

ESTUDIO DE LA REDUCCIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS EN AGUA RESIDUAL SALINA MEDIANTE
MICROORGANISMOS HALOTOLERANTES

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

*Maestro en Ciencia y Tecnología
en la Especialidad de Ingeniería Ambiental*

PRESENTA

I.Q.I. Karla Kirenia Valdez Gastélum

RESUMEN

Actualmente las industrias que generan agua residual salina se enfrentan a una problemática ambiental, esto debido a que estas aguas son difíciles de tratar por un método biológico convencional, ya que muchas bacterias no se adaptan a las cantidades de sales que este tipo de efluentes contiene. El presente proyecto se realizó con la finalidad de encontrar una alternativa para reducir compuestos orgánicos contaminantes en aguas con estas características, al proponer un tratamiento con bacterias halófilas, mismas que son capaces de sobrevivir a ambientes con cantidades considerables de sal. Se logró obtener un consorcio de bacterias halotolerantes aerobias, cultivadas a partir de agua de mar proveniente de la playa Miramar, Tampico Tamaulipas. Probándose su capacidad degradadora de compuestos orgánicos, medido como COT, obteniéndose reducciones hasta de 85.49% de Carbono Orgánico en aguas con un contenido inicial de 267.5 ppm, en un TRH de 96 horas, y se alcanzó un aumento de Sólidos Totales Volátiles del 40.84 % en un tiempo de 432 horas. Además se utilizó Fenol como contaminante orgánico, realizándose pruebas con tres concentraciones iniciales, siendo estas de 21.17, 51.33 y 82.77 ppm, alcanzándose remociones de hasta un 91.22 % en un tiempo de 45 horas, la concentración de Fenol en el tiempo fue medida mediante espectroscopia ultravioleta visible. También se midieron los STV durante el proceso, obteniendo un máximo crecimiento del 34.61% en un tiempo de 22 horas para la concentración de 21.17 ppm. Las tres reacciones correspondientes resultaron ser de orden cero, lo que indica que la velocidad de reacción es independiente de la concentración, y sus constantes cinéticas fueron de 0.8026, 1.7201 y 1.6055 ppm*h⁻¹ respectivamente.

Debido a que se ha comprobado con anterioridad que el uso de corrientes eléctricas puede acelerar el metabolismo de los microorganismos, se realizó un estudio basado en un diseño de experimentos tipo Taguchi L9, se utilizaron como variables: la cantidad de NaCl (g/L) agregada, la cantidad de corriente a aplicar (mA), el tiempo de exposición (hr) y la cantidad de carbono adicionada, para lo cual se utilizó dextrosa (ppm), y como factor de respuesta se midió el aumento de SSV (%). Se obtuvo un mayor aumento de SSV del 72 %, aplicando una corriente de 4 mA en un periodo de 8 horas y adicionando una concentración de carbono de 1000 ppm a un medio que contenía 30 g/L de NaCl.

ABSTRACT

Actually the industries that generate saline waste water face an environmental problems, this because these waters are difficult to treat for a conventional biological method, since many kind of bacteria cannot be adapted to the quantities of salt that this type of effluent contains. This project was realized in order to find an alternative to reduce pollutant organic compounds in water with these characteristics, proposing a treatment with Halophilic bacteria, which are able to survive environments with large amounts of salt. It was possible to obtain a consortium of aerobic halotolerant bacteria cultured from seawater from Miramar beach, Tampico, Tamaulipas. The degradation activity of organic compounds was proved, measured as TOC, the rate reductions as Organic Carbon 85.49 % in water with initial content of 267.5 ppm, and an increase of Total Volatile Solids 40.84 % at the time reached 432 hours. Also phenol was used as an organic model pollutants, tests performed with three initial concentrations, being 21.17, 51.33 and 82.77 ppm, reaching up removals of 91.22% in a time of 45 hours. The concentration of phenol at the time was measure by spectroscopy ultraviolet visible. The STV was also measured during the process, obtaining a maximum grown of 34.61% in a time of 22 hours for the corresponding reactions were found to be zero order, and kinetic constants were 0.8026, 1.7201 and 1.6055 ppm * h⁻¹ respectively.

Because it has been shown previously that the use of electric currents can accelerate the metabolism of microorganisms, was done a study based on a design of experiments type Taguchi L9, were used as variables: the amount of NaCl (g/L) added, the amount of current to be applied (mA), the exhibition time (hr) and the amount of carbon added, for which dextrose was used (ppm) were used as variables, and as answer factor was measured the increase of SSV (%). Was obtained a major increase of SSV of 72%, applying a current of 4 mA in a period of 8 hours, and adding a carbon concentration of 1000 ppm to a medium that was containing 30 g/L of NaCl.

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1	Justificación	3
1.2	Hipótesis	3
1.3	Objetivos	4
1.3.1	Objetivo general.	4
1.3.2	Objetivos específicos.	4

CAPITULO II. ANTECEDENTES

2.1	Métodos utilizados para el tratamiento de agua residual salina.	5
2.1.1	Proceso bioquímico combinado con uno físico-químico.	5
2.1.2	Biodiscos.	5
2.1.3	Bioreactores de membrana.	6
2.1.4	Tratamiento biológico con microorganismos halotolerantes en un reactor Batch.	6
2.2	Uso de corrientes eléctricas en procesos biológicos.	6
2.2.1	Aumento de biomasa.	7
2.2.2	Degradación de contaminantes.	8

CAPITULO III. FUNDAMENTACIÓN

3.1	Agua residual salina y su problemática ambiental.	10
3.2	Industrias que generan efluentes de agua residual salina.	11
3.2.1	Industria de encurtidos.	11
3.2.2	Proceso de conserva de productos marinos.	12
3.2.3	Industria de curtido de pieles.	13
3.2.4	Producción de plaguicidas.	15
3.2.5	Proceso de recuperación de gasolina y aceites.	16
3.2.6	Productos farmacéuticos.	16
3.3	Bacterias halófilas.	17
3.3.1	Clasificación de bacterias halófilas según su capacidad de tolerancia de sales.	19
3.3.1.1	Halófilos extremos.	20
3.3.1.2	Halófilos moderados.	21
3.3.1.3	Halófilos débiles	22
3.3.1.4	Halotolerantes	23
3.3.2	Adaptación de las bacterias halófilas.	24
3.3.2.1	Mecanismos de acumulación de las bacterias halófilas.	26
3.3.3	Aplicaciones de las bacterias halófilas.	27
3.3.3.1	Solutos compatibles.	27
3.3.3.2	Biodegradación de residuos en aguas residuales.	28
3.3.3.3	Enzimas y otras moléculas de interés biotecnológico.	31
3.3.3.4	Biopolímeros.	32

3.3.3.5	Biocombustibles.	33
3.4	Diseño de experimentos mediante el método Taguchi.	33
3.4.1	Enfoque Taguchi.	35
3.4.2	Métodos recomendados por Taguchi.	35

CAPITULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1	Obtención de halobacterias a partir de agua de mar.	36
4.2	Siembra de microorganismos existentes en el licor mezclado.	38
4.2.1	Preparación del medio de cultivo.	38
4.2.2	Tinción gram de los microorganismos encontrados en el licor mezclado	38
4.2.3	Pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias.	39
4.3	Técnicas Analíticas.	40
4.3.1	Conductividad, Salinidad y Sólidos Totales Disueltos en el licor mezclado.	40
4.3.2	Sólidos Totales Volátiles.	40
4.3.3	Sólidos Suspendidos Volátiles.	41
4.3.4	Sólidos Sedimentables.	42
4.3.5	Índice Volumétrico de Lodos.	42
4.3.6	Relación alimento microorganismo F/M	42
4.3.7	Tiempo de Retención Celular (TRC) o edad de lodos	42
4.3.8	Demanda Química de Oxígeno (DQO)	43
4.3.9	Carbono Orgánico Total (COT).	43
4.4	Pruebas con agua residual salina.	43
4.5	Pruebas utilizando Fenol como un contaminante orgánico.	44
4.5.1	Curva de calibración de Fenol.	45
4.5.2	Monitoreo de la concentración de Fenol.	46
4.6	Pruebas con estimulación electroquímica.	46
4.6.1	Diseño de experimentos.	47
4.6.1.1	Gráficos lineales.	49
4.6.1.2	Análisis de varianza.	49

CAPITULO V. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1	Obtención de microorganismos a partir de agua de mar.	52
5.2	Cálculo de parámetros para las condiciones óptimas del sistema	54
5.3	Observación al microscopio de los microorganismos obtenidos.	56
5.4	Siembra de microorganismos existentes en el licor mezclado.	57
5.4.1	Pruebas bioquímicas de los microorganismos en el licor mezclado.	59
5.5	Pruebas utilizando agua residual como fuente de carbono.	62
5.6	Degradación de fenol en agua residual salina.	68
5.7	Efecto de la aplicación de corriente directa sobre un proceso microbiano con agua salina.	75
5.7.1	Análisis del diseño de experimentos.	76

CONCLUSIONES	82
PERSPECTIVAS	84
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXOS	93
Anexo 1. Preparación de medios de cultivo	93
Anexo 2. Pruebas bioquímicas	96
Anexo 3. Resultados de la biodegradación de Fenol	101

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

Figura 2. 1. Estimulación eléctrica de microorganismos. (Thrash y Coates. 2008).....	7
--	---

CAPÍTULO III. FUNDAMENTACIÓN

Figura 3. 1. Descarga de agua residual al mar.....	10
Figura 3. 2. Generación de aguas residuales salinas en empresa de curtiduría.	10
Figura 3. 3. Salinas Torrevieja, España.	18
Figura 3. 4. Dunaliella Salina. Micro alga halófila.	18
Figura 3. 5. Árbol filogenético de los seres vivos.	19
Figura 3. 6. Micrografía de Halorhabdus Utahensis Strain AX-2 ^T	21
Figura 3. 7. Fotografías de halófilos moderados.	22
Figura 3. 8. Micrografías de halófilos débiles.....	23
Figura 3. 9. Micrografías de bacterias halotolerantes.....	24
Figura 3. 10. Degradación aeróbica del Fenol.....	30

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 4. 1. Pruebas de degradación de fenol.....	44
Figura 4. 2. Curva de calibración de Fenol.....	45
Figura 4. 3. Procedimiento para la medición de concentración de fenol.....	46
Figura 4. 4. Esquema del reactor para la estimulación electroquímica.	47
Figura 4. 5. Reactor de placas paralelas.	47

CAPÍTULO V. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Figura 5. 1. Grafica de STV con respecto al tiempo.	52
Figura 5. 2. Crisoles para medición de Sólidos Totales Volátiles.....	52
Figura 5. 3. Monitoreo de STD, Salinidad y Conductividad, en el licor mezclado.	53
Figura 5. 4. Observación en microscopio	56
Figura 5. 5. Microorganismos en el licor mezclado observados en microscopio. 20 X.....	56
Figura 5. 6. Microorganismos Euplotes Moebiusi.	57
Figura 5. 7. Agar Standard.	58
Figura 5. 8. Cultivo en placas petri.....	58
Figura 5. 9. Tinción gram de microorganismos en el licor mezclado.	58
Figura 5. 10. Muestra de microorganismos en el licor mezclado.....	59
Figura 5. 11. Pre-enriquecimiento de microorganismos en agua peptonada.....	59
Figura 5. 12. Caja de Agar Sal y Manitol antes de la incubación.	59
Figura 5. 13. Caja de Agar Sal y Manitol después de la incubación.....	59
Figura 5. 14. Cultivo en placas de microorganismos. a) Agar Mc Conkey con 10 ppm de NaCl. b) Agar Mc Conkey sin NaCl.....	60
Figura 5. 15. Pruebas bioquímicas colonia 1A.....	61
Figura 5. 16. Pruebas bioquímicas colonia 2A.....	61
Figura 5. 17. Pruebas bioquímicas colonia 3A.....	62
Figura 5. 18. Efecto del COT y STV conforme al tiempo para una $S_0/X_0 = 0.023$ mg/mg	63
Figura 5. 19. Efecto del COT y STV conforme al tiempo para una $S_0/X_0 = 0.078$ mg/mg	63
Figura 5. 20. Aumento de STV a diferentes relaciones S_0/X_0	64

Figura 5. 21. Reducción de COT a diferentes relaciones S_0/X_0	65
Figura 5. 22. Resultados de pH, STD, Salinidad y Conductividad conforme al tiempo, para la relación $S_0/X_0 = 0.023$ mg/mg.....	66
Figura 5. 23. Resultados de pH, STD, Salinidad y Conductividad conforme al tiempo, para la relación $S_0/X_0 = 0.078$ mg/mg.....	67
Figura 5. 24. Espectro UV-Visible para una concentración de 21.17 ppm de Fenol.	68
Figura 5. 25. Espectro UV-Visible para una concentración de 51.33 ppm de Fenol.	69
Figura 5. 26. Espectro UV-Visible para una concentración de 82.76 ppm de Fenol.	69
Figura 5. 27. Biodegradación de fenol a diferentes concentraciones.	70
Figura 5. 28. Grafica de Tiempo vs Concentración de Fenol y STV para una concentración inicial de 21.17 ppm.	71
Figura 5. 29. Grafica de Tiempo vs Concentración de Fenol y STV para una concentración inicial de 51.33 ppm.	72
Figura 5. 30. Grafica de Tiempo vs Concentración de Fenol y STV para una concentración inicial de 82.76 ppm.	72
Figura 5. 31. Orden de reacción, para una concentración inicial de 21.17 ppm de Fenol.....	73
Figura 5. 32. Orden de reacción, para una concentración inicial de 51.33 ppm.	74
Figura 5. 33. Orden de reacción, concentración inicial de 82.76 ppm Fenol.	74
Figura 5. 34. Gráfica de efectos principales para relaciones señal-ruido.	76
Figura 5. 35. Gráfica de superficie tiempo vs corriente, aumento de sólidos.	77
Figura 5. 36. Gráfica de superficie tiempo vs concentración de carbono, aumento de sólidos.	77
Figura 5. 37. Gráfica de superficie concentración de sales vs corriente, aumento de sólidos...	78

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

Tabla 2. 1. Aplicaciones de reactores bioelectroquímicos.	9
--	---

CAPÍTULO III. FUNDAMENTACIÓN

Tabla 3. 1. Composición de las aguas residuales salinas generadas en el tratamiento de algunos productos..	12
Tabla 3. 2. Características del agua residual generada en diversas etapas del proceso de enlatado de atún..	13
Tabla 3. 3. Composición del agua generada en algunos procesos durante el curtido de pieles de ganado porcino..	14
Tabla 3. 4. Características de las aguas residuales provenientes de la fabricación de algunos plaguicidas.	15
Tabla 3. 5. Características comunes en aguas residuales de la industria petrolera.....	16
Tabla 3. 6. Características de diferentes procesos en la producción de medicamentos.	17
Tabla 3. 7. Clasificación de halófilos en función de la salinidad.	20
Tabla 3. 8. Microorganismos halófilos aislados en diferentes partes del mundo.	25
Tabla 3. 9. Ejemplos de descontaminación de agua residual por microorganismos halófilos. .	30
Tabla 3.10. Enzimas y otras moléculas de microorganismos halófilos y sus aplicaciones biotecnológicas..	32

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4. 1. SOLUCIÓN A. MACRONUTRIENTES. Agregar 1 ml por L de sustrato.	37
Tabla 4. 2. SOLUCIÓN B. MICRONUTRIENTES. Agregar 1 ml por L de sustrato.	37
Tabla 4. 3. Variables a utilizar en el diseño de experimentos.	47

CAPÍTULO V. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 5. 1. Resultados de las pruebas bioquímicas colonias 1A, 2A, y 3A.	60
Tabla 5. 2. Resultados de las pruebas utilizando agua residual como única fuente de carbono, para diferentes relaciones sustrato/microorganismos.	66
Tabla 5. 3. Resultados de las pruebas de biodegradación de Fenol.....	70
Tabla 5. 4. Resultados de orden de reacción, R^2 , y k, a diferentes concentraciones de Fenol. .	75
Tabla 5. 5. Resultados experimentales del aumento de biomasa aplicando corriente.....	75
Tabla 5. 6. Coeficiente de correlación para el diseño Taguchi L9.	79
Tabla 5. 7. Resultados de la relación señal-ruido.	79
Tabla 5. 8. Análisis de varianza.....	81

ABREVIATURAS

BER	Reactor bioelectroquímico
BPR	Punto de ebullición
CI	Carbono inorgánico
COT	Carbono orgánico total
CT	Carbono total
Cl ⁻	Cloro
DBO ₅	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
F/M	Relación alimento/microorganismo
g	Gramos
hr	Hora
K ⁺	Potasio
KCl	Cloruro de Potasio
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramos
Na ⁺	Ion sodio
NaCl	Cloruro de sodio
O ₂	Oxígeno
PCR	Polimerasa
PHA	Poly-β-hydroxyalkanoato
Ppm	Partes por millón
Ppt	Partes por mil
p/v	Relación peso/volumen
RBC	Reactor de biodiscos
SBR	Reactor discontinuo secuencial

SSed	Sólidos sedimentables
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
S_0/X_0	Relación sustrato inicial/concentración STV inicial
TRC	Tiempo de retención celular
TRH	Tiempo de retención hidráulico
V	Volumen

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más frecuentes en el mundo es la contaminación del agua, la principal causa de esta es la descarga directa de desechos domésticos e industriales a cuerpos receptores de agua, como lo son: ríos, lagos e incluso mares. Algunos de estos contaminantes pueden ser reducidos o eliminados mediante plantas de tratamiento convencionales, sin embargo algunas industrias generan aguas residuales con altas concentraciones de sal, en ocasiones alcanzando hasta 150 g/L de NaCl (Bódalo et al. 2006), mismas que pueden afectar el diseño de plantas depuradoras por lo que no pueden ser tratadas mediante estas. Dentro de las industrias que generan aguas residuales salinas se encuentran las dedicadas a la fabricación y manufactura de conservas de productos marinos y vegetales, el proceso de producción de pesticidas/herbicidas, peróxidos orgánicos, algunos productos farmacéuticos, así como también en el proceso de recuperación de gasolina y aceites. (Castillo et al. 1995).

