procesamiento de imágenes, y de igual manera con el software propio del MIC-D, que es de gran ayuda en este tipo de trabajo.

Es decir, este trabajo de alguna u otra manera trata de poner en evidencia el uso potencial del microscopio MIC-D, utilizado frecuentemente durante todo este trabajo, y lograr así obtener imágenes de buena calidad y mejorar la misma o trabajar la imagen de una manera que sea perceptible y fácil de notar los cambios a los que ha sido sometida.

De igual manera, se demuestra que es fácil realizar análisis microbiológicos a los que normalmente no se está acostumbrado en el ámbito ingenieril.

Una imagen dice más que mil palabras, pero si esa imagen tiene claramente definido parte por parte de lo que se trata, entonces diremos que será entendible para todo aquel ajeno a las actividades del ingeniero ambiental.

El procesamiento de las imágenes se ha realizado sólo en algunas de éstas, muchas otras se deben de dejar tal y como se obtuvieron, logrando con esto poner en contraste las ventajas de manejar nuevas herramientas y conocimientos en cuanto a microbiología y software usado en dichos análisis.

4. RESULTADOS

4.1 Implementación de técnica para uso práctico

Después de realizar diversas pruebas de tiempos y análisis al microscopio, se concluyo que los tiempos óptimos aplicables a este tipo de muestras son los siguientes:

Protocolo de tiempos sugeridos de permanencia en los distintos líquidos:

a) Fijación

Líquido de Bouin y/o formol al 10%..... 6 – 18 h.

b) Deshidratación

Alcohol 70°..... 1 h.

1° Alcohol 96°..... 1 h.

2° Alcohol 96°..... 1 h.

1° Alcohol absoluto ($\pm 99.5^\circ$)..... 1 h.

2° Alcohol absoluto ($\pm 99.5^\circ$)..... 1 ½ h.

Nota: Ver metodología (Pág. 51)

- Líquido intermedio con xileno o tolueno (utilice el que disponga).

1° Xileno/Tolueno..... 1 h.

2° Xileno/Tolueno..... 1 h.

Nota: Si no se dispone de alguna de estas dos sustancias, puede prescindir de ellas, observe los resultados y tome sus decisiones.

c) Inclusión

- Parafina blanda (punto de fusión 46-49°C)..... 15 min.

- Parafina dura (punto de fusión 51-56°C)..... 15 min.

* Al sumergir las muestras, se debe evitar que queden burbujas de aire en el interior de las mismas.

d) Obtención de secciones (cortes).

e) Desparafinado

1º Xilol..... 15 min.
2º Xilol..... 15 min.

f) Hidratación con agua

Alcohol absoluto ($\pm 99.5\%$)..... 5 min.
Alcohol 96%..... 5 min.
Alcohol 70%..... 5 min.
Agua destilada.....5 min.

g) Tinción Gram (ver metodología pagina 54)

g) Montaje (Ver metodología pagina 53)

La elección de la tinción adecuada está basada en los objetivos particulares planteados al inicio de cada trabajo en particular, se debe tener presente que los resultados en algunas ocasiones varían en cuanto a tonalidad, fijación del colorante y otros parámetros que se basan en los tiempos de estancia en cada sustancia propia de la técnica. Esto no representa problema alguno, pero lo que se debe llevar con cuidado son los tiempos de inicio y fin de cada fase del protocolo.

Lo recomendable es primero realizar un horario completo de experimentación, y con base en éste, los resultados serán mejores, y se tendrá todo el tiempo disponible para realizar dicho procedimiento.

4.2 Descripción y discusión de imágenes

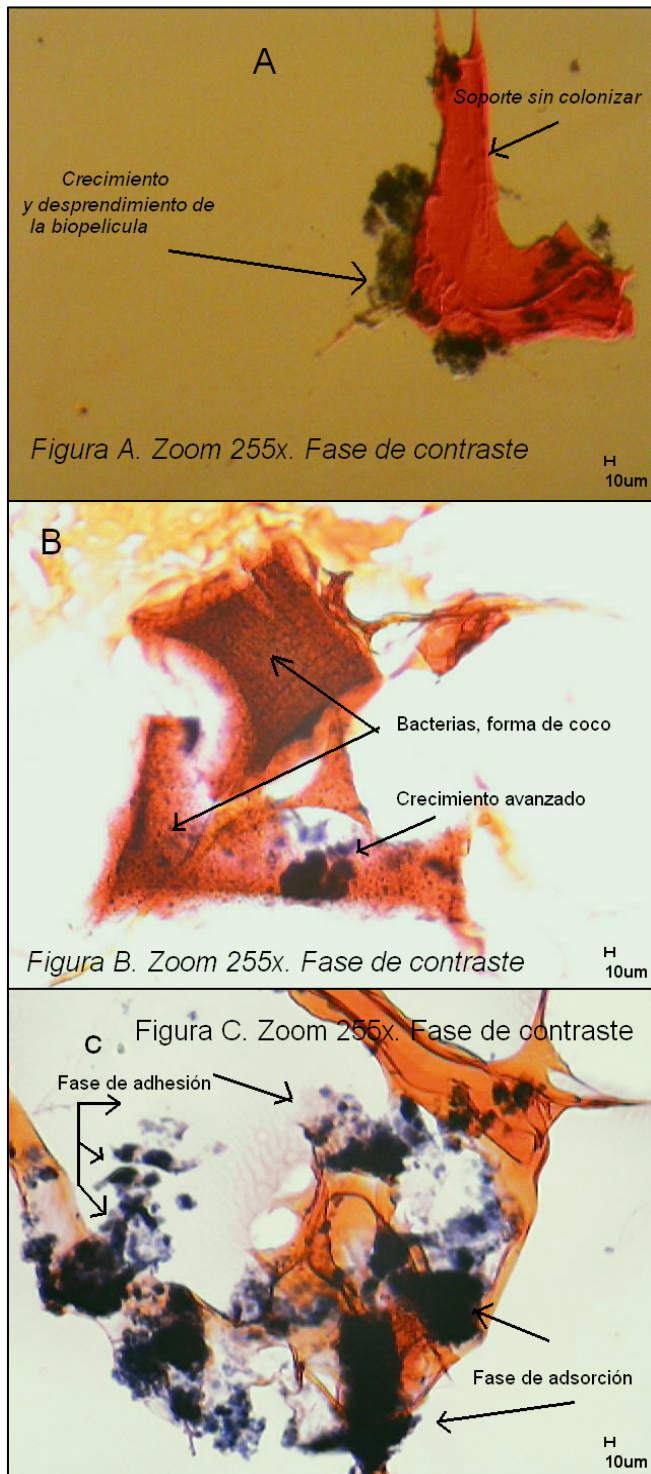
Una vez realizado parte del procedimiento citado anteriormente y con la muestra incluida en la parafina, se procedió a realizar cortes con un micrótopo, con lo cual se procedió a realizar la segunda parte del protocolo; se utilizaron diversas técnicas de tinción, se montaron y analizaron las muestras al microscopio MIC-D.

Las imágenes obtenidas se clasificaron de varias maneras:

- I) Por la técnica de tinción utilizada.
- II) Por el microscopio utilizado.
- III) Por la secuencia de cortes.
- IV) Discusión de teorías.

Ante todo, se debe tener presente que la discusión principal es la forma y crecimiento de la biopelícula, considerando los efectos que se presentan por el crecimiento y formación de dichas agrupaciones adheridas a los cubos de hule espuma, es decir, los resultados obtenidos en el funcionamiento del citado reactor.

4.2.1. Por la técnica de tinción utilizada

A) Utilizando técnicas de *hematoxilina-eosina* (figura 4.1).

Todas las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 255x. La barra de escala representa 10 µm.

- La imagen A se obtuvo rotando el brazo iluminador 35° respecto a la horizontal.
- La imagen B se obtuvo del tercer corte realizado en la muestra. a 45 µm de la superficie.
- La imagen C se obtuvo con el brazo iluminador vertical, del corte 1.

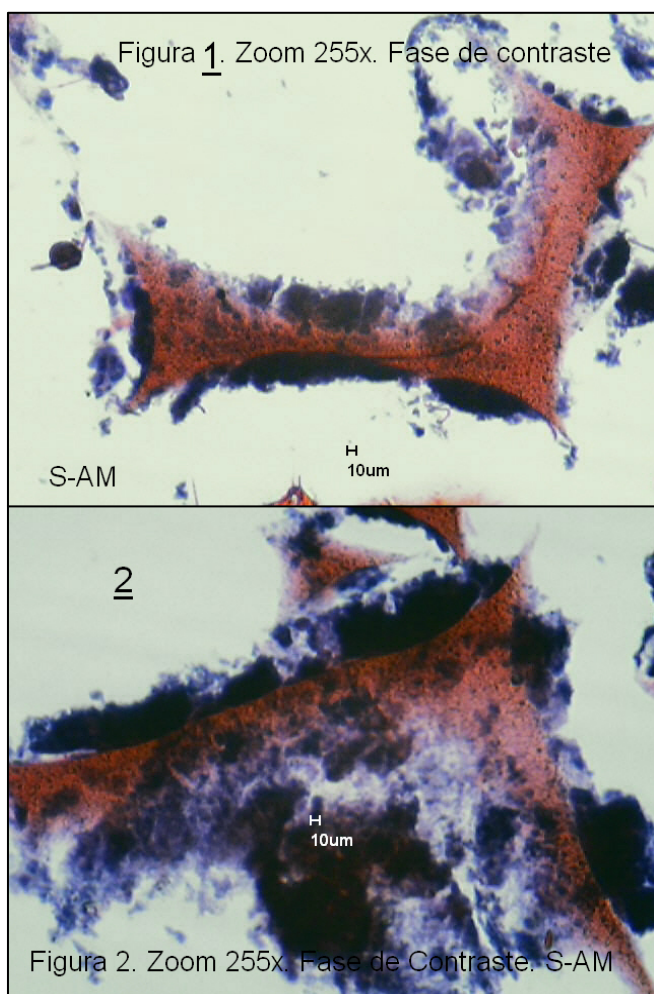
Figura 4.1 Imágenes con tinción H-E. A) Brazo rotado 35°. B) Corte a 45µm. C) Brazo 90°.

En las tres imágenes anteriores lo rojo-anaranjado es el medio de soporte (hule espuma de poliuretano), lo negro es la biopelícula adherida al mismo. Los mecanismos que sigue el crecimiento de la biopelícula se muestran muy claros, es decir, de la imagen 4.1.A se puede afirmar que las fases de inducción y la de estabilización (Luna *et al*, 1990) se han presentado simultáneamente en diversas partes del medio de soporte, ya que hay espacios intermedios sin colonizar y a su vez el crecimiento de la biopelícula es muy avanzado en otros lados del medio de soporte.

Por otro lado en la imagen 4.1.B₁ se observan pequeños puntos negros homogéneos sobre todo el medio de soporte, por el tamaño se piensa que son bacterias de forma de cocos (descritos en el capítulo 2); pero también se observan otros mucho más grandes en donde el nivel de nutrientes debe ser más elevado y por lo tanto su crecimiento está basado en esto y otros factores.

En 4.1.C las cosas cambian drásticamente, todo es muy irregular, en ésta se pueden evidenciar las fases de adsorción y adhesión (Characklis y Marshall, 1998), porque la fase de adsorción se da hacia el medio de soporte y la fase de adhesión se da entre células y el medio líquido, es decir entre microorganismos adheridos y el medio líquido en donde captan nutrientes y nuevas células, logrando con esto un crecimiento de la biopelícula.

B) Utilizando la técnica *safranina-azul de metileno* (figura 4.2).



Tinción Safranina-Azul
Metileno, Zoom 255x.

Ahora en las imágenes de la izquierda (1 y 2), lo teñido de color anaranjado es el medio de soporte (hule espuma de poliuretano), y lo azul marino es el crecimiento de la biopelícula adherida al mismo.

La variación de la forma y espesor es muy notable.

Figura 4.2 Tinción S-AM. MIC-D 255x. 1) Parte superior del poro 2) Parte inferior del poro.

En la imagen 4.2.1 se observa que el medio de soporte no está cubierto totalmente en toda su superficie; además, que el crecimiento es muy variado. En algunos lugares ya se tienen etapas de desprendimiento y en otras la fase de crecimiento apenas comienza. En la imagen 4.2.2, la biopelícula ha cubierto aproximadamente un 95% de la superficie del medio de soporte, el crecimiento es muy considerable, se alcanza a apreciar algunos espacios vacíos entre cada capa de la biopelícula, sin tener una forma de crecimiento única. En ambas imágenes se observan con claridad canales por donde circulan los nutrientes y el oxígeno, o se forman por donde circulan los organismos depredadores.