Algunos métodos utilizados para reducir la materia orgánica presente en aguas residuales con alta concentración de sales consisten en emplear filtros percoladores, biodiscos, lodos activados y otros procesos aerobios, en los cuales se han obtenido resultados que van desde el 75-95 % de remoción de DQO. En estudios recientes se han utilizado bioreactores de membranas secuenciales en operación intermitente en los que se logró remover hasta 20 g/L de sólidos suspendidos en el licor mezclado, aplicando presiones sobre la biomembrana de hasta 60 kPa.(Rovirosa et al. 2003). Sin embargo estos procesos requieren de energía para la aireación y sus costos de construcción y operación son elevados, por lo que su implementación resulta inaccesible en algunos países donde se carece de recursos.

Una interesante posibilidad para el tratamiento de aguas residuales salinas es emplear un tratamiento biológico con ayuda de microorganismos halófilos, mismos que al pertenecer al grupo de los extremófilos son capaces de sobrevivir en ambientes con alta concentración de sal. Esto constituye una ventaja frente a los tratamientos biológicos convencionales, ya que en estos no se logra disminuir la contaminación orgánica, debido a que los microorganismos existentes no soportan las condiciones salinas elevadas, teniendo como consecuencia plasmólisis y baja actividad en la célula. (Bindiya y Mathew, 2010).

Este tipo de microorganismos son fáciles de cultivar y sus requerimientos nutricionales son escasos. Son útiles en la producción de enzimas, polímeros, solutos compatibles y en la biodegradación de residuos, así como en la producción de alimentos fermentados.

Debido a que las bacterias halófilas son capaces de sobrevivir en ambientes con alto contenido en sales, este proyecto tiene la finalidad de tratar agua residual salina, mediante un tratamiento biológico con halobacterias para reducir compuestos orgánicos, utilizándolos como única fuente de carbono.

Es de interés probar la capacidad de estas bacterias para degradar contaminantes orgánicos, como lo es el Fenol, debido a que esta sustancia se encuentra presente en aguas residuales salinas generadas por algunas industrias, como lo son: la petroquímica, las industrias encargadas de la producción de fertilizantes y manufactura química, además de ser altamente tóxico para el medio ambiente, ya que prevalece en el por mucho tiempo al ser difícil su biodegradación.

1.1 Justificación

Algunas industrias además de generar aguas residuales con contaminantes orgánicos persistentes agregan a estas, cantidades considerables de sales, en ocasiones mayores al 3.5% (Woolard e Irvine, 1994), las cuales hacen más complicado el proceso de tratamiento de dichas aguas, debido a que no pueden ser procesadas por un tratamiento biológico convencional. Las altas concentraciones de sal pueden causar estrés osmótico en los microorganismos o disminuir las reacciones de degradación orgánica.

Una alternativa interesante para llegar a reducir la concentración de contaminantes en este tipo de aguas, es el uso de bacterias halotolerantes, mismas que al ser capaces de sobrevivir en ambientes salinos pueden degradar la materia orgánica presente como lo son: benzoatos, fenoles y compuestos aromáticos, además estos microorganismos requieren de la sal para su crecimiento, ya que sus paredes celulares, ribosomas y enzimas se estabilizan con el ion Na^+ , lo que podría llegar a reducir la salinidad del medio. Se ha demostrado con anterioridad que los microorganismos halófilos cultivados a partir de suelos salinos y aguas provenientes de lagos salados, pueden degradar contaminantes orgánicos persistentes.

Se pretende obtener este tipo de bacterias a partir de agua de mar y utilizarlas para degradar la materia orgánica presente en aguas residuales salinas.

1.2 Hipótesis

Es posible reducir la concentración de contaminantes orgánicos presentes en un agua residual salina, mediante el uso de bacterias halotolerantes.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Reducir la concentración de compuestos orgánicos presentes en aguas residuales con alto contenido en sales, aplicando un tratamiento biológico con bacterias halotolerantes.

1.3.2 Objetivos específicos

- Obtener microorganismos halotolerantes a partir de agua de mar.
- Estudiar el efecto del Carbono Orgánico Total presente en un agua residual con alta concentración de sales, aplicando un método biológico.
- Estudiar el efecto del Fenol (contaminante orgánico) en diferentes concentraciones, en un agua residual salina, utilizando microorganismos halotolerantes.
- Monitorear la conductividad/salinidad en los procesos propuestos con la finalidad de observar el efecto de los microorganismos sobre la sal.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1. Métodos utilizados para el tratamiento de agua residual salina.

A pesar de que las aguas residuales con alto contenido en sales son difíciles de tratar por un tratamiento de depuración convencional se han reportado diferentes sistemas de tratamiento en los cuales se han obtenido buenos resultados de degradación de materia orgánica, sin embargo algunos de estos procesos implican el consumo de grandes cantidades de energía, por lo que no son económicamente posibles para muchas industrias que generan este tipo de aguas. A continuación se describen algunos de estos procesos.

2.1.1. Proceso bioquímico combinado con uno físico-químico.

Rovirosa y col. (2003) proponen la utilización de un sistema de tratamiento combinando un proceso basado en filtros anaerobios con procesos físico-químicos de coagulación-floculación y filtración con zeolitas naturales, para tratar aguas residuales medianamente salinas, con lo que logran tratar eficientemente aguas que contienen concentraciones de DQO y cloruros menores de 2000 mg/L y 9 g/L, respectivamente, pudiendo alcanzar remociones de DQO, N-Total, P-Total y coliformes fecales de 75-95, 40-60, 55 y >99 %, respectivamente.

2.1.2. Biodiscos

Se han realizado estudios en los que se emplea un reactor de biodiscos (RBC) de 4 etapas, operándose a una carga hidráulica de 0.078 m³/m² de 11.66 g DQO/m², bajo distintos ciclos de agua salina + agua dulce. Para depurar aguas residuales con salinidad variable, en los cuales se logró eliminar en un 90% la carga orgánica del afluente medido como DQO, en un tiempo de entre 6 y 18 horas. (Castillo et al. 1995).

2.1.3. Bioreactores de membrana

Estudios realizados sobre un biorreactor de membrana tratan aguas residuales con contenidos de material contaminante medido como DQO de 5000 mg/L y 32 g/L de NaCl, demuestran que se logra remover hasta 20 g/L de sólidos suspendidos en el licor mezclado, pero aplican presiones de hasta 60 kPa sobre la membrana. (Dan et al. 2002). Al emplearse una presión alta para llevar a cabo este proceso, resulta inviable para muchos países donde el costo de energía es elevado.

2.1.4. Tratamiento biológico con microorganismos halotolerantes en un reactor Batch.

Estudios recientes en los que utilizan un cultivo puro de *Staphylococcus Xylosus* MTCC No. 7441 aislado a partir de pulpa de mango, como inóculo en un reactor Batch, para tratar agua residual salina con diferentes concentraciones de Cloruro de Sodio, en el cual logran reducir hasta en un 92.59 % la demanda química de oxígeno con un contenido de 5 g/L de NaCl, en un tiempo de 24 horas, un 90.91% de reducción de DQO con 10 g/L de NaCl en un TRH de 28 horas, y un 86.36 % de reducción de DQO con un contenido de 15 g/L de NaCl en un TRH de 28 horas. (Bindiya y Mathew, 2010). En este estudio también se monitoreo la salinidad durante todo el proceso, sin embargo no se observaron cambios significativos de la misma.

2.2. Uso de corrientes eléctricas en procesos biológicos.

Se han realizado algunos estudios en los aplican corrientes eléctricas de baja intensidad (menor a 20 mA/cm²) en microorganismos, con diversas finalidades, por ejemplo: disminuir microorganismos indeseables en la preparación de alimentos, sin perder sus propiedades organolépticas, en el control de olores y estado higiénico de los lodos de aguas residuales, estimulación en el crecimiento, reproducción y metabolismo de los microorganismos, esto como consecuencia de cambios de polaridad en las membranas o bien generando estímulos en la actividad enzimática. Dependiendo del tipo de bacteria, intensidad de corriente, tiempo de exposición y condiciones del medio, los microorganismos pueden llegar a manifestar efectos desde letales hasta alteraciones metabólicas menores. (Velasco et al. 2011).

La Figura 2.1 muestra un esquema de la estimulación electroquímica de microorganismos mediante un bioelectroreactor (BER). El BER puede estimular el metabolismo microbiano, actuando como fuentes de electrones las reacciones catódicas y como sumideros de electrones las anódicas. En cada caso, la reducción y oxidación respectivamente, de un sustrato está acoplado al estímulo eléctrico por el microorganismo. (Thrash y Coates. 2008).

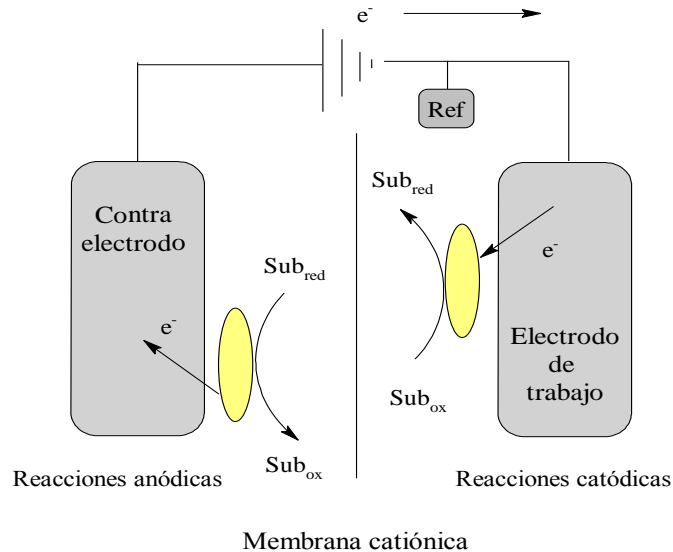


Figura 2. 1. Estimulación eléctrica de microorganismos. (Thrash y Coates. 2008).

2.2.1. Aumento de biomasa.

Se comparó el efecto de la aplicación de diferentes intensidades de corriente sobre *E. Coli* y *Bacillus Cereus*, obteniéndose que al aplicar corrientes entre 5 y 10 mA en *E. Coli* no se obtienen variaciones significativas, mientras que al aplicar corrientes de 20 y 40 mA con ayuda de electrodos de grafito durante 72 horas, se notó una inhibición considerable, así como una disminución del contenido de ATP y otras actividades enzimáticas. Con respecto a *Bacillus Cereus*, se obtuvo que a corrientes bajas no se afectó el crecimiento ni actividades metabólicas, al contrario de utilizar una corriente de 40 mA, durante 72 horas y empleando electrodos de grafito, se estimuló el crecimiento, el contenido de ATP y algunas actividades enzimáticas. (Valle et al. 2007).

Sasaki y colaboradores (2011), utilizaron un reactor bioelectroquímico para degradar material celulósico aplicando densidades de corriente de -0.6 y -0.8 V, sobre *Methanothermobacter*, favoreciendo además el crecimiento microbiano en un 21.3 y 11.5% de aumento de SS a comparación de la muestra control en la cual no se aplicó corriente.

2.2.2. Degradación de contaminantes.

Para lograr la degradación de algunos contaminantes es necesario llevar a cabo reacciones de oxidación y reducción; como sucede en el tratamiento de aguas residuales donde es necesario realizar procesos de nitrificación y desnitrificación con la intención de eliminar nitrógeno en forma de gas. En el proceso de reducción es necesario un donador de electrones, éstos son suministrados electroquímicamente, evitando la adición de un donador de electrones. (Cárdenas et al. 2011).

Los reactores bioelectroquímicos han sido utilizados para el cultivo de microorganismos, que influyen en la producción de metabolitos, y en la biotransformación de una amplia gama de compuestos. Se han cultivado tanto consorcios como cepas puras con aplicación de corriente, siendo estos sistemas cada vez más utilizados, además el uso de un BER ofrece una amplia gama de soluciones para la estimulación del metabolismo microbiano y en el tratamiento de aguas residuales. (Thrash y Coates. 2008).

El principal objetivo operacional de un BER es la transferencia de electrones entre un microorganismo y un electrodo de trabajo, la cual puede ocurrir ya sea directamente en la superficie del electrodo o indirectamente mediada por un agente de transferencia de electrones soluble o por la electrólisis del agua. (Thrash y Coates. 2008).

En la Tabla 2.1 se muestra un resumen de algunos estudios realizados para diferentes tratamientos.

Tabla 2. 1. Aplicaciones de reactores bioelectroquímicos.

Aplicación	Microorganismo	Electrodos	Corriente	Voltaje	Referencia
Degradación de Hexadecano en suelo	<i>Aspergillus Niger</i>	Titanio recubiertos de óxido de rutenio	0.42 mA/cm ²	-----	Velasco et al.2011
Remoción de Nitrato en agua	<i>Ochrobactrum anthropi</i> SY509	Ánodo: Platino Cátodo: Tela de grafito	-----	-0.6 V	Hee et al. 2007
Reducción de Tetracloroetano	<i>Geobacter Lovleyi</i>	Ánodo y cátodo: Grafito	-----	500 mV y -300 mV	Strycharz et al. 2008
Remoción de Colorante Azo Rojo Reactivo 272	Consortio bacteriano obtenido de rumen de vaca	Ánodo y cátodo: Placa de acero inoxidable 304 L	1 mA	-----	Cárdenas et al. 2011
Reducción de DQO y fermentación de metano	Consortio bacteriano obtenido de digestor termofilico anaerobio	Ánodo y cátodo: Carbón	-----	-0.3, -0.6 y -0.8 V	Sasaki et al. 2010
Reducción de Fe (III)	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 (ARCC 700550)	Ánodo y cátodo: Placas de grafito G10	-----	0 a 500 mV	Jeong y Ellington 2007
Reducción de contaminantes orgánicos en agua residual municipal	Lodos activados	Ánodo: Grafito Cátodo: Acero inoxidable	60 mA	3.35 V y 4.47 V	Zhang et al. 2005
Biodegradación de hidrocarburos en suelo	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , y <i>Klebsiella pneunmoniae</i>	-----	0.006 mA/cm ²	5 V	Olszanowski y Piechowiak. 2006

CAPÍTULO III. FUNDAMENTACIÓN

3.1. Agua residual salina y su problemática ambiental.

Uno de los problemas principales del mundo industrial es la contaminación del suelo, agua subterránea, sedimentos, aguas superficiales y aire, con productos químicos tóxicos vertidos por industrias. El agua residual hipersalina es otra fuente de contaminación (>150 g/L de salinidad), la cual es generada por varias actividades industriales. Esta agua residual es rica tanto en materia orgánica como en sólidos disueltos totales, por lo que la hace difícil de tratar mediante tratamientos biológicos convencionales. (Bindiya y Mathew, 2010).

La presencia de sales en las aguas residuales puede afectar el diseño de estaciones depuradoras, debido a que puede crear un efecto inhibitorio sobre la biocenosis del agua dulce y afectar las propiedades de sedimentación de los sólidos. (Castillo et al. 1995).

Muchos estudios sobre el tratamiento de agua residual salina son basados en el uso de microorganismos halofílicos tanto aerobios como anaerobios. Mismos que pueden remover compuestos orgánicos tóxicos como benzoatos, salicilatos, fenol y compuestos aromáticos a partir de aguas residuales con alto contenido en sales. (Xuliang et al. 2010).



Figura 3. 1. Descarga de agua residual al mar.



Figura 3. 2. Generación de aguas residuales salinas en empresa de curtiduría.

3.2. Industrias que generan efluentes de agua residual salina.

Entre las industrias que generan efluentes salinos se encuentran las dedicadas a la fabricación y manufactura de conservas de productos marinos y vegetales, el proceso de producción de pesticidas/herbicidas, peróxidos orgánicos, algunos productos farmacéuticos, así como también en el proceso de recuperación de gasolina y aceites. Las aguas residuales urbanas también pueden verse afectadas por otras fuentes que no sean industriales. Como es el caso de ciudades isleñas y costeras, ya que en estas el agua dulce es muy escasa y se suministra agua de mar para alimentar los inodoros, esta actividad representa entre el 27 y el 45% del agua total servida. Lo que tiene como consecuencia la salinización del agua residual. (Castillo et al., 1995)

Otras fuentes de aguas residuales hipersalinas incluyen los lixiviados de vertederos, aguas residuales de empacadoras de carne y de aguas subterráneas contaminadas. (Woolard e Irvine, 1995)

Otra situación donde se genera contaminación salina en aguas residuales sucede en las ciudades donde, durante la estación de invierno, se recurre al deshielo de sus calles mediante el uso de sal común, la que en una red de alcantarillado unitario, pasa a formar parte del caudal de agua residual urbana, elevando su concentración salina a valores promedio de hasta 2.000 ppm. (Castillo et al. 1995)

3.2.1. Industria de encurtidos.

Una de las industrias más importantes generadoras de residuos salinos es la de encurtidos. Esta actividad industrial genera efluentes altamente contaminantes por su elevada carga orgánica, materia en suspensión y concentración de sales. La eliminación de forma controlada de estos residuos supone costes de tratamiento elevados, tratamientos que en algunos casos son insuficientes, no llevando a la solución del problema. Un ejemplo de esto lo constituyen las empresas dedicadas al encurtido de aceitunas, pepinillos y coles. (Bódalo et al. 2006).

La Tabla 3.1 muestra la composición típica de las aguas generadas por algunas industrias que procesan encurtidos como col, aceitunas verdes y pepinillos, donde podemos observar que estos dos últimos procesos son los que generan efluentes con mayor contenido en sales.