C) Técnica safranina-azul de toluidina-azul de metileno (figura 4.3).

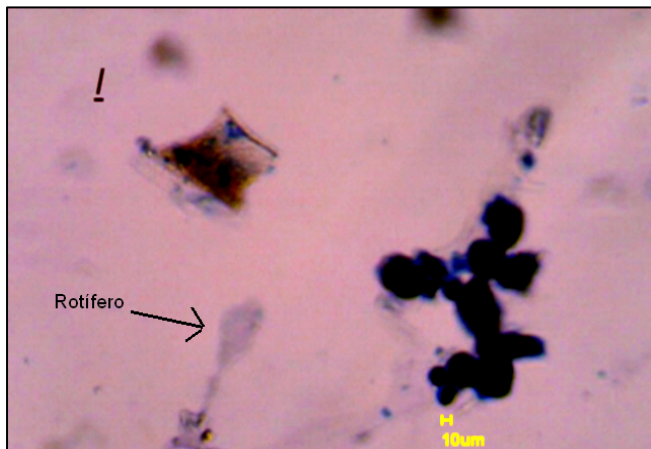


Figura I. Zoom 255x. Fase de Contraste. S-AM-AT

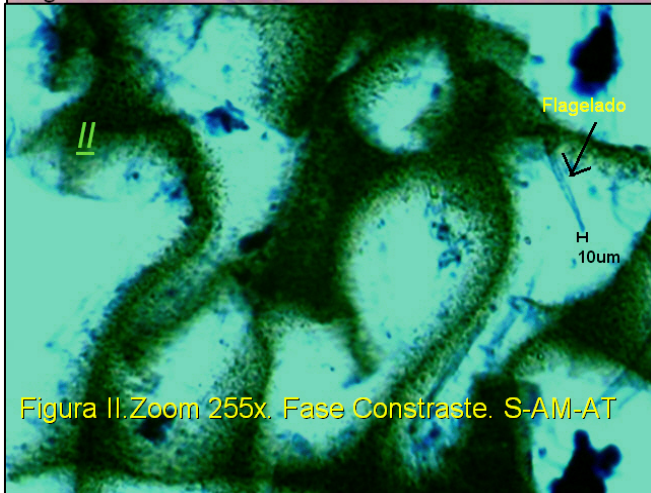


Figura II. Zoom 255x. Fase Constraste. S-AM-AT

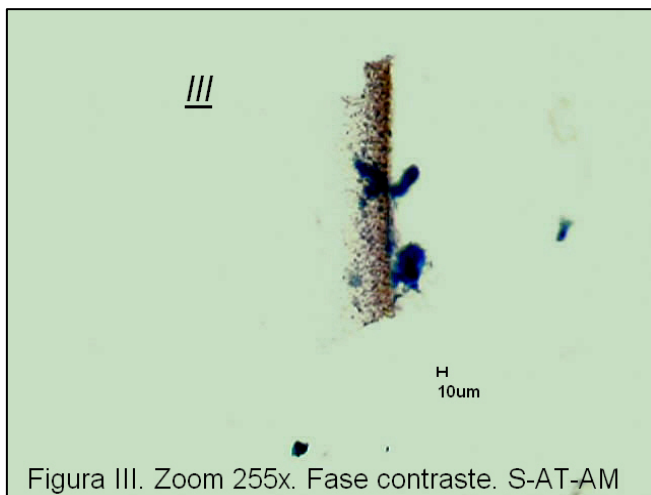


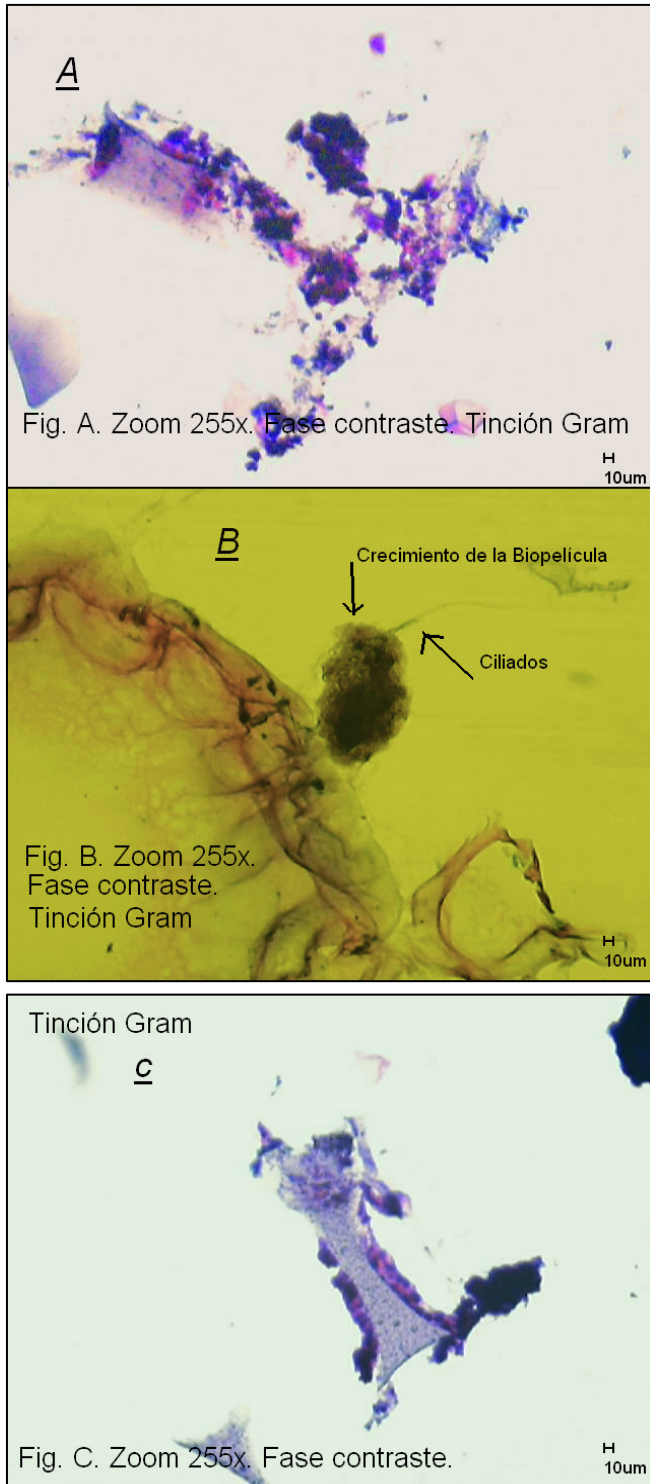
Figura III. Zoom 255x. Fase contraste. S-AT-AM

Tinción S-AT-AM, Objetivo de 255x, con el brazo iluminador rotado 30° con respecto a la vertical.

- En la figura I se observa biopelícula dispersa, siendo su tamaño aproximado de $10\ \mu\text{m}$ cada esfera. Se aprecian rotíferos y algunos ciliados.
- En el caso de la figura II, el medio de soporte se tiñe de café-verde, la biopelícula de azul. Además se observan flagelados.
- En la figura III se observa un corte de algún filamento que forma parte del medio de soporte, la forma del crecimiento de la biopelícula adherida al mismo y, de igual manera un desprendimiento y una adherencia en etapas secundarias.

Figura 4.3 Imágenes I, II, III

D) Tinción de Gram (figura 4.4).



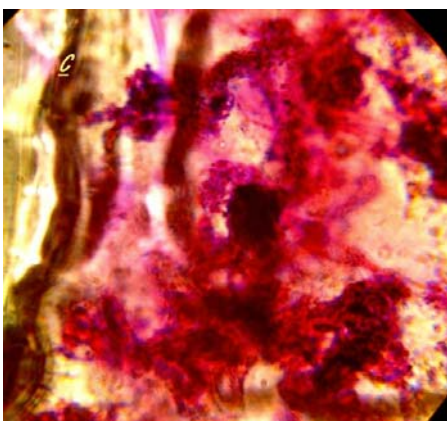
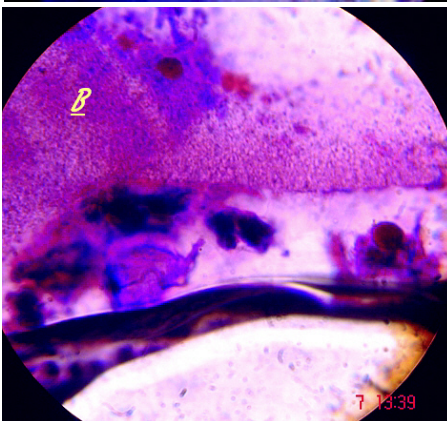
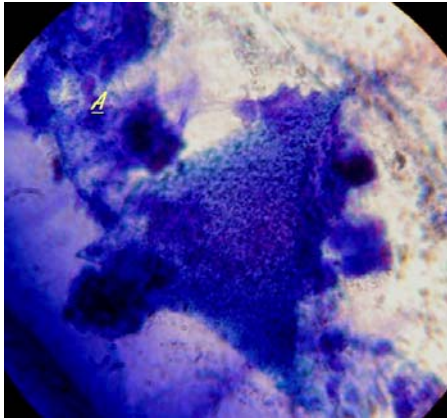
Las imágenes muestran gran cantidad de bacterias Gram positivas (color violeta) y Gram negativas (color rojo). Todas son de una profundidad de 150 μm con respecto a la superficie.

- La imagen 4.4.**A** se obtuvo con un objetivo de 255x. Se acentúan las colonias de bacterias.
- En la imagen 4.4.**B**, obtenida con un Zoom de 255X, se observa el crecimiento de colonias de bacterias, en general es en forma de hongo; en este caso la forma es redonda.
- En la imagen 4.4.**C** con un zoom de 255x; se observa cómo se produjo la adhesión de las bacterias al medio de soporte.

Figura 4.4 A) Presencia de rotíferos B) Presencia de flagelados C) Filamento del medio de soporte.

4.2.2. Por el tipo de microscopio utilizado

Las imágenes clasificadas dentro de las técnicas de tinción se obtuvieron con el microscopio MIC-D. Las que a continuación se presentan fueron obtenidas con el microscopio óptico LEITZ, con el objetivo de 100x. Se utilizó una cámara digital para tal fin.



La tinción que se utilizó fue la de Gram, los resultados clasificados como Gram positivo (violeta-azul) y Gram negativo (rojo), nos ofrecen una mejor visión de los microorganismos presentes, la estructura es lo que básicamente se observa con claridad.

- En la figura A se observa que la forma no tiene un orden específico. Tiene formas circulares en los extremos del medio de soporte y en otros lugares (fig. B) tiene una forma ovalada.
- En la imagen B los microorganismos coexisten formando las agrupaciones de biopelículas.
- En C mayoritariamente se tienen microorganismos Gram negativos.

Figura 4.5 A) Bacterias Gram positivas B) Bacterias en forma de cocos, y C) Bacterias Gram negativas. LEITZ 1000x, Tinción Gram.

4.2.3. Por la secuencia de cortes (figura 4.6).

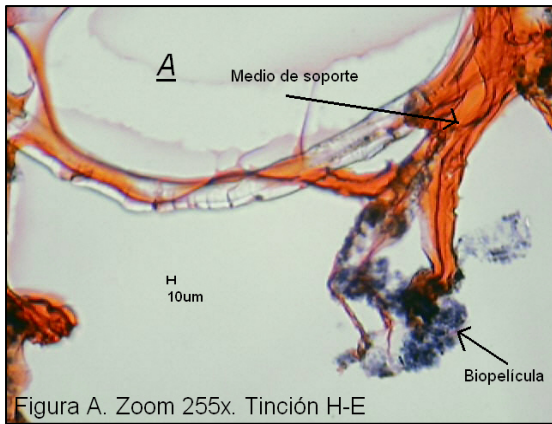


Figura A. Zoom 255x. Tinción H-E

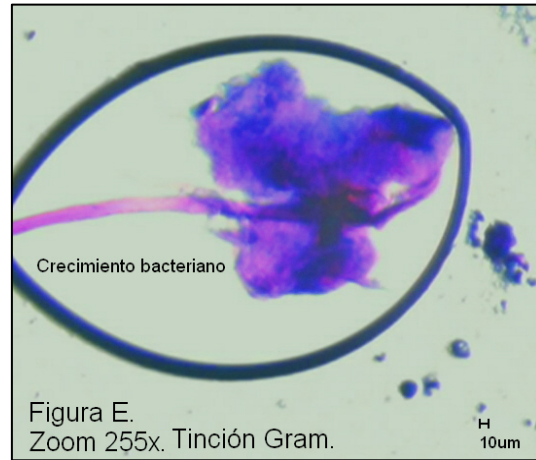


Figura E. Zoom 255x. Tinción Gram.