Tabla 3. 1. Composición de las aguas residuales salinas generadas en el tratamiento de algunos productos. (Bódalo et al. 2006).

PARAMETROS	Aceitunas verdes	Col	Pepinillos
pH	3.6 - 4.3	3.4 – 3.9	3.6
NaCl (g/L)	60 – 90	22 – 45	150
Acidez libre (g lact/L)	5 – 10	0.4 -22	5.4 – 15
Acidez combinada (mEq/L)	0.1 – 0.2		
Polifenoles	0.2 – 0.4		
Color	0.2 – 0.6	63.1	
Sólidos en suspensión (g/L)	0.2 – 2.0	9.4	50 – 64
Sólidos totales (g/L)	65 – 100	42 – 75	180
DBO ₅ (g O ₂ /L)	14 – 18	8 - 28	8.6
DQO (g O ₂ /L)	16 -26	14 - 32	16.3

3.2.2. Proceso de conserva de productos marinos.

Las industrias dedicadas al proceso de conservación de productos marinos generan volúmenes considerados de aguas residuales con alto contenido en sales, ya que uno de los conservadores más eficaces para dicho procedimiento es la sal. El salado es una de las técnicas de procesamiento más antiguas utilizadas por el hombre para conservar alimentos.

Sobre todo en la industria del pescado se utilizan grandes cantidades de agua para el proceso de lavado, donde esta se contamina con una gran cantidad de materia orgánica, a la vez que aumenta su concentración de sales, generándose volúmenes considerables de agua residual salina.

La Tabla 3.2 describe las condiciones del agua residual generada durante el proceso de enlatado de atún.

Tabla 3. 2. Características del agua residual generada en diversas etapas del proceso de enlatado de atún. (Araujo, 1998).

PARAMETRO	PROCESOS		
	Descongelado	Cortes y baldeos	Cocimiento
pH (unid)	6.65	6.45	6.55
DBO	4303	85	20705
DQO	10223	215	54542
Grasas y aceites	275	49	24693
S. Totales	31168	36734	34452
S. Totales Fijos	26100	30648	13624
S. Totales Volátiles	5068	6086	20828
S. Suspendidos Totales	1166	62	14526
S. Suspendidos Fijos	550	38	792
S. Suspendidos Volátiles	616	24	13734
S. Disueltos Totales	30002	36672	14426
S. Disueltos Fijos	25550	30610	12832
S. Disueltos Volátiles	4452	7094	6062

Unidades en mg/L, salvo que indique lo contrario.

3.2.3. Industria de curtido de pieles.

Otra de las industrias que generan grandes efluentes de aguas residuales con alto contenido en sales es la del curtido de pieles, ya que en varios de sus procesos utilizan la sal como uno de sus principales reactivos. El proceso del curtido empleado actualmente en la mayoría de las instalaciones consiste en someter a las pieles en estado salado, húmedo o seco, a tratamientos sucesivos de desalado, descarnado, remojado, tratado con cal, aireado, lavado, para finalmente realizarse curtido químico, basado en el empleo de compuestos de cromo.

En todo este proceso se emplean sustancias como cal, carbonato sódico, cloruro sódico, sulfuro sódico, ácido sulfúrico, sulfato amónico, cromo, grasas, alcohol, aceites y tintes, que en mayor o menor medida se incorporan a las aguas residuales, si no han sido retirados antes del vertido. La principal reducción de sal se puede lograr cambiando los procesos de conservación de la piel, que es la principal fuente de contaminación salina en la curtición. De todos los contaminantes presentes en la piel y añadidos durante el proceso, sólo las sales permanecen inalteradas después de los tratamientos de depuración usuales. Las concentraciones de cloruros, según el proceso, pueden estar entre 4.000-8.000 mg/l y las de sulfato entre 1.000-2.500 mg/l. Ello condiciona que no puedan ser eliminadas a un cauce público sin realizar previamente un tratamiento de depuración. Hasta ahora la mayoría de las aguas residuales industriales se mezclaban con las urbanas para realizar de forma conjunta el proceso de depuración. (Bódalo et al. 2006). Lo cual implica la contaminación de las aguas urbanas con cantidades de sal considerables, haciendo el proceso de tratamiento más complicado, debido a que no están diseñados para este tipo de aguas. La Tabla 3.3 nos muestra algunas composiciones de las aguas generadas en el proceso de curtido de pieles de ganado porcino.

Tabla 3. 3. Composición del agua generada en algunos procesos durante el curtido de pieles de ganado porcino. (Sans y Ribas, 1989).

PROCESO	Volumen (%)	NaCl (ppm)	Dureza total (ppm)	DBO (ppm)	ST (ppm)	SV (ppm)
Remojado	19	35.000	-----	2.400	28.000	2.300
Eliminación del pelo	26	5.700	38.000	14.000	55.000	12.900
Macerado	26	640	4.200	4.400	14.000	7.400
Piclaje	5	80.000	-----	4.200	98.000	12.000
Desengrasado	7	100.000	-----	600	110.000	2.300
Curtido al Cr	4	51.000	-----	2.300	80.000	4.600
Líquido de grasas y color						
Primer vaciado	6	410	-----	490	3.950	890
Segundo vaciado	6	135	-----	3.950	3.980	3.030

3.2.4. Producción de plaguicidas.

En la producción de plaguicidas existen dos pasos claramente delimitados, el primero es la manufactura del concentrado del plaguicida a partir de procesos químicos, incluidos los petroquímicos, con ácidos orgánicos, gases como el cloro y otros elementos químicos. Una vez obtenido el concentrado, este no podrá ser aplicado directamente, necesitando del paso número dos, que consiste en la formulación y preparación del plaguicida para su uso final. La potencial descarga de aguas con cargas de contaminantes proviene de los lavados realizados a los reactores para el cambio de producto por producirse. Por lo general se producen entre 3.6 y 5.3 metros cúbicos de aguas residuales por tonelada de producto. Las cuales contienen gran cantidad de sólidos totales, DQO, cloruros, fenoles, sulfuros, etc. (Instituto Nacional de Ecología). En la Tabla 3.4 podemos observar las características de las aguas residuales generadas en la producción de algunos plaguicidas.

Tabla 3. 4. Características de las aguas residuales provenientes de la fabricación de algunos plaguicidas.

PARAMETRO	Herbicidas	Hidrocarburos clorados	Carbamatos	Paration
Fenol y cresol	10	-----	-----	-----
Clorofenol y clorocresol	100	1,111	-----	-----
Ácido clorofenoxiacético	100	2,360	-----	-----
Alcohol octil primario	1,000	-----	-----	-----
NaCl	50,000	52,000	100	7,000
Na ₂ SO ₄	8,000	-----	-----	-----
DBO ₅	2,000	6,300	-----	700
SST	62,000	-----	-----	-----
DQO	-----	8,000	1,000	3,000
ST	-----	2,500	40,000	27,000
SS	-----	104	-----	-----
pH (Unidimensional)	-----	0.5 - 1.0	7.0 - 10.0	2.0
Nitrógeno orgánico	-----	-----	500	-----
Sulfatos	-----	-----	20,000	3,000
Fosfatos	-----	-----	-----	250
Nitratos	-----	-----	-----	20
Paration	-----	-----	-----	20

Unidades en mg/L, salvo que indique lo contrario.

Fuente: Instituto Nacional de Ecología.

3.2.5. Proceso de recuperación de gasolina y aceites.

Otra industria susceptible de producir salmueras o aguas salinas, es la extractiva del petróleo. Muchos yacimientos de petróleo suelen estar junto a yacimientos de sal gema. Para la extracción del petróleo se perforan pozos por los que se inyecta agua dulce, que disuelve la sal y vuelve a subir a la superficie en forma de salmuera; al cabo de un cierto tiempo, se obtiene en la base de cada pozo una gran bolsa de salmuera. Después el pozo se utiliza para el rellenado de la cavidad con crudo de petróleo, desplazando a la salmuera, que es recogida en la superficie en un estanque a cielo abierto. La recuperación del producto petrolífero almacenado se hace empujándolo hacia lo alto por reinyección de agua o de la salmuera. El excedente de salmuera puede ser tratado para recuperar la sal o vertido al mar. (Bódalo et al. 2006). En la Tabla 3.5 podemos encontrar las características del agua residual generada por la industria petrolera.

Tabla 3. 5. Características comunes en aguas residuales generadas por la industria petrolera. (Madero et al. 1998).

PARÁMETRO	VALOR
Fenoles totales (g/L)	20-180
Nitrógeno total (g/L)	40-50
Grasas y aceites (g/L)	100-200
Fósforo total (g/L)	13.4
Cloruros (g/L)	150-180
pH	6-9
DQO	200-600

3.2.6. Productos farmacéuticos.

Las aguas residuales de la industria farmacéutica son las que provienen de las actividades de elaboración de productos, que contienen uno o varios principios activos, adicionados o no de excipientes que se presentan en forma definida (tabletas, cápsulas, inyectables, etc.), que se definen como medicamentos y cuya producción implica procesos físicos. (NOM-073-ECOL-1994). En el proceso de síntesis química se generan residuos de productos orgánicos, inorgánicos y catalizadores, además de disolventes, alcoholes, sales y sulfatos.

Tabla 3. 6. Características de diferentes procesos en la producción de medicamentos.
(Ramos, 2006).

PROCESO	DQO (g/L)	Indicadores de interés
Forma terminada	0.066 a 0.353	CE 483 a $\leq 10\ 000$
Extracción de productos naturales	0.026 a 448.218	CE 457 a $\leq 10\ 000$
Síntesis química	6.512 a 13.968	CE 510 a ≤ 1617
Fermentación	11.278 a 16.864	CE $\leq 10\ 000$
Etapas química o de purificación	0.522 a 13.912	CE 1100 a $\leq 10\ 000$
Otros procesos biotecnológicos		Pt 700
I	0.007 a 652.500	pH 10
II	0.090 a 10.100	Nt 401
III	0.360 a 1.212	CE = 10 000
Limpieza de equipamiento	0.015 a 154.290	CE 560 a = 10 000

CE = Conductividad eléctrica (mS/cm). Pt = Fósforo total (mg/L). Nt = Nitrógeno total (mg/L).

3.3. Bacterias halófilas.

A pesar de que el cloruro de sodio es conocido como un inhibidor de microorganismos, existen muchos de ellos que al pertenecer a la familia de los extremófilos son capaces de sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de sal, los cuales son conocidos como halófilos. (Ramírez et al. 2006).

Las bacterias halófilas son un grupo diverso de microorganismos que habitan en ambientes salinos. Viven en ambientes naturales donde la concentración de sal es muy alta (hasta 5 molar o 25 por ciento de NaCl). Estos procariontes requieren la sal para el crecimiento, sus paredes celulares, ribosomas y enzimas, se estabilizan con el ión Na⁺.

El término halófilo extremo se utiliza para indicar que estos organismos no solamente son halofílicos, sino que su requerimiento de sal es muy alto, en algunos casos cercanos a la saturación.

Un ejemplo de hábitat extremadamente salino son las salinas marinas: pequeños depósitos llenos con agua de mar que se dejan evaporar, produciendo NaCl y otras sales de valor comercial. A medida que estas salinas se aproximan a los límites mínimos de salinidad para los halófilos extremos, las aguas se tornan rojizas púrpura, color que indica el desarrollo masivo, llamado floración de arqueobacterias halofílicas, estas pueden obtener energía a partir de la luz mediante un proceso que no es la fotosíntesis. Cuando baja la tensión de oxígeno al evaporarse el agua, la bacteria exporta a la membrana celular una proteína llamada bacteriorrodopsina que lleva unido un grupo cromóforo carotenoide: el retinal que es de color púrpura. (Said y Acevedo, 2004).



Figura 3. 3. Salinas Torre Vieja, España.



Figura 3. 4. *Dunaliella Salina*. Micro alga halófila.

La Figura 3.4 muestra una fotografía de las salinas Torre Vieja ubicadas en España, en la cual se pueden observar diferentes tonalidades de rosa, mismas que son causadas por la presencia de microorganismos halófilos.

Los seres vivos se distribuyen filogenéticamente en tres grupos o dominios:

- Bacteria: Incluye a todos los microorganismos procariotas del tipo de las bacterias, también denominadas eubacterias o bacterias auténticas.
- Archaea: Incluye a todos los microorganismos procariotas del tipo de las arqueas, también denominadas arqueobacterias.

- Eukarya: Incluye a todos los organismos eucariotas también conocidos como organismos superiores, es decir, algas, hongos, protozoos, vegetales y animales. (Meseguer, 2004).

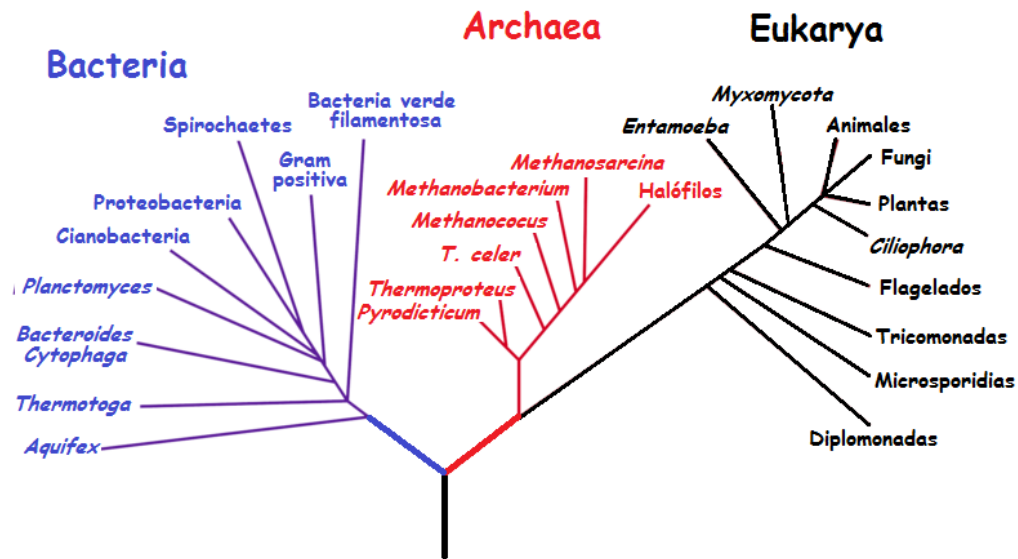


Figura 3. 5. Árbol filogenético de los seres vivos.

La diversidad filogenética de los microorganismos capaces de crecer en presencia de sal se encuentran dentro de los tres dominios de la vida: Archaea, Bacteria y Eukarya. (Molina Pimentel, 2008).

Sin embargo la abundancia de unos a otros varía dependiendo de la concentración de sal en el medio. Así en los ambientes en los que la salinidad es extrema, las arqueas son los microorganismos más abundantes. A medida que la concentración es más moderada, las bacterias van aumentando en proporción, siendo mayoristas cuando la concentración de sal es inferior al 10%. Por otra parte los microorganismos eucariotas son escasos o minoritarios cuando la concentración de sal supera el 5%. (Meseguer, 2004).

Muchos de estos han sido aislados de hábitats que presentan alta salinidad como lo son lagos salinos, suelos salados, alimentos salados y salinas marinas principalmente. (Ramírez et al. 2006).

3.3.1. Clasificación de bacterias halófilas según su capacidad de tolerancia de sales.

Los organismos halófilos pueden ser clasificados en función de la cantidad de sal que requieren para su desarrollo y crecimiento. La Tabla 3.7, nos muestra las diferentes concentraciones de NaCl que requieren los microorganismos halófilos para su crecimiento. (Ramírez et al. 2006).

Tabla 3. 7. Clasificación de halófilos en función de la salinidad (Ramírez et al. 2006).

HALÓFILOS	CONCENTRACIÓN DE NaCl
Halófilos Extremos	Arriba de 20 %
Halófilos Moderados	Arriba de 10 – 20 %
Halófilos Débiles	0.5 – 10 %
Halotolerantes	Toleran la salinidad

3.3.1.1. Halófilos extremos

Por el momento la mayoría de los microorganismos halófilos aislados, son procariotas pertenecientes al dominio Archaea. Entre las arqueas halófilas existen microorganismos pertenecientes a tres familias, siendo la más representativa de ellas la Halobacteriaceae, también conocidas vulgarmente como halobacterias y más recientemente como haloarqueas. (Meseguer, 2004).

Estos microorganismos tienen la capacidad para vivir en las condiciones extremas de los ambientes hipersalinos, hasta 3 – 4 Molar de NaCl y bajo una intensa radiación solar, condiciones en las que prácticamente ningún otro organismo es capaz de sobrevivir.

Las haloarqueas, son por tanto los halófilos más extremos y su viabilidad está condicionada a una concentración salina mínima, por debajo de la cual las células se lisan. Lo que implica haber desarrollado mecanismos de haloadaptación únicos que se manifiestan en la naturaleza de sus componentes, su metabolismo y su fisiología.

Las haloarqueas poseen en su membrana celular pigmentos carotenoides que les proporciona protección frente a la fuerte irradiación solar a las que están sometidas. Cuando se cultivan en el laboratorio producen colonias de diversas tonalidades rojizas, rosas o anaranjadas, dependiendo de las especies y las condiciones de cultivo. La membrana celular que contiene estos pigmentos se conoce por ello como “membrana roja”.

En ambientes como las salinas, donde estos microorganismos se encuentran en elevadas concentraciones, el agua puede llegar a adquirir tonalidades muy intensas (desde el anaranjado al rojo). (Meseguer, 2004).

La Figura 3.7 nos muestra una micrografía obtenida a partir de un microscopio electrónico de barrido de *Halorhabdus Utahensis* del tipo strain (AX-2^T), la cual fue estudiada por Anderson y colaboradores (2009), aislada a partir de sedimentos del Gran Lago Salado de Utah, USA, encontrando que este microorganismo puede soportar concentraciones de sal que van desde 9 a 30% de NaCl, con un óptimo de 27%, siendo considerado este microorganismo como halófilo del tipo extremo.