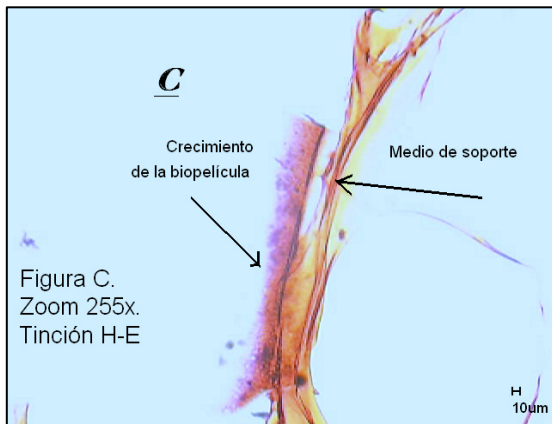


Figura C. Zoom 255x. Tinción H-E

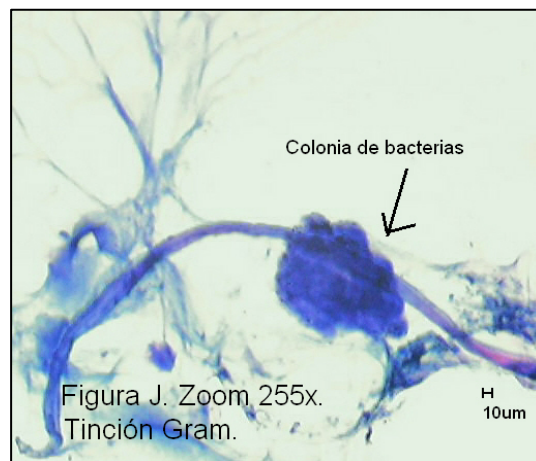


Figura J. Zoom 255x. Tinción Gram.

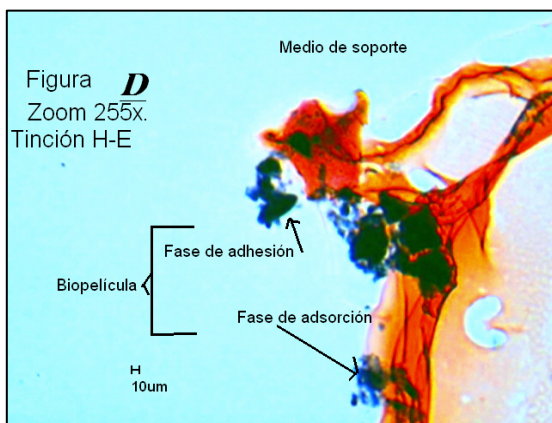


Figura D. Zoom 255x. Tinción H-E

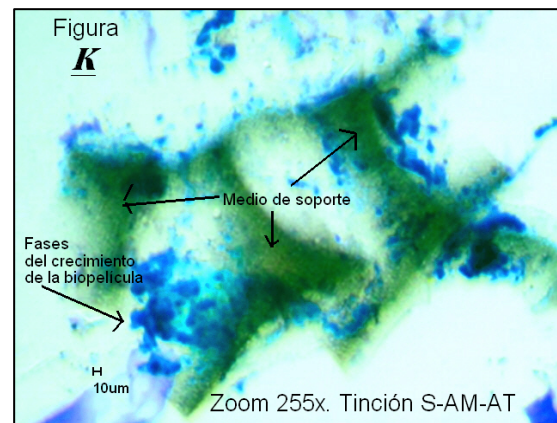


Figura K

Zoom 255x. Tinción S-AM-AT

Figuras 4.6 Imágenes A, C, D, E, J, K. MIC-D, 255x. Fase de contraste.

Las imágenes de las figuras 4.6.A, 4.6.C, 4.6.D, 4.6.E, 4.6.J y 4.6.K, se obtuvieron con el microscopio MIC-D, se modificaron de las originales, y se obtuvieron con un objetivo de 255x, fase de contraste. Los cortes son del extremo hacia el interior; es decir, la figura 4.6.A representa el corte a una profundidad de 45 μm respecto de la superficie del cubo de hule espuma, la figura 4.6.C el corte a 75 μm , la figura 4.6.D a 105 μm , la figura 4.6.E a 135 μm , la figura 4.6.F a 165 μm , todos medidos con respecto a la pared externa del cubo. Todos los cortes se realizaron con un espesor de 15 μm . Se tiñeron con diversas técnicas; en general la biopelícula se observa de color negro-violeta-morado, mientras que el material de soporte se colorea de rojo-anaranjado.

En las imágenes 4.6.A, 4.6.C, y 4.6.D, se observa que el crecimiento es muy lento, las etapas de adsorción y adhesión (Characklis y Marshall, 1995) están mostradas en estas imágenes. En las figuras 4.6.E y 4.6.J, se pone en evidencia que la tinción Gram es muy adecuada para este tipo de análisis; en éstas observamos crecimientos bacterianos. En la figura 4.6.K, la tinción Safranina-Azul metileno-Azul toluidina le da contraste a la biopelícula, y nuevamente confirmamos las teorías de formación de biopelículas.

Es decir, las etapas de formación de biopelículas se realizan en todo momento, pero con el paso del tiempo, el crecimiento alcanza grosores considerables.

4.2.4 Discusión de teorías y modelos

La literatura menciona diversas teorías de formación de las biopelículas Costerton *et al* (2000), mencionan que la biopelícula adquiere una forma de “hongo”, misma forma que sigue el crecimiento de las bacterias. Estudios de microscopía electrónica han demostrado que existen canales que permiten el paso de oxígeno y nutrientes a las partes más profundas de la misma.