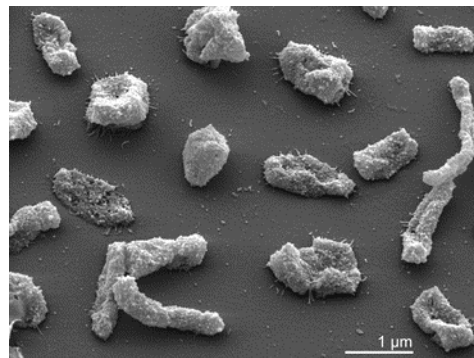


Figura 3. 6. Micrografía de *Halorhabdus Utahensis* Strain AX-2^T. (Anderson et al. 2009).

3.3.1.2. Halófilos moderados

Dentro de los microorganismos halófilos moderados podemos encontrar a las cianobacterias planctónicas y formadoras de tapetes microbianos (microbial mats) y otras bacterias fototróficas anaerobias del grupo de las bacterias rojas y verdes del azufre (por ejemplo: *Ectothiordospira* spp) y no del azufre (por ejemplo: *Chromatium* spp).

También encontramos bacterias gram negativas anaerobias (por ejemplo: *Haloanaerobacter* spp), algunas de ellas metanógenas y aerobias o facultativas (como algunas especies de los géneros *Halomonas*, *Cromohalobacter*, *Salinovibrio*, *Pseudomonas*, etc). (Meseguer, 2004).

Hay algunas especies de bacterias gram positivas pertenecientes a varios géneros como *Halobacillus*, *Bacillus*, *Marinococcus*, etc., y algunos actinomicetos (*Actinopolispora halophila*). (Meseguer, 2004). La figura 3.8 nos muestra algunas fotografías de organismos halófilos moderados.

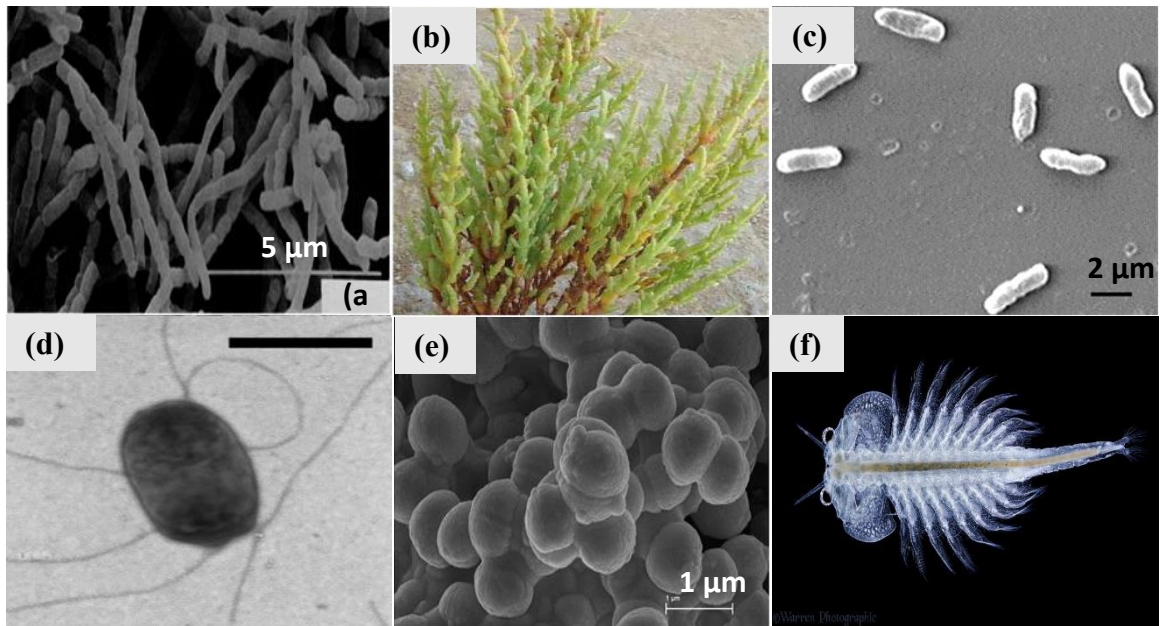


Figura 3. 7. Fotografías de halófilos moderados. a) Micrografía de *Actinopolyspora mortivallis* sp., su crecimiento óptimo se encuentra de 10-12.5% NaCl (Yoshida et al. 1991). b) *Salicornia ramosissima*, planta halófila moderada, crece en salinas y saladares temporalmente encharcados. (López et al. 2011). c) *Halomonas salifodinae* sp., crece en presencia de 0.5-20% NaCl. (Wang et al. 2008). d) *Halomona salaria* sp., crecimiento óptimo de 10-20% de NaCl. (Kyu et al. 2007). e) *Salinicoccus carcancri* Crm^T., crece favorablemente en concentraciones de 0-20% de NaCl. (Hyun et al. 2013). f) *Artemia Salina*, crustáceo halófilo moderado, puede vivir en ambientes con concentraciones mayores al 10% de NaCl.

3.3.1.3. Halófilos débiles

Dentro de este tipo encontramos a la mayoría de los organismos marinos, considerando que el agua de mar contiene cerca del 3% (p/v) de NaCl. (Ramírez y col. 2004). La diversidad de los microorganismos disminuye al aumentar la concentración de sal. (Molina Pimentel, 2008).

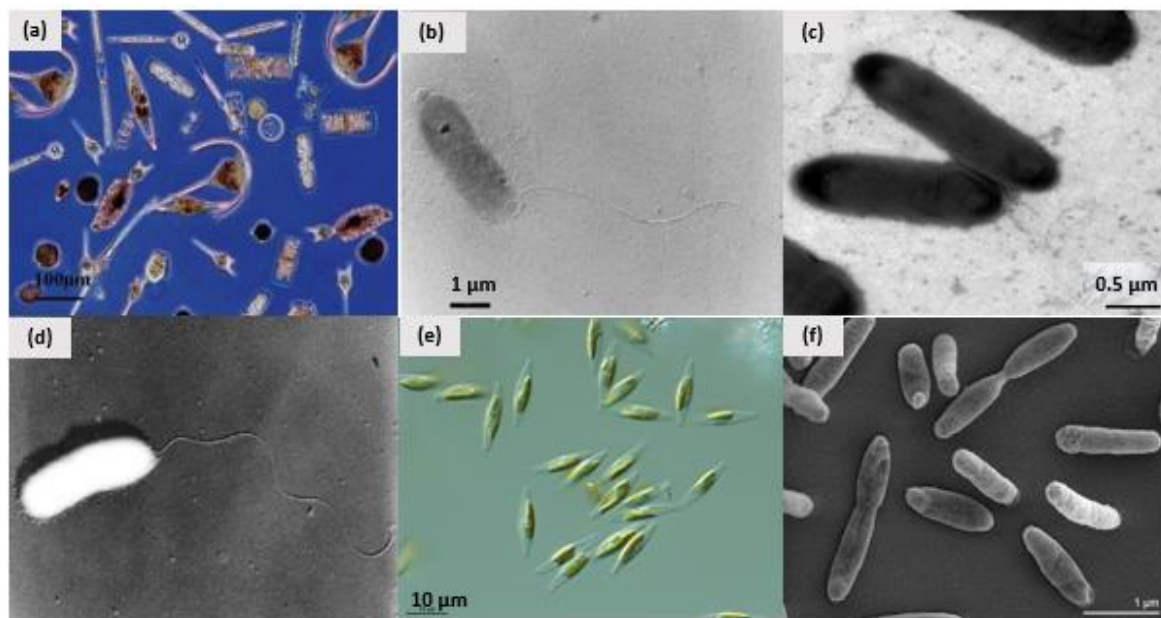


Figura 3. 8. Micrografías de halófilos débiles. a) Fitoplancton marino. b) *Moritella abyssi* sp. nov. Tipo 2693^T., su crecimiento óptimo es a una concentración de 3.5% de NaCl. (Xu et al. 2003). c) *Marinobacter mobilis* sp.nov, crece a concentraciones que van de 0.5-10% NaCl. (Huo et al. 2008). d) *Vibrio fluvialis*, crece en habitats marinos y salobres. (Monsreal et al. 2012). e) Microalgas halófilas débiles *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyceae), crecen normalmente en aguas marinas con concentraciones de NaCl de 3.5%. (López et al. 1992). f) *Joostella Marina* En5^T, su crecimiento óptimo es de 1-3% NaCl (Stackebrandt et al. 2013).

3.3.1.4. Halotolerantes

Son microorganismos capaces de vivir tanto en ausencia como en presencia de sales, habitan ambientes salinos de diversas zonas geográficas cuya composición iónica es variable. (Flores et al. 2010). La Figura 3.10 nos muestra algunas micrografías de bacterias halotolerantes.

En la Tabla 3.8 podemos observar diferentes microorganismos aislados de algunas partes del mundo, así como su crecimiento óptimo en ambientes con concentraciones de sal.

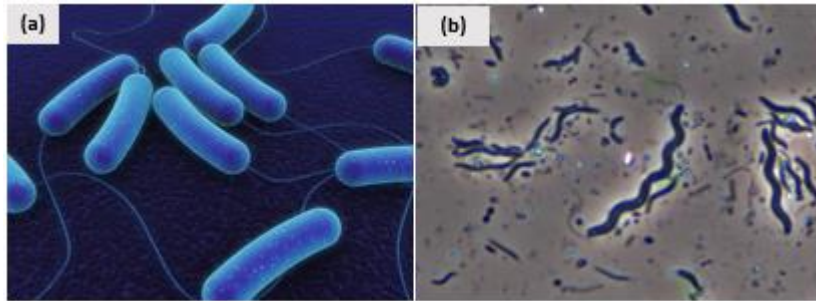


Figura 3. 9. Micrografías de bacterias halotolerantes. a) *Escherichia coli*, comúnmente crece en medios sin sal, sin embargo puede tolerar pequeñas cantidades de esta (0-4 %). b) *Aquaspirillum serpens*, puede tolerar pequeñas cantidades de NaCl (0-1%). (Stanier et al.1992).

3.3.2. Adaptación de las bacterias halófilas.

La membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios.

Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas, y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos. (Ramírez et al. 2006).

Tabla 3. 8. Microorganismos halófilos aislados en diferentes partes del mundo.
(Ramírez et al. 2006).

MICROORGANISMO	PROCEDENCIA	CRECIMIENTO ÓPTIMO (% NaCl)
<i>Actinopolyspora halophila</i>	Contaminante en medio con 25% NaCl. Canadá	10
<i>A. Mortivallis</i>	Suelo salado. Valle de la muerte, California.	5 – 25
<i>A. Iraquiensis</i>	Suelo salino. Iraq	10 – 15
<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	Suelo salado. Alicante, España.	10
<i>Nocardiopsis halophila</i>	Suelo salino. Iraq	20
<i>Nocardiopsis kunsanensis</i>	Salinas de Kunsan. Korea	10
<i>Nocardioides aquaticus</i>	Lago salado Ekho. Antártida	1 – 6
<i>Friendmanniella lacustris</i>	Lago salado Ekho. Antártida	4
<i>Streptimomospora salina</i>	Lago salado. Oeste de China.	15
<i>Saccharomonospora halophila</i>	Suelo pantanoso. Kuwait.	10
<i>Nocardiopsis xinjiangensis</i>	Suelo salino. Xinjiang, China.	10
<i>Streptomospora alba</i>	Suelo salino. Xinjiang, China.	10 – 15
<i>Prauserella halophila</i>	Suelo salino. Xinjiang, China.	10
<i>Prauserella alba</i>	Suelo salino. Xinjiang, China.	10
<i>Saccharomonospora paurometabolica</i>	Suelo salino. Xinjiang, China.	10

3.3.2.1. Mecanismos de acumulación de las bacterias halófilas.

A fin de sobrevivir en concentraciones de sal alta, los microorganismos halofílicos tienen que mantener un equilibrio osmótico con su ambiente externo, por lo que tienden a acumular compuestos en su citoplasma, pudiendo ser iónicos o no iónicos, según el tipo de microorganismo. (Ramírez et al. 2006). En años recientes, las investigaciones detalladas han sido buscadas para entender tres teorías principales:

1.- La carga superficial muy negativa de proteínas halofílicas los hace más solubles y les da más flexibilidad en concentraciones de sal alta, condiciones en las cuales las proteínas no-halofílicas tienden a hacerse rígidas. La mayor parte de enzimas de las halobacterias son activas y estables en concentraciones de sal alta y pierden actividades en concentraciones de sal más bajas que 2 M. (Xuliang et al. 2010).

2.- El mecanismo de acumulación llamado “salt in” es típico de Arqueas y Haloanaerobiales (bacterias halófilas moderadas anaerobias estrictas), que acumulan en su citoplasma iones inorgánicos, principalmente K^+ y Cl^- , con la finalidad de mantener concentraciones intracelulares de sal, osmóticamente o al menos equivalente a la concentración externa de sal. (González y Peña. 2002). El aumento en la concentración de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salinas de todas las proteínas y otros componentes celulares como ribosomas. (Ramírez et al. 2006).

3.- Durante el estrés salino, puede ocurrir un mecanismo llamado “salt out”, mismo que utilizan las bacterias tanto halófilas como no halófilas, además de la arqueas metanógenas halófilas moderadas. En el cual los microorganismos son capaces de acumular solutos compatibles de su ambiente o sintetizar tales solutos compatibles y mantener así el equilibrio osmótico, sin interferir con el metabolismo celular. Este sistema permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio.

Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis. Algunos ejemplos de estos solutos compatibles son: azúcares, aminoácidos, glicina betaina, trehalosa, ectoína e hidroxiectoína. (Ramírez et al. 2006).

Por lo tanto, las bacterias halofílicas podrían sobrevivir en ambientes con concentraciones de sal alta. Debido a sus características duales de ser halofílicas y degradadoras de contaminantes, las bacterias halófilas poseen un valor de aplicación enorme para tratar agua residual salina y suelo salino contaminado. (Xuliang et al. 2010).

3.3.3. Aplicaciones de las bacterias halófilas.

Las bacterias halófilas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico, debido a que no solo producen compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan algunas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. (Ramírez et al. 2006).

3.3.3.1. Solutos compatibles.

Las bacterias halófilas acumulan en su citoplasma compuestos orgánicos de bajo peso molecular que no interfieren con el metabolismo celular, los cuales son llamados solutos compatibles, y que constituyen la base fundamental de la tolerancia a la sal de estos microorganismos.

Dichos compuestos osmoprotectores han despertado un enorme interés a nivel industrial ya que poseen un alto poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas e incluso células enteras, contra la congelación, la desecación, la desnaturalización por calor y la alta salinidad.

Algunos solutos compatibles, como la ectoína y la hidroxiectoína han demostrado poseer un marcado efecto protector sobre las enzimas lábiles, como el lactato deshidrogenasa y la fructoquinasa. (Ramírez, 2006). Uno de los osmolitos más abundantes es la ectoína. Las ectoínas son comunes en eubacterias aeróbicas heterotróficas. Una de las aplicaciones de la ectoína es como estabilizador de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La trehalosa muestra características de estabilizador de proteínas y membranas bajo condiciones de estrés, especialmente durante la desecación; su efecto protector consiste en reemplazar a las moléculas de agua a través de las uniones polares de sus residuos, la trehalosa previene la desnaturalización de las proteínas. Los liposomas son usados en medicamentos y cosméticos para el transporte de los compuestos hacia sitios específicos en el cuerpo.

Los lípidos unidos a éteres de halófilos del filo Archaea tienen una alta estabilidad química y resistencia contra las esterazas y de esta manera tienen una alta tasa de sobrevivencia comparada con los liposomas que están basadas en derivados de ácidos grasos. (Margesin y Schinner, 2001).

3.3.3.2. Biodegradación de residuos en aguas residuales

Las bacterias halófilas han alcanzado recientemente un gran interés en el campo de la degradación de los residuos tóxicos. Constituyen una importante alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales en aquellos casos en los que éstos sean ineficaces, como lo son los procesos industriales que generan aguas residuales hipersalinas. Esto sucede por ejemplo en la producción de diversas sustancias químicas como los pesticidas, determinados productos farmacéuticos y herbicidas, y los procesos de extracción de petróleo y gas. (Ramírez et al, 2006).

a) Hidrocarburos

La habilidad de halófilos y halotolerantes para oxidar hidrocarburos en presencia de sal es útil para el tratamiento biológico de ecosistemas salinos contaminados con productos del petróleo. Algunos estudios han demostrado que las Arqueas halófilas extremas (una de ellas identificada como *Haloferax mediterranei*), es capaz de crecer en ambientes con 10% - 25% de NaCl, utilizando aceite como única fuente de carbono. (Margesin y Schinner, 2001).

b) Remoción de Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La eficiencia de la remoción de DQO se reduce al aumentar la concentración de sal sobre los 20 g/L, además de que los altos contenidos de sal también reducen la capacidad de tratamiento nitrificante y desnitrificante de las bacterias. Hari y Mathew lograron reducir en un 86.36% la concentración de DQO, utilizando un cultivo puro de *Staphylococcus Xylosus* en un medio que contenía 10 g/L NaCl y una reducción del 72.57% de DQO en un medio con 15 g/L NaCl, con un tiempo de retención de 24 horas. Cuando la bacteria anaerobia tolerante a la sal *Halanaerobium lacusrosei* es usado como cultivo microbiano dominante en un proceso de

tratamiento de aguas residual salina, el porcentaje de remoción de DQO incrementa en un 94% para una concentración inicial de 1900 mg/L, con un TRH de 19 horas y un 3% de concentración de sal. (Xuliang et al, 2010).

c) Degradación de Fenol

Los microorganismos halófilos pueden remover materia orgánica tóxica como benzoatos, salicilatos, fenoles y compuestos aromáticos a partir de agua residual salina. (Xuliang et al, 2010). En algunos estudios utilizan microorganismos halófilos moderados obtenidos del Gran Lago Salino ubicado en Utah, U.S.A., con la finalidad de degradar Fenol, en un agua residual que contiene 15% de sal adicionando hierro, nitrógeno y fosforo al medio. Utilizando un reactor tipo SBR operado al 15% de sal, durante 7 meses, y logran obtener hasta un 99.5% de remoción de Fenol. (Woorlard e Irvine, 1994). Debido a que el fenol es un contaminante orgánico recalcitrante es de nuestro interés estudiar su efecto utilizando microorganismos halotolerantes, adicionándolo como única fuente de carbono en un sistema a nivel matraz. La Figura 2.4, nos muestra la biodegradación aerobia del Fenol, la cual puede darse principalmente mediante dos rutas metabólicas. El anillo aromático es inicialmente monohidroxilado por una fenolmonoxigenasahidroxilasa en una posición orto, de esta manera se forma el catecol. Este es el principal intermediario que resulta del metabolismo del Fenol por diferentes cepas de microorganismos.