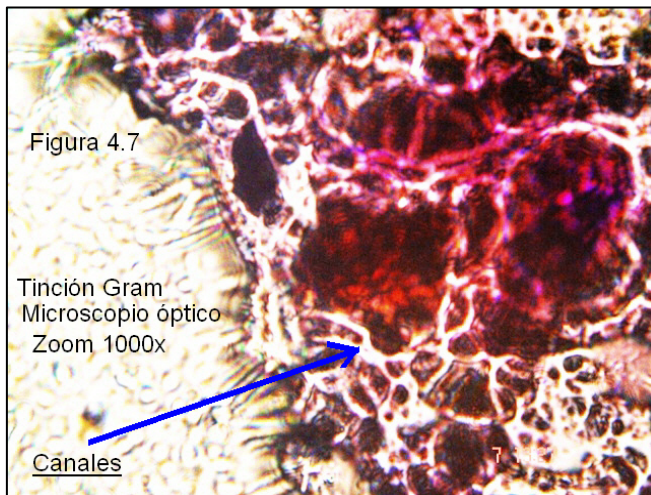


Figura 4.7 Microscopio óptico LEITZ, zoom 100x. Zoom total 1000x.

En la imagen de la figura 4.7, se aprecian los canales por donde circulan los nutrientes y el oxígeno, según sea el caso.

Se observa la biopelícula formada por agrupaciones de bacterias gram positivas (color violeta) y negativas (color rojo), de acuerdo con la tinción de Gram.

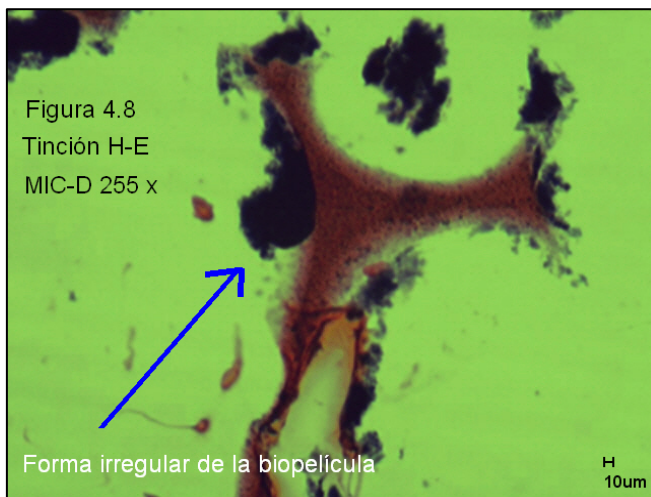


Figura 4.8 Tinción H-E, MIC-D, zoom 255x.

En la figura 4.8 la forma de dichas agrupaciones son muy variadas e irregulares, la forma de “hongo” se presenta pero no es muy común, esto se debe principalmente al tamaño del poro (300 μm) que no permite el crecimiento en forma perpendicular a la pared del poro.

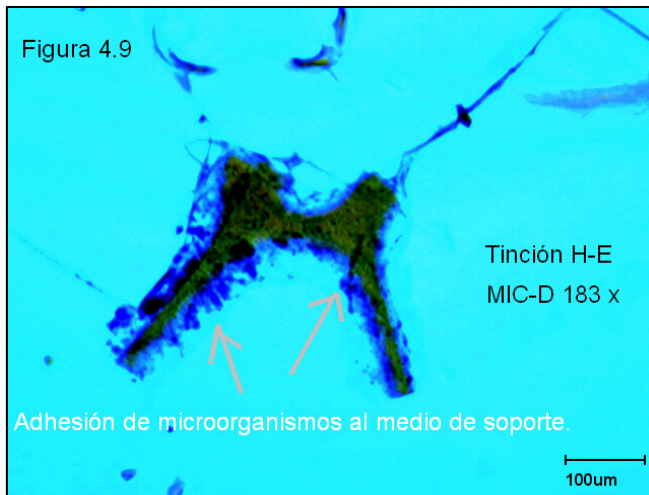


Figura 4.9 Tinción H-E. MIC-D 183X.

De la figura 4.9 se aprecia como se ha llenado toda la superficie de biopelícula, algunos puntos tienen más crecimiento que otros, por lo tanto se tienen distintas etapas simultáneamente, desde la fase de adhesión de células, fase de formación de la biopelícula y fase de extensión (Noguera *et al.*, 1995).

La colonización del medio de soporte se observa en la imagen 4.9, mientras se adhieren a todo el medio de soporte, los primeros microorganismos adheridos empiezan la segunda fase de formación de la biopelícula, éstas tienen un crecimiento constante (Capdeville, 1992).

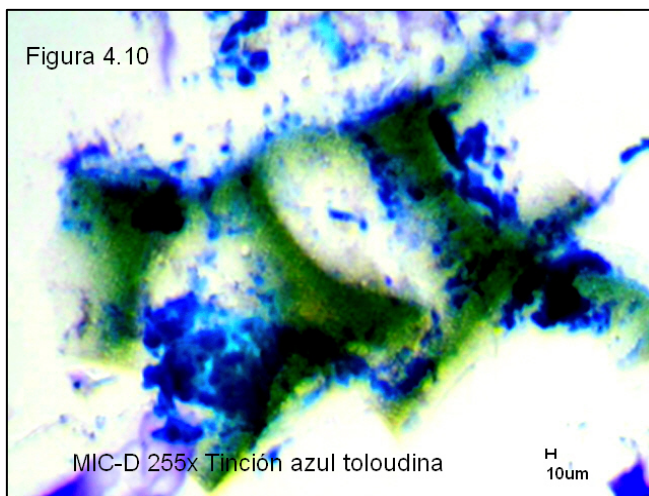


Figura 4.10 Tinción AT. MIC-D 255X

La adhesión al material de soporte es muy irregular, y algunas veces no todo el soporte está colonizado.

Esto principalmente porque hacia el interior del medio de soporte las condiciones son distintas, el flujo de nutrientes y oxígeno se dificulta o no asimilan aquellas agrupaciones de microorganismos que se han desarrollado previamente.

En la figura 4.10, lo verde es el medio de soporte, lo azul es la biopelícula. Es importante mencionar que hacia el interior del cubo, el espesor de la biopelícula disminuye.

4.3 Comparación de métodos de obtención de imágenes

Los métodos de obtención de las imágenes se realizaron con el microscopio digital MIC-D y con un microscopio óptico LEITZ, al cual se le montó una cámara digital en su ocular y con esto se obtuvieron imágenes digitales, algunas de las cuales se presentaron previamente.

Los mejores resultados se tienen con el microscopio óptico, el cual tiene una mejor iluminación. Un problema enfrentado fue la obtención de la escala de las imágenes obtenidas con este tipo de microscopio.