Dependiendo del tipo de cepa, el catecol sufre después un fraccionamiento del anillo, el cual puede suceder en la posición orto, formando succinato Co-A y acetil Co-A, o posición meta, formando piruvato, formaldehído y acetaldehído. (Montenegro et al. 2010).

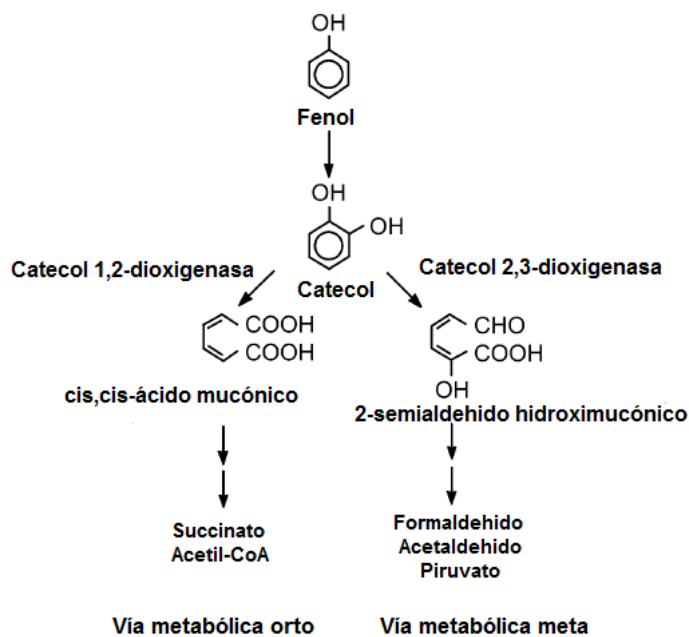


Figura 3. 10. Degradación aeróbica del Fenol. (Montenegro et al. 2010).

En la Tabla 3.9 podemos observar diferentes estudios en los que utilizan microorganismos halotolerantes para degradar compuestos orgánicos.

Tabla 3. 9. Ejemplos de descontaminación de agua residual por microorganismos halófilos.

TIPO DE MICROORGANISMO	CONTAMINANTE	PROCEDENCIA	REFERENCIA
Microbulbifer degradans 2-40	Fenol	Bahía de Chesapeake	Gonzales, et al. 2005
Microorganismos halotolerantes	Nitratos	Sedimentos de la Bahía de lobos (San Ignacio, Río Muerto, Sonora)	Meza, et al. 2012
Staphylococcus Xylosus MTCC Núm. 7441	DQO	Pulpa de mango	Bindiya y Mathew. 2010
Cultivo mixto	DQO Y DBO	Lodos activados de una planta de salsa de pescado	Dan, et al. 2002
Bacterias halófilicas	Fenol	Suelo salino proveniente del Gran Lago Salino, Ogden, Utah. USA.	Woolard e Irvine. 1995

Halobacter halobium y Zooglea ramigera	DQO	Lodos activados de una planta de tratamiento de la compañía PAK- MAYA. USA	Kargi e Uygur. 1996
Agrbacterium tumefasciens, Flavimonas oryzihabitans, Serratia marcescens, Vibrio alginolyticus y Vibrio metschnikovii.	Suelos sódicos y salinos	Agua de mar de la isla de San Andrés y agua superficial del Humedal Cintura de la cuenca del río San Jorge Córdoba. Bogotá.	Sánchez y Arguello. 2006
Pseudomonas putida MTCC 1194	Fenol y Catecol	-----	Kumar, et al. 2005.
Cultivo mixto halotolerante	Fenol y COT	Agua de mar de la playa Miramar Tampico, Tamaulipas.	Este estudio

3.3.3.3. Enzimas y otras moléculas de interés biotecnológico

Muchos procesos industriales se desarrollan bajo condiciones extremas, lo que ofrece un campo de aplicación para las enzimas producidas por microorganismos extremófilos, capaces de actuar a valores extremos de temperatura, pH o salinidad.

La mayoría de las enzimas halófilas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado a la fecha provienen de bacterias halófilas moderadas. Varias de ellas hidrolasas del tipo de las amilasas, proteasas, nucleasas así como otras moléculas que actualmente tienen importantes aplicaciones en procesos biotecnológicos producidos por halófilos.

En la Tabla 3.10 se muestran algunas enzimas y otros compuestos aislados a partir de microorganismos halófilos.

Tabla 3. 10. Enzimas y otras moléculas de microorganismos halófilos y sus aplicaciones biotecnológicas. (Ramírez et al. 2006).

FUENTE	APLICACIÓN
Proteasas	Síntesis peptídica
Deshidrogenadas	Biocatálisis en medio orgánico
Nucleasas, amilasas	Agentes saborizantes
B-caroteno, ácido a linoléico, y extractos celulares (Spirulina y Dunaliella)	Alimentos naturales, complementos alimenticios, colorantes para alimentos y alimento para ganado.
Bacteriorrodopsina	Interruptores ópticos y generadores fotónicos de corriente en dispositivos bioelectrónicos.
Polihidroxicanoatos	Plásticos de uso en medicina.
Polímeros reológicos	Recuperación de petróleo.
Lípidos	Liposomas para liberación de fármacos y cosméticos.
Solutos compatibles	Protectores de proteínas y células en una variedad de aplicaciones industriales como congelación y calentamiento.
Glicerol	Productos farmacéuticos.
Membranas	Surfactantes para productos farmacéuticos.
Microorganismos	Salsas fermentadas y modificadoras de sabor y textura en alimentos. Transformación y degradación de desechos.

3.3.3.4. Biopolímeros

Los polímeros bacterianos tienen gran importancia en la industria petrolera. Gracias a sus propiedades surfactantes y emulsionantes pueden aumentar la eficacia de los procesos de extracción de crudo del subsuelo incrementando la viscosidad del agua que se inyecta alrededor de las bolsas, disminuyendo así la tensión superficial.

Las bolsas de petróleo suelen presentar una elevada salinidad, lo que hace especialmente interesante la utilización directa de bacterias halófilas moderadas productoras de biopolímeros. (Ramírez et al, 2006).

Los liposomas son usados en medicina y producción de cosméticos para el transporte de compuestos a sitios específicos del cuerpo. Los lípidos obtenidos a partir de Arqueas halófilas poseen una alta estabilidad química y resistencia a las esterazas y una supervivencia más alta que los liposomas derivados de los ácidos grasos. (Margesin y Schinner, 2001).

Algunas arqueas y bacterias halófilas producen Poly- β -hydroxyalkanoato (PHA), polímero usado en la producción de plásticos biodegradables con propiedades similares al polipropileno. (Oren, 2010).

3.3.3.5. Biocombustibles.

En la actualidad los combustibles fósiles se están agotando, por lo que se han buscado fuentes alternativas de energía, una interesante posibilidad son los biocombustibles. Aunque los microorganismos halófilos no son una fuente obvia para que los combustibles puedan ser producidos comercialmente, todavía resulta de interés su aplicación. Por ejemplo: el alga halófila *Dunaliella* se considera como una fuente comercial de β – caroteno, como una fuente de producción de glicerol y como materia prima en la producción de biocombustibles. La pirólisis del material de células de *Dunaliella* a 200-240 °C produce una sustancia aceitosa soluble en benceno, el proceso global demostró ser exotérmico, por lo que la mayoría de la energía térmica necesaria para iniciar la reacción puede ser recuperada. Hasta el 75% del material celular del alga de agua de mar puede ser convertido en aceite extraíble. (Oren, 2010).

3.4. Diseño de experimentos mediante el método Taguchi.

La metodología Taguchi propone una alternativa que se conoce como arreglos ortogonales y las gráficas lineales, con la finalidad de identificar qué factores afectan la característica de calidad en cuanto a su magnitud y en cuanto a su variabilidad, así como los niveles óptimos en los que se deben fijar dichos parámetros, para la optimización de la operación del producto. (Santos, 2005).

Un arreglo ortogonal se puede comparar con una replicación factorial fraccionada, de manera que conserva el concepto de ortogonalidad y contrastes. Un experimento factorial fraccionado es también un arreglo ortogonal. Taguchi desarrolló una serie de arreglos particulares que denominó:

$$L_a(b)^c$$

Donde:

a = Número de pruebas o condiciones experimentales que se tomarán. Es el número de renglones o líneas en el arreglo.

b = Representa los diferentes niveles a los que se tomará cada factor.

c = Es el número de efectos independientes que se pueden analizar, esto es el número de columnas. (Santos, 2005).

Para este caso se realiza un arreglo $L_9(3)^4$. Donde se tienen 4 factores con tres niveles cada uno, realizándose 9 pruebas, las cuales se corren por triplicado.

Para Taguchi, es posible incorporar la calidad en los productos desde su diseño, sin aumentar su costo; los problemas deben eliminarse en el laboratorio de diseño, no en la fábrica o en el campo. Según esta perspectiva, es necesario diseñar productos robustos que toleren variaciones en el proceso de producción y durante el servicio de mantenimiento.

Los métodos estadísticos deben seleccionar los factores importantes que afectan el diseño.

Taguchi establece su metodología para:

1. Diseñar productos y procesos robustos a las condiciones ambientales.
2. Diseñar y desarrollar productos robustos a la variación en sus componentes.
3. Minimizar la variación alrededor de un valor objetivo.

La ingeniería de la calidad de Taguchi combina métodos estadísticos y de ingeniería para optimizar los procesos de diseño y fabricación de modo que aumente la calidad y se reduzcan los costos de los productos.

El diseño de experimentos juega un papel esencial en el enfoque de Taguchi, ayuda a identificar los factores que más intervienen en la generación de problemas de calidad o, alternativamente, los factores que más contribuyen a lograr resultados positivos. (Yacuzzi et al. 2004).

3.4.1. Enfoque Taguchi.

Taguchi propone tres etapas en el diseño de un producto o de un proceso.

- 1.- Diseño del sistema.
- 2.- Diseño de los parámetros.
- 3.- Diseño de las tolerancias.

En el diseño del sistema se determina la configuración básica de los componentes, incluye la determinación de los materiales y el diseño del sistema con todos sus componentes. En el diseño de los parámetros, se determinan los niveles o valores de los factores controlables (parámetros de diseño) para minimizar el efecto de los factores incontrolables en las características del producto terminado. Finalmente, el diseño de las tolerancias apunta a reducir la varianza en las características del producto terminado cuando la reducción lograda en el diseño de los parámetros no es suficiente. (Yacuzzi et al. 2004).

3.4.2. Métodos recomendados por Taguchi.

Taguchi recomienda métodos que se apartan parcialmente de los usados en el diseño de experimentos clásico; la terminología que utiliza también es algo distinta. En primer lugar, Taguchi divide los factores de un experimento en factores controlables y factores incontrolables, o ruido. Para el análisis de datos, Taguchi recomienda analizar la variación de los resultados con una relación señal-ruido apropiado. Se consideran óptimos los niveles de los factores que maximicen una relación señal-ruido adecuada. Estas relaciones difieren según el objetivo del experimento, ya sea reducir la variabilidad alrededor de un valor objetivo determinado, o producir un efecto resultante lo mayor posible, o, inversamente, producir el menor efecto posible.

El objetivo principal de la ingeniería en general es alcanzar mejoras de rendimiento sostenibles ante cualquier condición. Esto es a lo que se le llama robustez. Taguchi mide la robustez con el ratio señal-ruido. Mientras más robusta es una tecnología, más fuerte es la señal que emite contra cualquier ruido externo que trate de inhibir la fuerza de la señal. Para Taguchi, el uso de las relaciones señal-ruido eliminan en general la necesidad de examinar las interacciones entre los factores controlables y los factores de ruido. (Yacuzzi et al. 2004).

Los factores de “ruido” en un proceso, pueden clasificarse en:

- Ruidos externos, referidos a las fuerzas externas que causan variación en el sistema.
- Ruidos internos, estos están relacionados con la variación causada por los elementos que constituyen el producto.
- Los ruidos entre productos, son aquellos que se refieren a las diferencias entre una unidad de producto completada y otro. (Santos, 2005).

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de halobacterias a partir de agua de mar.

Se obtuvo un consorcio microbiano a partir de agua de mar (tomada de la playa Miramar, Tampico, Tamaulipas), adicionando como fuente de energía dextrosa y extracto de levadura como fuente de vitaminas, en proporción de 500 mg por litro de cada una. Así como también se adicionaron soluciones de macro y micronutrientes (Tabla 4.1 y 4.2) para complementar las sustancias que requieren las bacterias para su crecimiento. Las cuales aportan las siguientes proporciones de nutrientes (DQO: N: P = 100: 5: 1). La alimentación se realizó una vez por semana, eliminando 500 ml de licor mezclado y agregando la misma cantidad de la mezcla de solución con 20 g/L de NaCl y los nutrientes. Se agregó aire por medio de dispersión, con ayuda de bombas para pecera.

Tabla 4. 1. SOLUCIÓN A. MACRONUTRIENTES. Agregar 1 ml por L de sustrato.
(Molina Pérez et al. 2008).

COMPUESTO	CANTIDAD (g/L)
K_2HPO_4	16
KH_2PO_4	8
NH_4Cl	6

Tabla 4. 2. SOLUCIÓN B. MICRONUTRIENTES. Agregar 1 ml por L de sustrato.
(Molina Pérez et al.2008).

COMPUESTO	CANTIDAD (mg/L)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	750
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	50
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	50
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	50
$CaCl_2$	100

4.2. Siembra de microorganismos existentes en el licor mezclado.

Se realizó una siembra del licor mezclado obtenido, esto con la finalidad de observar si las bacterias cultivadas son capaces de sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de NaCl.

4.2.1. Preparación del medio de cultivo.

Como medio de cultivo se utilizó Agar Estándar (Acumedia Neogen), el cual se disolvió en soluciones con diferentes concentraciones de NaCl, siendo estas del 5, 10, 15, 20, 25 y 30%.

- Se esterilizó el medio en autoclave, a 121 °C, durante 20 minutos.
- Se agregó el medio en placas de petri, aproximadamente 20 ml de medio por cada placa.
- Ya que solidifica el medio, está listo para hacer el cultivo, y este se hace tomando una alícuota de la muestra utilizando un asa de siembra, previamente esterilizada con la flama del mechero, y se extiende sobre la placa.
- Una vez hecha la siembra en las placas a diferentes concentraciones, se lleva a la incubadora, a una temperatura de 37 °C, por un periodo de 72 horas.

4.2.2. Tinción gram de los microorganismos encontrados en el licor mezclado.

Se hizo tinción Gram para observar la morfología de los microorganismos existentes.

- Se toma una muestra con el asa del cultivo de microorganismos, y se extiende en un portaobjetos, y esta se fija con alcohol (metanol), con la finalidad de coagular el protoplasma de las células y hacer que se adhieran al portaobjetos.
- Se deja secar, y se agrega unas gotas de cristal violeta, cubriendo la muestra, el colorante reacciona con las células cargadas negativamente, coloreándolas.
- Después de un minuto se aplican unas gotas de yodo el cuál se combina con el colorante, para formar un compuesto insoluble coloreado en el interior de la célula.
- Después de un minuto, se lava con una mezcla de alcohol – acetona, que elimina el colorante de algunas bacterias, decolorándolas.
- Ya que se seca el portaobjetos, se aplican unas gotas de safranina, de color rosa, el cual sólo teñirá las bacterias decoloradas en el paso anterior.
- Después se lava el portaobjetos con agua desionizada.
- Se observa al microscopio.

4.2.3. Pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias.

Estas pruebas fueron realizadas en colaboración con la Universidad Tecnológica de San Juan del Río. Para esto se tomó una alícuota de 10 ml del licor mezclado, se sembró en 90 ml de agua peptonada preparada de acuerdo al Anexo 1, y se sometió a incubación a 35°C durante 48 horas, esto como medio de enriquecimiento para las bacterias.

Terminado el periodo de incubación se procedió a sembrar los lodos en Agar Sal y Manitol, para observar su crecimiento. Estas muestras estuvieron en la incubadora a 35°C por 24 horas. Se prepararon cajas con Agar Mac Conkey (unas con 10 ppm de sal y otras sin sal) y se pusieron en el horno a 35°C durante 24 horas.

Una vez terminado el periodo de incubación se comenzaron a hacer las pruebas bioquímicas, para conocer las características de las bacterias. Para esto se lograron aislar tres diferentes colonias, nombradas como 1 A, 2 A, y 3 A. De las cuáles se tomó con un asa de platino una muestra de la colonia identificada y se sembró en cada uno de los medios de las bioquímicas, pasando de uno a otro sin tomar más muestra y sin esterilizar. El orden de los medios fue MIO, SIM, LIA, TSI, Citrato de Simmons y BAB, mismos que fueron preparados de acuerdo a los Anexos 1 y 2. Todos los tubos fueron llevados a la incubadora a 35°C y permanecieron 24 horas, excepto los tubos de Citrato, que permanecieron 72 horas más (96 horas en total). Una vez incubados se procedió a la lectura y registro de los resultados.

Se prepararon más tubos de BAB y se esterilizaron en la autoclave, se tomó una muestra de los tubos de BAB ya incubados y se sembró en 2 tubos más, después de esto se procedió a realizar la identificación morfológica por medio de la técnica de tinción de Gram.

Mientras se incubaban los azúcares, se realizó la prueba de la catalasa para las colonias halladas en el Agar Mac Conkey haciendo un frotis de cada una de las colonias en un portaobjetos y agregando una gota de peróxido de hidrogeno al 3% (agua oxigenada comercial).

4.3. Técnicas Analíticas

4.3.1. Conductividad, Salinidad y Sólidos Totales Disueltos en el licor mezclado.

Con la finalidad de conocer el efecto de los microorganismos sobre la concentración de sales en el sistema se monitorea la conductividad, salinidad y sólidos totales disueltos en el licor mezclado, dichos resultados fueron obtenidos con la ayuda del conductímetro Thermo Scientific, Orion 3 Star.

4.3.2. Sólidos Totales Volátiles.

Se toma una alícuota de la muestra, y se agrega a un crisol, (llevado a peso constante previamente a una temperatura de 550 °C, registrando su peso en mg, como B), se introdujeron a la estufa a una temperatura de 180°C, (esto debido a que la muestra tiene un alto contenido en sales, lo cual dificulta la evaporación del agua a su temperatura normal de ebullición, sección 2540 A.2 fuentes de error y variabilidad, APHA 1995) hasta llegar a peso constante.

Se dejó enfriar el crisol a temperatura ambiente en un desecador, posteriormente se pesa el crisol y se registra como A, para obtener los sólidos totales, de acuerdo a la siguiente Ecuación:

$$\text{sólidos totales} \frac{mg}{L} = \frac{(A-B)*1000}{\text{Volumen de muestra,mL}} \dots\dots\dots \text{Ec. 1}$$

Se introduce el crisol en la mufla a una temperatura de 550 °C, durante 20 min, se llevan a un desecador para enfriarlos y posteriormente pesarlos, el cual es registrado como C, para obtener los sólidos fijos.

$$\text{sólidos fijos} \frac{mg}{L} = \frac{(C-B)*1000}{\text{Volumen de muestra,mL}} \dots\dots\dots \text{Ec.2}$$

Los sólidos volátiles totales se determinan aplicando la Ecuación 3.

$$\text{sólidos volátiles totales} \frac{mg}{L} = \frac{(A-C)*1000}{\text{Volumen de muestra,mL}} \dots\dots \text{Ec.3}$$

4.3.3. Sólidos Suspendidos Volátiles.

Para el monitoreo de sólidos suspendidos volátiles se utiliza un crisol gooch de porcelana y un filtro de fibra de vidrio, para esto se realiza primero un pre-tratamiento de dicho filtro, para esto se sigue el siguiente método:

Preparación del filtro de fibra de vidrio

Se inserta un filtro de fibra de vidrio de 1 μm en un crisol gooch y se filtran 20 ml de agua desionizada tres veces sucesivamente con ayuda de una bomba de vacío. Posteriormente el crisol con el filtro se lleva a la mufla a una temperatura de 550 °C durante 20 minutos, se deja en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente, y después se pesa en una balanza analítica, este procedimiento se repite hasta alcanzar un peso constante o la variación sea de 0.5 mg. (APHA, 1995).

Sólidos Suspendidos Volátiles

Los sólidos suspendidos totales se obtienen de filtrar una alícuota de la muestra deseada en el filtro previamente llevado a peso constante (registrándose como B), con una bomba de vacío. Después el crisol se introduce a la estufa a una temperatura de 180 °C por 20 minutos, y se deja enfriar a temperatura ambiente en un desecador, se pesa y se vuelve a repetir el ciclo hasta llegar a peso constante (se registra como A), para obtener los sólidos suspendidos totales en mg/l, utilizando la Ecuación 4.

$$\text{sólidos suspendidos totales} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{(A-B)*1000}{\text{Volumen de muestra,mL}} \dots\dots\dots \text{Ec. 4}$$

Una vez realizado esto, el crisol se introduce a la mufla a una temperatura de 550 °C durante 20 minutos, se deja enfriar en un desecador y se pesa, dicho procedimiento se repite hasta obtener un peso constante, se registra como C, y se calculan los sólidos suspendidos fijos de acuerdo a la Ecuación 5.

$$\text{sólidos suspendidos fijos} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{(C-B)*1000}{\text{Volumen de muestra,mL}} \dots\dots\dots \text{Ec.5}$$

Para obtener los sólidos suspendidos volátiles se aplica la siguiente Ecuación:

$$\text{sólidos suspendidos volátiles} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{(A-C)*1000}{\text{Volumen de muestra,mL}} \dots\dots\dots \text{Ec. 6}$$

4.3.4. Sólidos Sedimentables.

Son los sólidos que sedimentan en un lapso de tiempo determinado. La prueba de sedimentación es un indicador de la calidad del lodo, ya que nos sirven para calcular el índice volumétrico de lodos y se determinan agregando la muestra a medir a una probeta de 1 litro, se agita bien para conseguir una buena homogenización, se deja sedimentar por 30 minutos y se toma la lectura en ml/L.

4.3.5. Índice Volumétrico de Lodos

El índice volumétrico de lodos nos da una información importante de la operación del sistema. El rango usual del IVL es de 80 – 150, aunque algunas veces un efluente con valores más altos pueden producir un buen efluente, debiendo obtener un lodo café y sobrenadante claro y sin olor. Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$IVL = \frac{Sse}{SSTLM} * 1000 \dots\dots\dots Ec. 7$$

4.3.6. Relación alimento microorganismo F/M

Es necesario que los microorganismos tengan la cantidad adecuada de alimento, ya que poco o demasiado alimento causa problemas de sedimentación. Los microorganismos se miden como SSVLM y el alimento como DBO o DQO. Para determinar la relación F/M se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{F}{M} = \frac{QS_0}{VX} \dots\dots\dots Ec. 8$$

4.3.7. Tiempo de retención celular (TRC) o edad de lodos

Se refiere al tiempo que los microorganismos permanecen en el proceso de tratamiento, se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$TRC = \frac{SSV * V}{Purga * SSV} \dots\dots\dots Ec.9$$

4.3.8. Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Para medir la demanda química de oxígeno se utilizaron tubos de reactivos para DQO de alto rango plus (0 – 15000 mg/L) marca Hach, a los cuales se les adicionó 0.2 ml de la muestra a analizar, se homogeniza, y se lleva al digestor durante 2 horas a 150 °C, se deja enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se lee la cantidad de DQO que contiene la muestra por el método colorimétrico, esto es con ayuda de un espectrofotómetro marca Hach, ingresando el programa 2720, o a una longitud de onda de 620 nm, que son los utilizados para esta técnica, el valor arrojado por el equipo se multiplica por 10 para obtener el valor de DQO en mg/L. Por cada lote de pruebas se introduce un blanco el cual se prepara solamente con agua desionizada.

4.3.9. Carbono Orgánico Total (COT).

- Se tomó 40 ml de la muestra, y se centrifugó a una velocidad de 3000 rpm durante 30 min, esto con la finalidad de separar la biomasa del agua, para que esta no interfiera en el funcionamiento del equipo utilizado para medir COT.
- Debido a las altas concentraciones de sal que contiene la muestra, se hizo una dilución de las mismas, tomando 10 ml del sobrenadante de la muestra y aforando a 100 ml con agua desionizada.
- Posteriormente se filtró la muestra con ayuda de un microfiltro, agregándola a un vial para realizar pruebas de COT, e introduciéndolo al equipo. (Shimadzu Corporation TOC-VCSH/CSN).
- Al cabo de unos minutos, se obtuvieron los resultados de Carbono Total (CT) y Carbono Inorgánico (CI) arrojados directamente por el equipo.
- El resultado de restar el valor del CI al CT corresponde al Carbono Orgánico Total en (mg/L).

4.4. Pruebas con agua residual salina.

El tratamiento de aguas residuales con alto contenido en sales es difícil de llevar a cabo mediante un tratamiento convencional, es por eso que parte de este estudio se enfoca a buscar una alternativa utilizando un bioproceso empleando microorganismos halotolerantes, para esto se realizan algunas pruebas para las cuales se tomaron 200 y 600 ml del licor mezclado (microorganismos cultivados a partir del agua de mar), se adicionaron 1,200 ml de agua residual (tomada del influente de la planta de tratamiento de aguas domesticas de CIDETEQ), y 800 ml

de agua de mar, se mezclaron en un recipiente de vidrio, y se suministró aire por medio de dispersión con ayuda de una bomba para pecera. Estas mezclas tenían como relaciones iniciales sustrato/microorganismo (S_0/X_0) de 0.078 y 0.023 mg/mg, que son los datos que se utilizaran para describir las dos pruebas realizadas. Las muestras de agua residual fueron tomadas en diferente día por lo que las cantidades de COT inicial fueron diferentes para las dos pruebas. Con la finalidad de estudiar la reducción de la materia orgánica en un agua residual con alto contenido en sales, se monitorearon los siguientes parámetros: COT, STV, Conductividad y Salinidad, de acuerdo a las secciones 3.3.1, 3.3.2 y 3.3.5.

4.5. Pruebas utilizando Fenol como un contaminante orgánico.

Debido a que el Fenol es un contaminante orgánico persistente en aguas residuales generadas por algunas industrias, es de nuestro interés estudiar el efecto de este contaminante frente a un tratamiento biológico con bacterias halotolerantes, para esto se realizan algunas pruebas a nivel frascos aplicando aire mediante dispersión y utilizando diferentes concentraciones de Fenol, el cuál es proporcionado como única fuente de carbono para los microorganismos. Utilizando el siguiente procedimiento:

Se adicionaron 125 ml de licor mezclado de microorganismos halotolerantes (25 % de inoculo, el cuál contenía 3683 mg/L de SSV) y 375 ml de solución de Fenol en diferentes concentraciones (20, 60 y 100 ppm), a un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se puso en aireación durante 48 horas aproximadamente, a temperatura ambiente.

Para cada concentración se corre un blanco, al cual no se le adicionan microorganismos, esto con la finalidad de saber si la disminución en la concentración se debe a la aireación, filtración o es por acción de los microorganismos. Se tomaron alícuotas de 15 ml periódicamente para la determinación de la concentración de Fenol con respecto al tiempo.



Figura 4. 1. Pruebas de degradación de fenol.

4.5.1. Curva de calibración de Fenol.

Se realiza una curva de calibración con diferentes concentraciones conocidas de Fenol (0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm), con la finalidad de conocer la longitud de onda que de la mayor absorbancia, siendo esta de 268.792 nm, y así poder determinar la concentración de Fenol durante el proceso, mediante la ecuación arrojada por el análisis de dichos resultados a través de una regresión lineal.

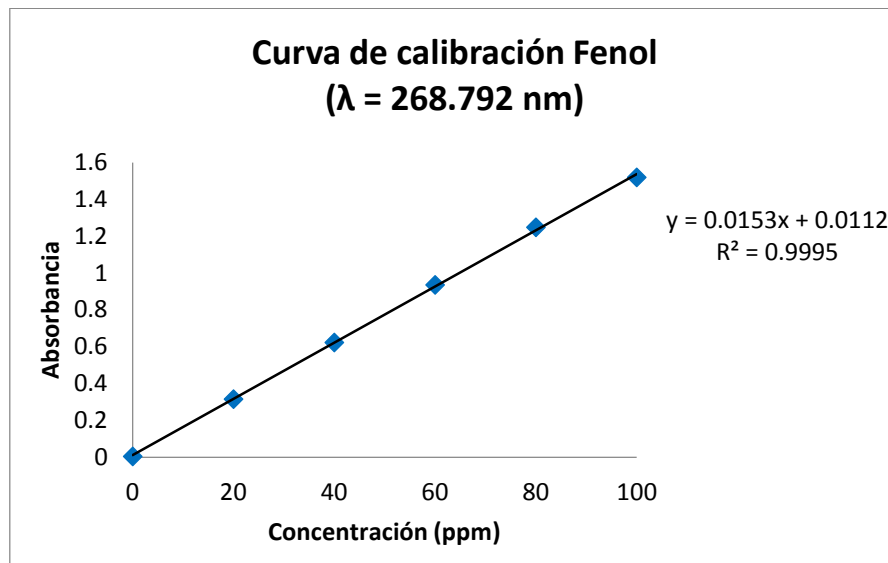


Figura 4. 2. Curva de calibración de Fenol.

A partir de esta curva de calibración se obtiene la ecuación 10, que relaciona la concentración de Fenol y la absorbancia arrojada por el espectrofotómetro.

$$\text{Concentración (ppm)} = \frac{\text{Absorbancia} - 0.0112}{0.0153} \dots\dots\dots \text{Ec.10}$$

4.5.2. Monitoreo de la concentración de Fenol.

Se realizó toma de muestra periódicamente, mismas que fueron sometidas a centrifugación en un tiempo de 30 minutos y a una velocidad de 3000 rpm, después se toma el sobrenadante y se pasa por un filtro de celulosa de 6 μm marca Whatman, por medio de gravedad, con la finalidad de separar la biomasa de la muestra eliminando la turbidez que pueda interferir en los resultados y poder determinar la concentración de Fenol mediante espectroscopia UV – Visible, a partir de la ecuación 1, a una longitud de onda de 268.792 nm.

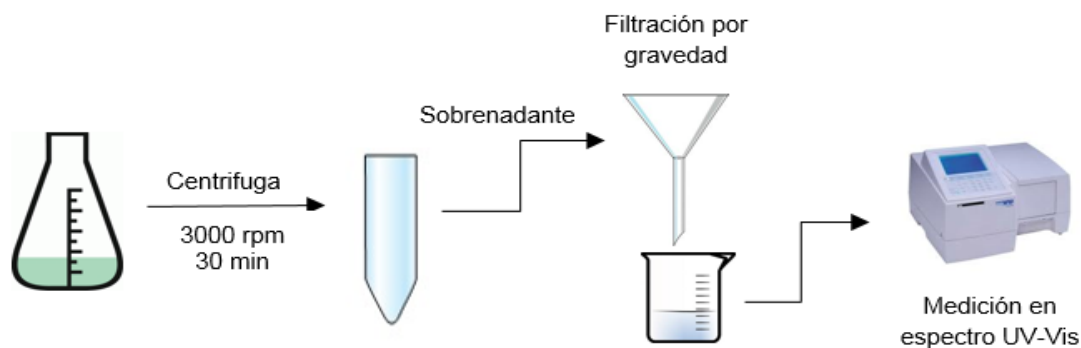


Figura 4. 3. Procedimiento para la medición de concentración de fenol

4.6. Pruebas con estimulación electroquímica.

Con la finalidad de lograr un aumento de biomasa en un periodo de tiempo más corto, se decide aplicar corriente a los microorganismos, debido a que se ha comprobado que al aplicar estimulación electroquímica a un bioproceso se acelera el metabolismo de los microorganismos. Para esto se realiza un diseño de experimentos, en el cuál se aplica corriente eléctrica (administrada con ayuda de una fuente de poder, marca GWINSTEK) sobre los microorganismos obtenidos en el licor mezclado, se utilizan un reactor de placas paralelas, y electrodos de grafito compacto como cátodo y como ánodo.

Se monitorean los SSV al inicio y al final de cada prueba. El sistema se mantiene en agitación durante el periodo de prueba.

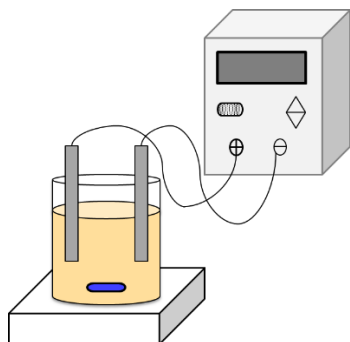


Figura 4. 4. Esquema del reactor para la estimulación electroquímica.

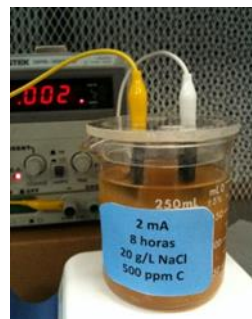


Figura 4. 5. Reactor de placas paralelas.

4.6.1. Diseño de experimentos.

Se realiza un diseño de experimentos tipo Taguchi L9, arrojado por el software Minitab 16, el cuál consta de cuatro variables con tres niveles cada una, el proceso se realiza con tres replicas corridas al azar y como factor de respuesta se calcula el porcentaje de aumento de los Sólidos Suspendidos Volátiles al final de cada prueba.

Tabla 4. 3. Variables a utilizar en el diseño de experimentos.

VARIABLE	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
Corriente a aplicar (mA)	0	2	4
Tiempo (hr)	8	16	24
Concentración de NaCl (g/L)	10	20	30
* Concentración de Carbono (ppm)	0	500	1000

* Se adicionó dextrosa como fuente de carbono.

a) Relación señal/ruido (S/N)

Una vez obtenidos los resultados experimentales para cada una de las condiciones de la matriz de diseño, se calculan dos estadísticos: la media y el denominado “relación señal-ruido”.

Taguchi define esta última variable para el análisis de los datos obtenidos de sus arreglos ortogonales. Incluye, como su nombre lo indica la razón de dos componentes:

- 1.- El termino señal representa el componente deseable, que preferiblemente estará cercano al valor óptimo de la característica de calidad.
- 2.- El termino ruido representa el componente indeseable y es una medida de la variabilidad de la característica de calidad, la cual preferiblemente debe estar cercana a cero.