Por otro lado, las ventajas que se tienen con el MIC-D, son mucho más comparadas con los microscopios tradicionales; es decir, ver lo que se está analizando en una pantalla de computadora es mejor que tener la vista en los oculares, la escala se obtiene automáticamente, los análisis se pueden realizar de diversas maneras en cuanto a la escala, la forma de iluminación, la cantidad de imágenes que se pueden obtener tiene como límite la capacidad de almacenamiento del disco duro o dispositivo de almacenamiento que se esté utilizando para tal fin. Aunado a esto se tiene la facilidad de transporte de dicho microscopio, el cual sirve en campo al igual que en laboratorio.

El presente trabajo presenta los resultados obtenidos con ambos microscopios, ambos resultan muy útiles, cada uno tiene sus ventajas y desventajas pero se utilizará cada uno de acuerdo con lo que se quiera analizar; en esto se debe poner especial atención.

Los microorganismos se pueden observar con ambos aparatos, pero se tiene que realizar un pequeño análisis del material(en este caso agua del interior del reactor) para saber de antemano lo que se puede encontrar en cuanto microorganismos muertos o para dar una buena interpretación de la formación de la biopelícula o del desarrollo del proceso que se esté analizando.

4.4 Aplicaciones en sistemas para tratamientos de aguas residuales

La aplicación de medios de soporte para la formación de biomasa para el proceso de lodos activados combina las ventajas de los sistemas de biopelícula y los de biomasa suspendida. Dependiendo del material de soporte, es posible obtener de dos a cinco veces más concentración de biomasa de aireación comparado con el sistema convencional.

El incremento en la concentración de biopelícula podría reducir la dependencia del proceso de clarificación secundaria y como consecuencia reducir el volumen del reactor, incrementando la estabilidad y mejoramiento del sistema.

En algunos sistemas de tratamiento biológico, tales como los sistemas de lecho fluidizado, la tasa de remoción de sustrato por unidad de volumen puede ser maximizada reteniendo la mayor concentración posible de biomasa activa. El incremento de la concentración de la biomasa activa tiene varias funciones: a) promover el crecimiento y actividad de microorganismos en general, 2) fomentar el crecimiento de microorganismos capaces de formar flóculos densos o biopelículas, y c) minimizar la pérdida o salida de microorganismos del sistema. A continuación se explican los diversos sistemas, utilizados y comercializados.

4.4.1 Sistema con medio de soporte poroso

Estos sistemas utilizan gran cantidad de pequeños elementos de poliuretano como medio de soporte. El tamaño de poro puede variar de 300 a 2500 μm y la densidad es igual o cercana al valor del agua.

4.4.2 Proceso CAPTOR

Este proceso es comercializado por Simon-Hartley en el Reino Unido, y por Ashbrook-Simon-Hartley en Estados Unidos. En este sistema, una gran cantidad de cubitos entre 20,000 y 70,000 por metro cúbico, son introducidos en el tanque de aireación, las dimensiones de los elementos tienen 25x25x12 mm, los cuales ocupan cerca del 15 al 75% del volumen del tanque, esto significa que la concentración dentro del reactor se encuentra entre 7000 y 9000 mg/l de SSLM. El tamaño del poro es cerca de 850 μm . Debido a la necesidad de prescindir del sedimentador secundario, la biomasa es eliminada en un dispositivo externo, exprimiendo los cubitos e introduciéndolos nuevamente al tanque de aireación. El dispositivo de lavado de cubitos puede obtener una concentración de sólidos arriba de 4% (Tyagi y Vembu, 1990).

4.4.3 Proceso LINPOR

Este proceso es similar al proceso CAPTOR, sin embargo las mayores diferencias se tienen en la implementación del sedimentador secundario y en el tamaño del medio de soporte que es menor que el proceso CAPTOR (12x12x12 mm). El crecimiento de la biomasa se controla por el mezclado dentro del sistema por lo que no se utiliza un dispositivo externo para su control. El llenado del medio de soporte dentro del reactor ocupa entre 10 y 40%. La concentración de biomasa se encuentra entre 5000 y 8000 mgSST/l (Tyagi y Vembu, 1990). Ver figura 4.11.

Hay tres clases de sistemas LINPOR. La selección depende del tipo de tratamiento necesario. El sistema LINPOR C se usa para eliminar contaminantes orgánicos; el sistema LINPOR CN elimina contaminantes orgánicos y nitrógeno simultáneamente; el sistema LINPOR N elimina el amoníaco por medio del proceso de nitrificación.

Se han instalado sistemas LINPOR para tratamiento de aguas negras derivadas de las industrias químicas, papeleras, textiles y de hornos de coque.

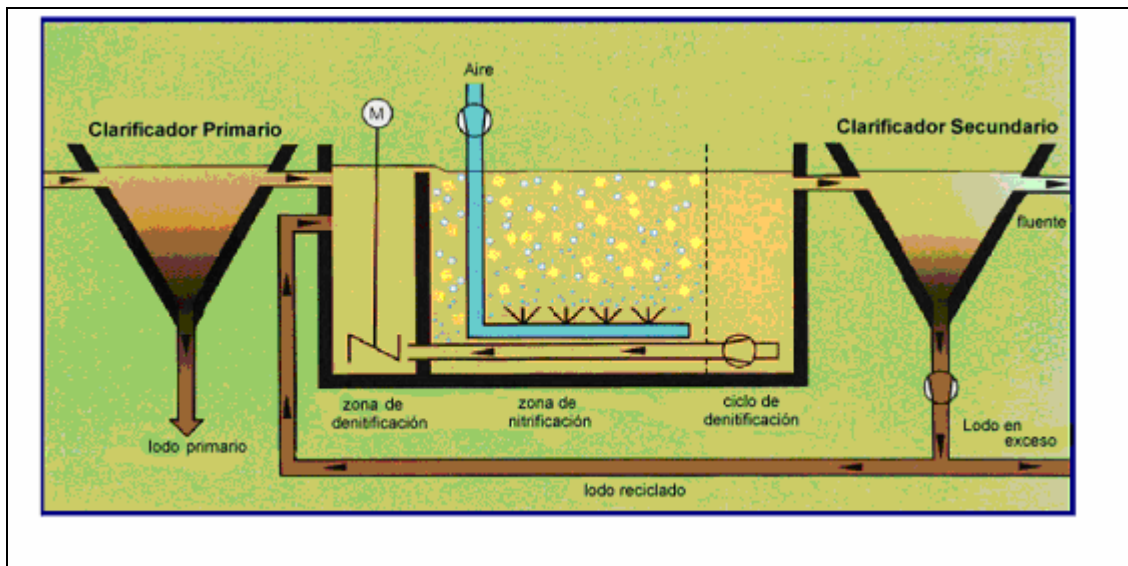


Figura 4.11 Esquemático del sistema LINPOR CN

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se llegan después de haber realizado diferentes análisis al medio de soporte, hule espuma de poliuretano, son las siguientes:

- Las formas de los microorganismos son muy variadas y complejas desde el punto de vista del ingeniero civil, pero no debe ser un obstáculo para conocerlos, ya que son la parte activa dentro de las aguas residuales; conocer sus características ayudan a comprender lo que sucede dentro de la planta de tratamiento de las aguas residuales y los procesos asociados a las mismas.
- La biopelícula no sigue una forma única de crecimiento, las aglomeraciones de microorganismos tienden a respetar espacios de crecimientos vecinos. Con esto, el medio de soporte presenta espacios sin colonizar, por donde cierta cantidad de nutrientes y oxígeno circula, siendo entonces el tamaño de poro un factor limitante en el crecimiento de la biopelícula.
- Muchas de estas agrupaciones no son exclusivas de procesos de tratamiento de las aguas residuales, en muchos otros casos representan fuertes pérdidas económicas asociadas a su formación. En sectores como el agua potable, estas agrupaciones son nocivas a la salud ya que causan múltiples enfermedades gastrointestinales y las consecuencias que de estas se derivan.
- La característica más importante de estas aglomeraciones, cuando realizan un trabajo conjunto, es la formación de estratos en donde las condiciones son distintas; las primeras etapas del desarrollo de las mismas es decisiva para el buen funcionamiento como comunidad.

- No hay que perder de vista que las distintas etapas de la formación de las biopelículas están afectadas por diversos factores, el principal según lo observado es el flujo de los nutrientes, esto con base en que en capas internas del medio de soporte existen múltiples espacios sin colonizar o que el desarrollo de la biopelícula es muy baja en comparación con estratos o capas superiores.
- Se puede aplicar este tipo de proceso (introducir un medio de soporte) en distintas plantas de tratamiento de aguas residuales, logrando con esto aumentar la eficiencia de remoción de contaminantes.
- Existen un límite de crecimiento de la biopelícula, relacionado con la carga orgánica presente en el reactor. Cuando ésta alcanza valores elevados ya no existe crecimiento, puesto que el número de microorganismos presentes ha alcanzado un equilibrio en el interior del reactor.
- La remoción de fósforo y nitrógeno se da cuando comienza la reproducción celular al interior, y su disminución está asociada con las relaciones simbióticas.
- La tinción de Gram y la hematoxilina-eosina son las que presentan mejores resultados; la tinción de safranina azul de metileno tiene su grado de aplicación, pero en general las dos primeras citadas son más útiles.

Characklis, W. G. Biofilms processes in biofilms, Characklis, W. G. and Marshall, K. C. eds., Wiley and Sons, pp. 195-231. New Cork 1990.

Characklis, W. G and Marshall, K. C. Biofilms: A basic for an interdisciplinary approach in biofilms. pp 3-15. New York 1990.

Castrejón Taboada Pedro (2005). Tesis maestría: Comparación de dos medios de soporte de biopelícula (liso y poroso) para nitrificación y desnitrificación de lixiviados de un relleno sanitario. pp 8-17. México 2005.

Garrido JM, Méndez R, Lema JM. Nitrificación de aguas residuales: Procesos de biomasa en suspensión y procesos de biopelículas.

González M. Simon, Garzón Z. Marco A. Eliminación de fósforo y nitrógeno en n reactor discontinuo con biopelícula. Series del Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México pp. 33-38, México 1995.

González M. Simon., Nava R. Claudia. Determinaciones cinéticas en películas biológicas. Series del Instituto de Ingeniería, cuaderno No. 568 serie azul, Universidad Nacional Autónoma de México pp. 20-55. México.

Grady, C.P, Lin J.H. Biological water treatment theory and applications. New York. Marcel Decker Edit; 1997

Hans, G. Schlegel, *Microbiología General*. Segunda edición, pp 65-98. Barcelona 1988.

ylñigo Lasa Uzcudun, Biofilms bacterianos, Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales y Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra. España 2000.

Iwai, S, y Kitao, T. (1994). Wastewater Treatment with Microbial Films. Technomic Publishing Compañy, Inc. Lancaster. PA. Pp. 1-62.

N. Anadón, A.M. Coto, J.M. Fraga, A. González, J.L.Martínes, A.M.Nistal, D.Tolivia/ Ed. Juan Luis Martínez. Técnicas de imagen en biología. Universidad de Oviedo, España 2002.

Aguilar Morales Marcela; Coutiño Bello Beatriz, Patricia Salinas Rosales; ed. Emilio Martínez-Parente Z. Manual general de técnicas histológicas y citoquímicas. UNAM, Facultad de Ciencias, México 1996.

Marcel Locquin, Maurice Langeron ; tr. Mercedes Durfort Coll : Manual de microscopia. Barcelona, España 1985.

Metcalf and Eddy (1991). Wastewater Engineering Treatment, Disposal and Reuse. Mc Graw Hill International Editions. New York.

Ramalho. R. S. (1991). Tratamiento de Aguas Residuales. Editorial Reverte.

Rogalla,F. and Harremoes, P. Biofilms Reactors. Water Science & Technology. 994 Vol 29. Number 10-11.

Vargas, T. G. Tesis : Estabilización de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales por digestión anaerobia mesofílica y termofílica. Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 20-31. México 2005

- Z. Lewandowski, P. Stoodley, S. Altobello and E. Fukushima: *Hidrodynamics and kinetics in biofilm systems-Recent advances and new problems*. Water Sci. Tech. Vol. 29, No. 10-11, pp 223-229, 1994.

AGRADECIMIENTOS

Se agradecede a la Dra. Marcela E. Aguilar Morales* por su valiosa cooperación en el desarrollo de estas técnicas.

* Laboratorio de la Reproducción Animal
Edificio B Segundo Piso
Facultad de Ciencias, UNAM