El valor óptimo de la relación señal a ruido debe ser tan grande como sea posible, sin importar el tipo de característica de calidad de que se trate. Taguchi propone diferentes relaciones señal – ruido según sea el objetivo que se persiga.

Si lo que se pretende es minimizar la respuesta, se deberá utilizar la siguiente ecuación:

$$S/N = -10 \log \frac{\sum_{i=1}^n y_i^2}{n} \dots\dots\dots \text{Ec.11}$$

Si el objetivo es que la respuesta sea lo mayor posible, se maximiza:

$$S/N = -10 \log \frac{\sum_{i=1}^n (1/y_i)^2}{n} \dots\dots\dots \text{Ec.12}$$

Y si se trata de mantener la respuesta en su nivel nominal:

$$S/N = -10 \log \frac{\bar{y}^2}{s^2} \dots\dots\dots \text{Ec.13}$$

Donde:

\bar{y} : Respuesta media para un determinado valor de x.

s^2 : Varianza de las respuestas obtenidas en cada una de las condiciones experimentales, para un determinado valor de x.

b) Análisis de resultados por el método Taguchi.

El análisis de resultados, se puede efectuar de dos maneras diferentes. Una de ellas mediante una serie de gráficas, la otra mediante el análisis de varianza. (Santos, 2005).

4.6.1.1. Gráficos lineales.

La selección del arreglo ortogonal más apropiado y eficiente se llevará a cabo mediante la correcta asignación de los factores en el diseño experimental, en donde las interacciones que surgen de los efectos principales pueden estudiarse mediante el uso de los gráficos lineales.

Estas gráficas pueden ser obtenidas mediante Softwares, en este caso se utilizó Minitab 16, y Statistica para la realización de estas gráficas.

4.6.1.2. Análisis de varianza.

El análisis de varianza (ANOVA) es el sistema de evaluación estadística e interpretación de los resultados. La construcción y uso del análisis para las situaciones experimentales de multi-factores y multi-niveles, se logró con el entendimiento de los conceptos de ecuaciones lineales, réplicas, el número de unidades y, el uso de la suma de cuadrados, que representa la desviación sobre el valor objetivo y_0 , y está representada por:

$$S_T = y_1^2 + y_2^2 + \dots + y_9^2 - CF \dots\dots\dots \text{Ec. 14}$$

En donde el término CF representa un factor de corrección, para el arreglo manejado, calculándose mediante la siguiente fórmula:

$$CF = \frac{(y_1 + y_2 + \dots + y_9)^2}{9} \dots\dots\dots \text{Ec. 15}$$

Para el factor A se tiene:

$$A_1 = y_1 + y_2 + y_3$$

$$A_2 = y_4 + y_5 + y_6$$

$$A_3 = y_7 + y_8 + y_9$$

Y la suma de cuadrados de este factor, esta expresada por:

$$S_A = \frac{A_1^2 + A_2^2 + A_3^2}{3} - CF \dots\dots\dots \text{Ec. 16}$$

Para el cálculo de los demás factores se sigue el mismo criterio, las ecuaciones generales que representan la suma de cuadrados de los factores son:

$$S_B = \left[\sum_{i=1}^3 \left(\frac{B_i^2}{n_{Bi}} \right) \right] - CF \dots\dots\dots \text{Ec. 17}$$

$$S_C = \left[\sum_{i=1}^3 \left(\frac{C_i^2}{n_{Ci}} \right) \right] - CF \dots\dots\dots \text{Ec. 18}$$

$$S_D = \left[\sum_{i=1}^3 \left(\frac{D_i^2}{n_{Di}} \right) \right] - CF \dots\dots\dots \text{Ec. 19}$$

En donde n_{Bi} , n_{Ci} , y n_{Di} , son los números de elementos por celda. (Santos, 2005).

Cálculo de los grados de libertad

Los grados de libertad nos sirven para determinar el tamaño del arreglo ortogonal usado en el diseño experimental. Cada arreglo tiene un número específico de grados de libertad en su estructura. En la estructura del arreglo no se considerará el estudio de las interacciones; por lo que el número de grados de libertad fue calculado a partir de los efectos principales mediante la ecuación siguiente:

Grados de libertad totales:

$$gl_T = gl_A + gl_B + gl_C + gl_D + gl_e \dots\dots\dots \text{Ec. 20}$$

Grados de libertad para los factores:

$$gl_{A,B,C,D} = \# \text{ nivel} - 1 \dots\dots\dots \text{Ec. 21}$$

Varianza

Las ecuaciones para el cálculo de varianza son:

$$V = \frac{S_{A,B,C,D}}{gl_{nivel}} \dots \text{Ec. 22}$$

Para el error:

$$V_e = \frac{S_e}{gl_{error}} \dots \text{Ec. 23}$$

Las relaciones de varianza necesarias para determinar los efectos de las variaciones causadas por los factores están dadas por:

$$F = \frac{V_{A,B,C,D}}{V_e} \dots \text{Ec. 24}$$

Los valores calculados se comparan con los obtenidos de las tablas, para el nivel de confianza deseado, $F_\alpha(k, j)$, en donde, k y j son los grados de libertad del numerador y el denominador respectivamente. Si F experimental es mayor que la F_α de tablas, el efecto es significativo. (Montgomery y Runger, 2008)

CAPÍTULO V. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Obtención de halobacterias a partir de agua de mar.

Se obtuvieron microorganismos halotolerantes a partir de agua de mar de acuerdo al método descrito en la sección 4.1. Se adicionaron los nutrientes necesarios para que se llevara a cabo el crecimiento de microorganismos, se monitorearon los Sólidos Totales Volátiles y Salinidad obteniéndose los siguientes resultados:

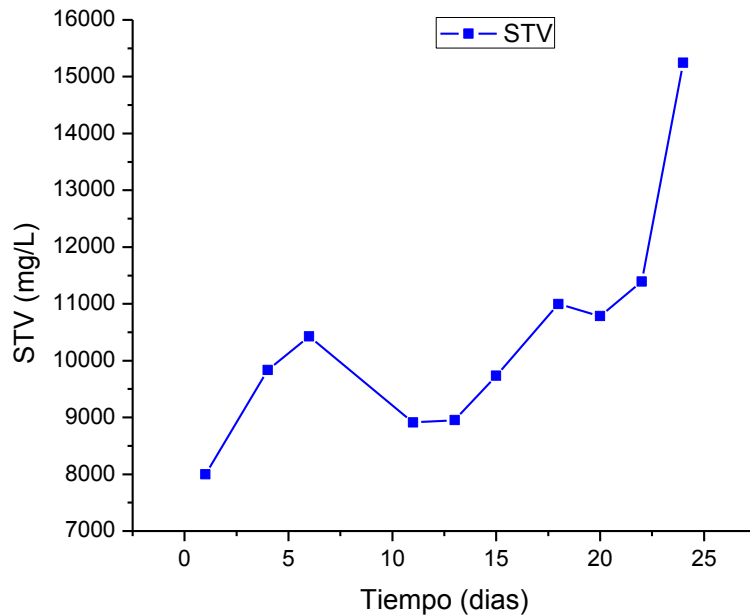


Figura 5. 1. Grafica de STV con respecto al tiempo.



Figura 5. 2. Crisoles para medición de Sólidos Totales Volátiles.

Hubo un incremento en los sólidos volátiles, lo que significa que hubo un aumento en la materia orgánica, que se puede deber a un crecimiento de bacterias, en la gráfica se observa que la curva se comporta de manera exponencial debido a las fases por las que pasan las bacterias.

Se monitoreo la Conductividad, Salinidad y Sólidos Totales Disueltos con ayuda del conductímetro Thermo Scientific, Orion 3 Star, obteniéndose los siguientes resultados, graficados en la Figura 5.3.

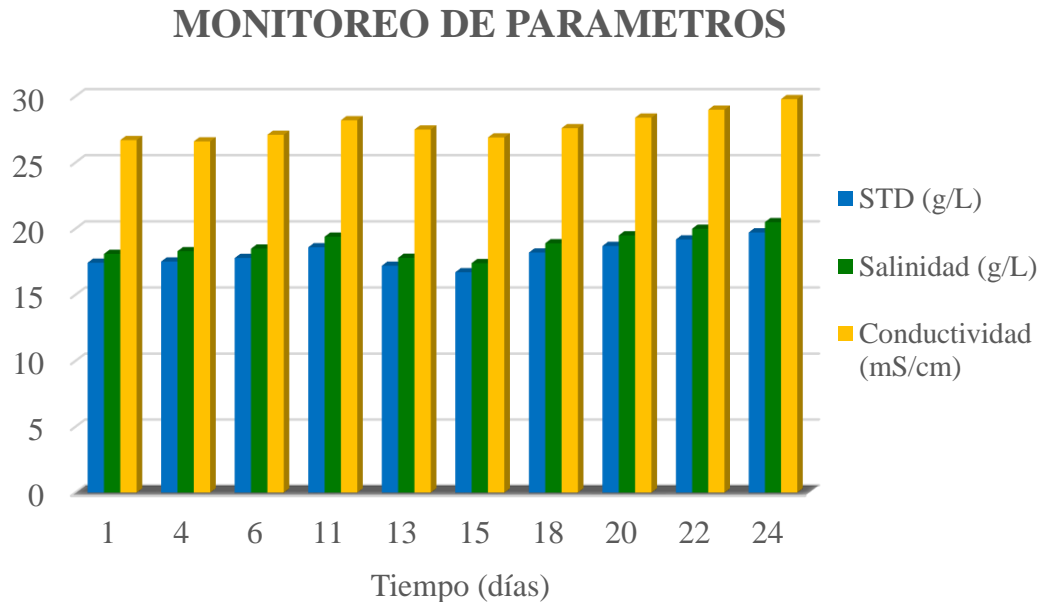


Figura 5. 3. Monitoreo de STD, Salinidad y Conductividad, en el licor mezclado.

Debido a que las bacterias halófilas son capaces de metabolizar sales, se esperaba lograr una reducción de sales en el medio, sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que no se logró un cambio significativo en los parámetros de Salinidad, Sólidos Totales Disueltos y Conductividad, en el licor mezclado. Por lo que se cree que las bacterias obtenidas al ser del tipo moderadas acumularon solutos compatibles, en este caso la dextrosa que era suministrada como fuente de carbono, para mantener un equilibrio osmótico y así poder sobrevivir en el medio. Y no acumularon iones inorgánicos en su citoplasma como se pensaba.

5.2. Cálculo de parámetros para las condiciones óptimas del sistema

Datos obtenidos experimentalmente:

$$V = 3 \text{ litros}$$

$$DQO = 1.38 \text{ g/L}$$

$$SSV = 3,700 \text{ mg/L} = 3.7 \text{ g/L}$$

$$SST = 4,600 \text{ mg/L} = 4.6 \text{ g/L}$$

$$SSed = 380 \text{ ml/L}$$

Tiempo de retención celular = 10 días

Índice Volumétrico de Lodos

Se calcula utilizando la Ecuación 7:

$$IVL = \frac{380}{4,600} * 1000 = 82.60$$

Purga diaria

Si se considera un tiempo de retención celular de 10 días

$$TRC = \frac{\text{Inventario}}{\text{Descarte}} = \frac{SSV * V}{\text{Purga} * SSV}$$

$$10 \text{ d} = \frac{\left(3700 \frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) (3 \text{ L})}{\text{Purga} * \left(3700 \frac{\text{mg}}{\text{L}}\right)}$$

$$\text{Purga} = \frac{3 \text{ L}}{10 \text{ d}} = 0.3 \text{ L/d}$$

Relación F/M

Para calcular la relación F/M se toman algunas consideraciones por ejemplo:

Se considera que la $DBO_5 = DQO$ (Debido a la alta biodegradabilidad del sustrato (dextrosa)).

Si 1 g/L de dextrosa aporta 1,067 mg DQO/L. Y las soluciones A y B aportan 1,240 mg DQO/L. Entonces la cantidad de DQO suministrada es:

$$DQO = (532.5 + 1,240) \frac{mg}{L} = 1,772.5 \frac{mg}{L} = 1.7725 \frac{g}{L}$$

Si se considera que DQO = DBO₅ tenemos:

Cantidad de alimento que entra al sistema:

$$F = \left(0.3 \frac{L}{d}\right) \left(1.7725 \frac{g DQO}{L}\right) \left(\frac{1 g DBO_5}{1 g DQO}\right) = 0.5317 \frac{g DBO_5}{d}$$

Microorganismos en el sistema:

$$M = (3 L) \left(3.7 \frac{g SSV}{L}\right) = 11.1 g SSV$$

$$\frac{F}{M} = \frac{0.5317 g DBO_5}{11.1 g SSV * d} = 0.0479 \frac{g DBO_5}{g SSV * d}$$

De acuerdo a la Tabla 8.16 del libro “Wastewater Engineering Treatment and Reuse” Metcalf and Eddy (Tchobanoglous et al.2003), pág.747, 4^{ta} Edición, para un Reactor Secuencial Batch, un valor típico para la relación alimento-microorganismo va de 0.04-0.10 g DBO/g SSV*d, por lo que el valor calculado de esta relación en el sistema es adecuada. Por lo que se trató de mantener el sistema en estas condiciones de operación.

5.3. Observación al microscopio de los microorganismos obtenidos.

Se toma una muestra (gota) del licor mezclado con ayuda de una pipeta Pasteur y se agrega a un portaobjetos, posteriormente se pone el cubreobjetos encima y se observa al microscopio.

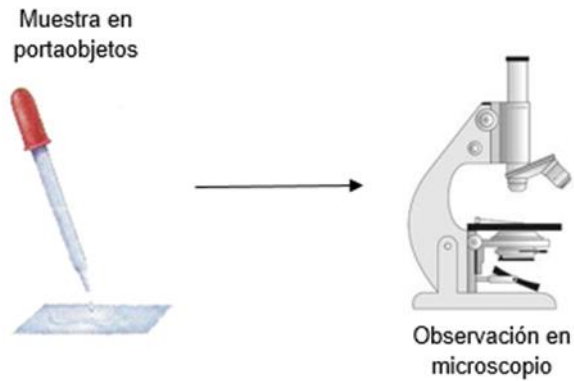


Figura 5. 4. Observación en microscopio

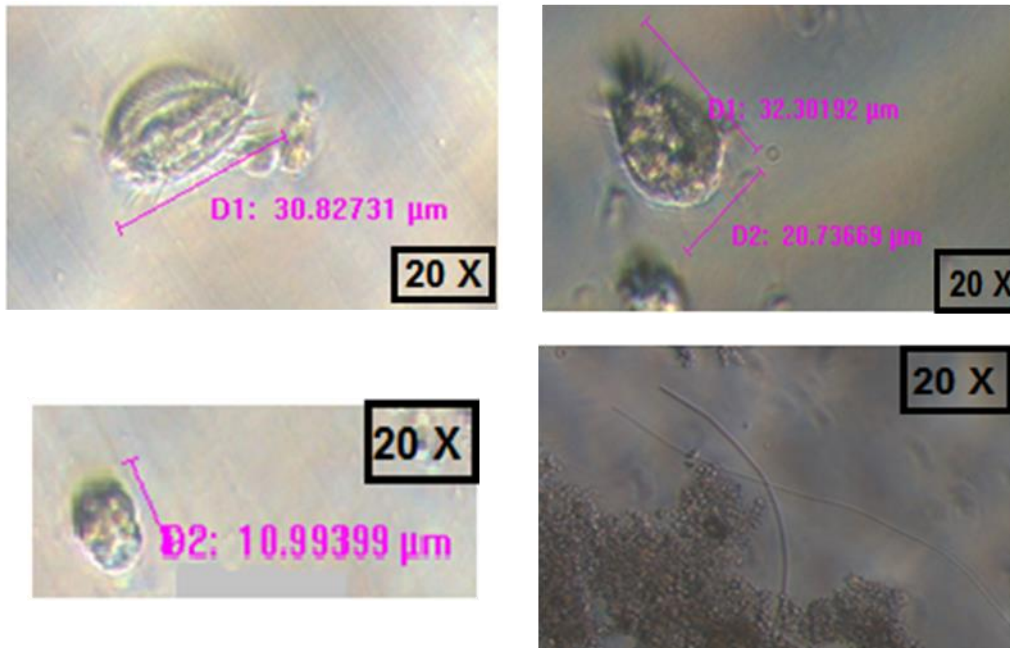


Figura 5. 5. Microorganismos en el licor mezclado observados en microscopio. Aumento 20 X.

Se encontraron tres tipos diferentes de microorganismos, los cuales soportaban concentraciones de hasta 20 % de NaCl. Por lo que se deduce que se trata de microorganismos halófilos moderados.

De acuerdo a bibliografía consultada los microorganismos observados en el microscopio se puede tratar de microorganismos *Euplotes Moebiusi* Kahl, 1932. (Isac et al, 2008).

Orden: Euplotida *Small y Lynn, 1985.*

Suborden: Euplotina *Small y Lynn, 1985.*

Familia: Euplotidae *Eherenberg, 1838.*

Género: *Euplotes.*

Especie: *Euplotes Moebiusi* Kahl, 1932.

Este microorganismo habita en ambientes marinos, es de cuerpo aplanado dorsoventralmente. Campo peristomático y zona adoral de membranelas a veces cercanas a la zona de cirros transversos. Por lo general es buen bioindicador, asociado a efluentes de buena calidad. (Isac et al, 2008).

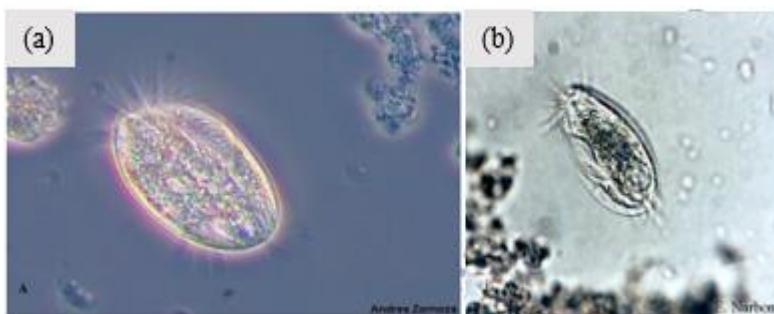


Figura 5. 6. Microorganismos *Euplotes Moebiusi*. a) 400 X, contraste de fases. In vivo. b) 400 X, campo claro. In vivo.

5.4. Siembra de microorganismos existentes en el licor mezclado.

Del cultivo que se realizó en las placas de petri, se observó que solo hubo crecimiento en las concentraciones del 5 al 20% de NaCl, por lo que de acuerdo a bibliografía consultada se trata de microorganismos halófilos moderados.

En los cultivos que se hicieron al 25 y 30% de NaCl, no se observó crecimiento de microorganismos. De la tinción Gram se observó que se tienen cocos y bacilos, del tipo gram positivos y negativos.

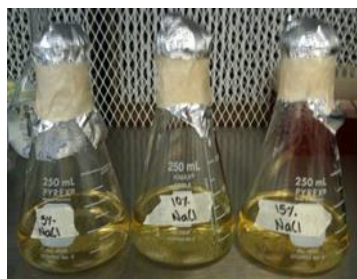


Figura 5. 7. Agar Standard.



Figura 5. 8. Cultivo en placas petri.

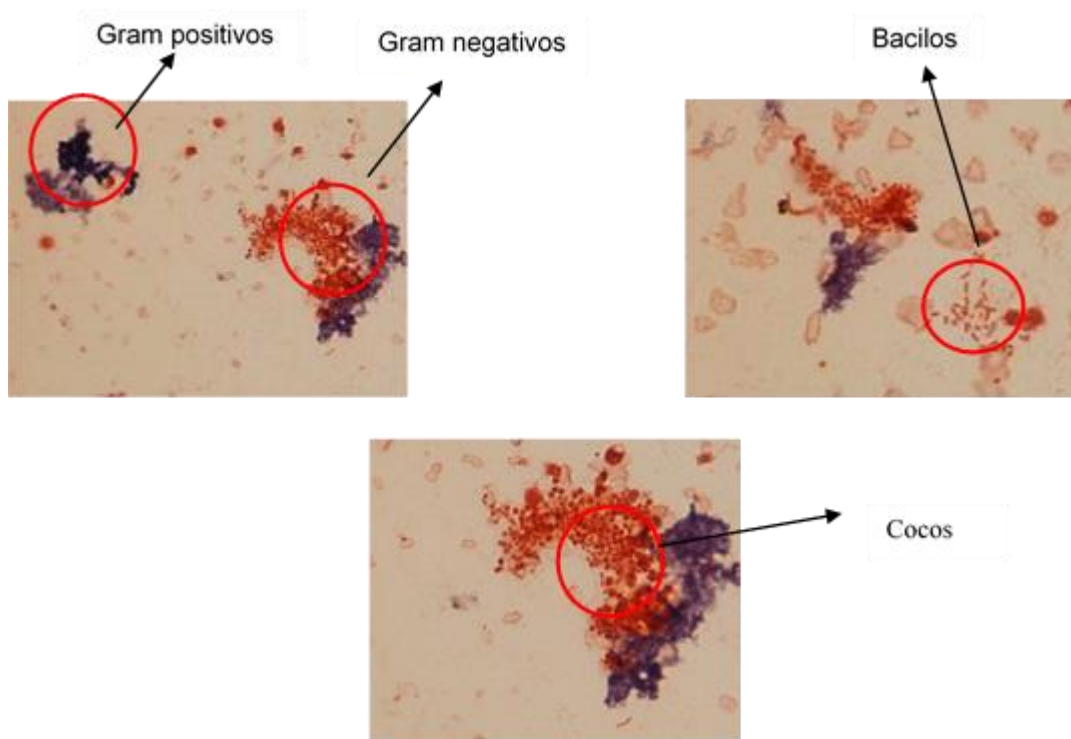


Figura 5. 9. Tinción gram de microorganismos en el licor mezclado.

5.4.1. Pruebas bioquímicas de los microorganismos en el licor mezclado.

Se tomó una alícuota del licor mezclado y se realizó un tratamiento de pre-enriquecimiento con agua peptonada y se incubó a 35 °C durante 48 horas. Después del pre-enriquecimiento se realizó una siembra en Agar Sal y Manitol.



Figura 5. 10. Muestra de microorganismos en el licor mezclado.

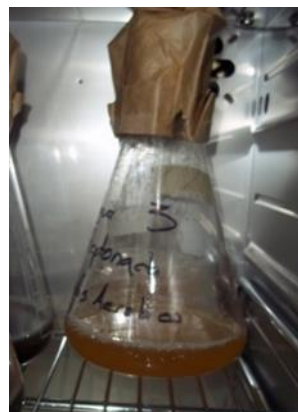


Figura 5. 11. Pre-enriquecimiento de microorganismos en agua peptonada.



Figura 5. 12. Caja de Agar Sal y Manitol antes de la incubación.

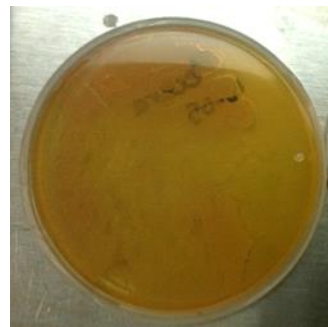


Figura 5. 13. Caja de Agar Sal y Manitol después de la incubación.

De las cajas sembradas en Agar Sal y Manitol se obtuvo un amplio crecimiento de microorganismos por lo que se supuso se trataba de una posible contaminación en el medio, obteniéndose una capa de microorganismos posiblemente del género *Proteus* y no se pudo aislar una colonia en específico, por lo que se optó por resembrar en cajas con Agar Mac Conkey con 10 ppm de NaCl, y otras sin sal, esto para inhibir su crecimiento.

Se obtuvo una nueva capa de *Proteus* en las cajas con sal, mientras que en las cajas que no contenían sal no se observó crecimiento de *Proteus*.

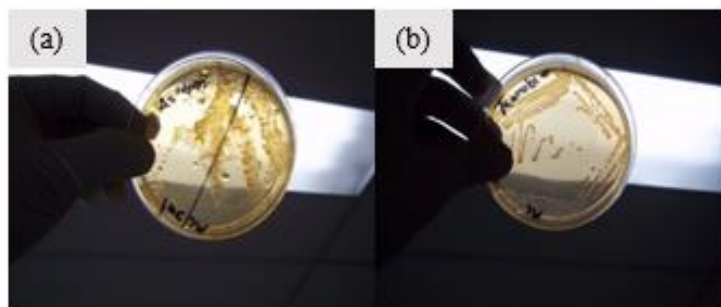


Figura 5. 14. Cultivo en placas de microorganismos. a) Agar Mc Conkey con 10 ppm de NaCl. b) Agar Mc Conkey sin NaCl.

Se lograron aislar 3 diferentes colonias las cuales fueron nombradas como 1A, 2A y 3A. De las cuales se realizaron pruebas bioquímicas para su caracterización. Obteniéndose así los resultados mostrados en la Tabla 5.1.

Tabla 5. 1. Resultados de las pruebas bioquímicas colonias 1A, 2A, y 3A.

COLONIA	Tinción Gram	Catalasa	Citrato	BAB	MIO			SIM			LIA			TSI				
					Movil	Indol	Ornitina	Sufuro	Indol	Movil	Lisina	Gas	H ₂ S	Color	Lactosa	Glucosa	Gas	H ₂ S
1A	Cocobacilos (-)	+	+	+	+	-	+	-	-	+	K/A	+	-	A/A	+	+	-	+
2A	Cocobacilos (-)	-	-	+	+	-	+	+	-	+	K/A	-	-	A/A	+	+	+	-
3A	Cocobacilos (-)	-	-	+	+	-	+	-	-	+	K/A	+	-	A/A	+	+	+	-

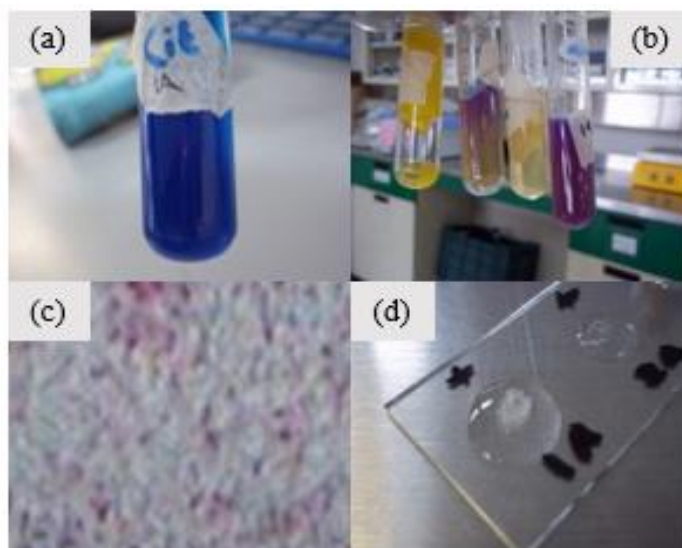


Figura 5. 15. Pruebas bioquímicas colonia 1A. a) Prueba del citrato. b) Pruebas bioquímicas. c) Tinción gram. d) Prueba de la catalasa.

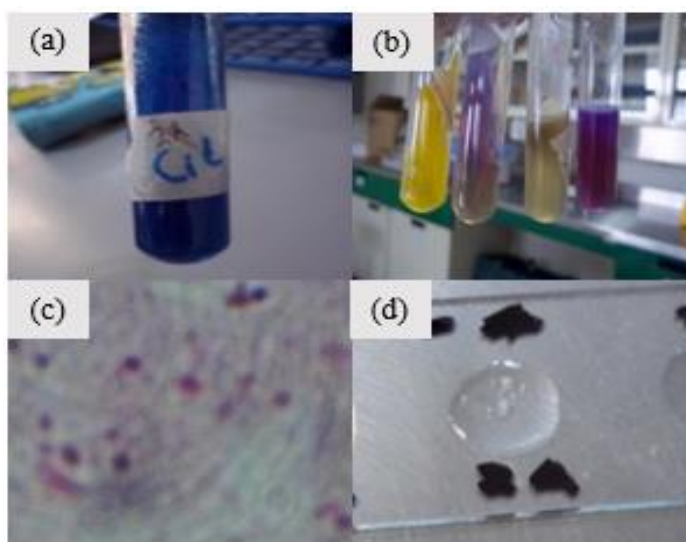


Figura 5. 16. Pruebas bioquímicas colonia 2A. a) Prueba del citrato. b) Pruebas bioquímicas. c) Tinción gram. d) Prueba de la catalasa.

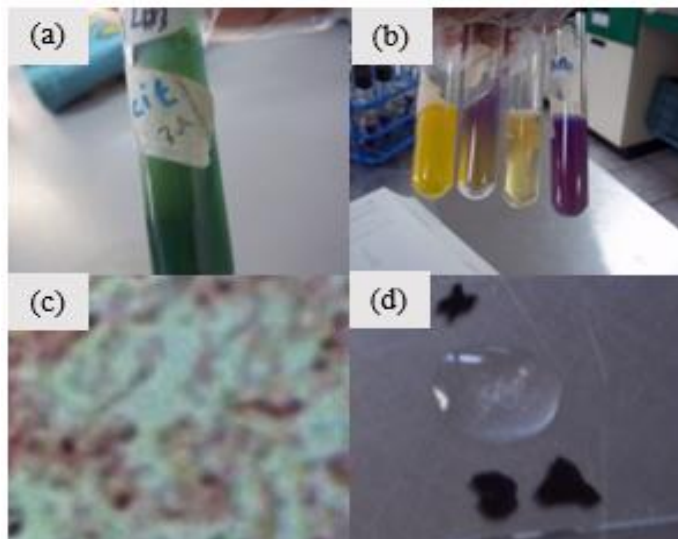


Figura 5. 17. Pruebas bioquímicas colonia 3A. a) Prueba del citrato. b) Pruebas bioquímicas. c) Tinción gram. d) Prueba de la catalasa.

Como resultado de la identificación tenemos que la colonia 1A, pertenece a la familia de las *Vibrio* spp, mientras que las colonias 2A y 3A a la familia de *Proteus* spp. Debido a que las bacterias cultivadas crecieron en medios con presencia de sales (5-20 % de NaCl), se puede decir que se tienen microorganismos halófilos moderados, sin llegar a ser del tipo extremo.

5.5. Pruebas utilizando agua residual como fuente de carbono

Se monitoreo el carbono orgánico total (COT) y los sólidos totales volátiles (STV), para las dos relaciones de sustrato-microorganismo utilizadas, las Figuras 5.18 y 5.19 muestran los resultados obtenidos de acuerdo a la metodología expuesta en las secciones 4.3.2 y 4.3.9.

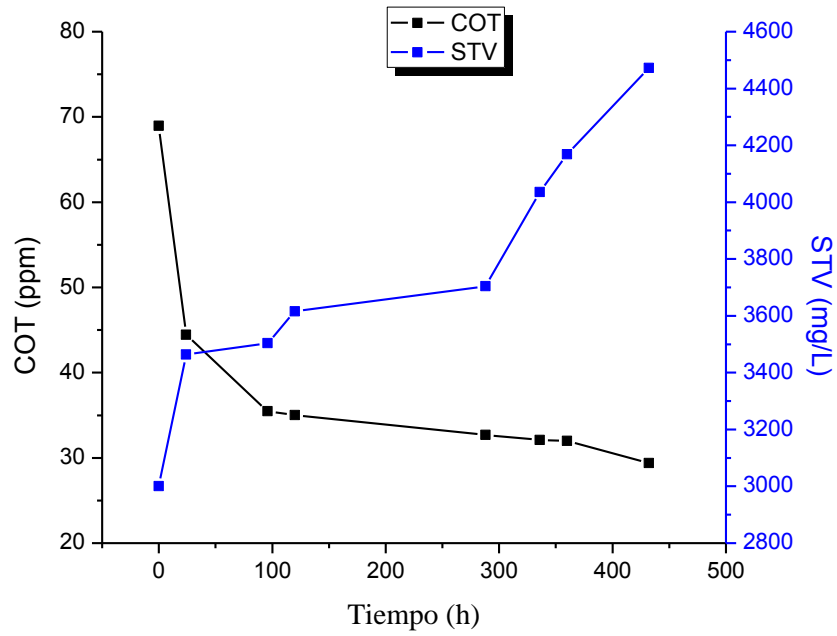


Figura 5. 18. Efecto del COT y STV conforme al tiempo para una $S_0/X_0 = 0.023$ mg/mg

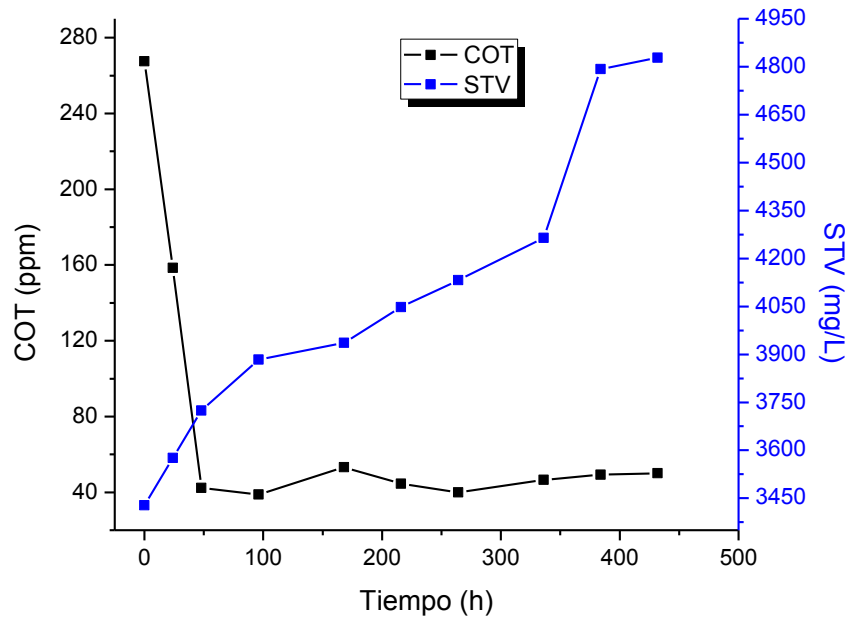


Figura 5. 19. Efecto del COT y STV conforme al tiempo para una $S_0/X_0 = 0.078$ mg/mg

Las Figuras 5.18 y 5.19 muestran la tendencia del COT y los STV en el tiempo para las dos relaciones de S_0/X_0 utilizadas, notándose que en ambas pruebas la máxima reducción de carbono orgánico se dio en las primeras horas de llevarse a cabo el experimento, siendo está a las 96 horas, sin embargo para la relación de 0.023 siguió decreciendo ligeramente conforme pasó más tiempo, obteniéndose la máxima reducción a las 432 hr, y un aumento en STV de 49.06% en el mismo tiempo. Mientras que para la relación de 0.078 se obtuvo una máxima reducción del 85.49 % de COT en un tiempo de 96 horas, y se logró un aumento de STV de 40.84 %, en un tiempo de 432 horas, a pesar de que el aumento de biomasa fue poco, se dedujo que las bacterias pudieron sobrevivir a las condiciones de salinidad y para el caso en el que se utilizó una mayor relación S_0/X_0 se logró reducir casi en un 85.49% la materia orgánica y en un tiempo de 96 horas.

La Figura 5.20 nos muestra una comparación del aumento de STV para las dos relaciones S_0/X_0 utilizadas, en la cual se puede observar que el mayor aumento se dio utilizando una relación más baja, cabe señalar que las muestras de agua residual con las que se trabajó se tomaron en diferente día, por lo que la diversidad de microorganismos presentes en estas aguas era diferente.

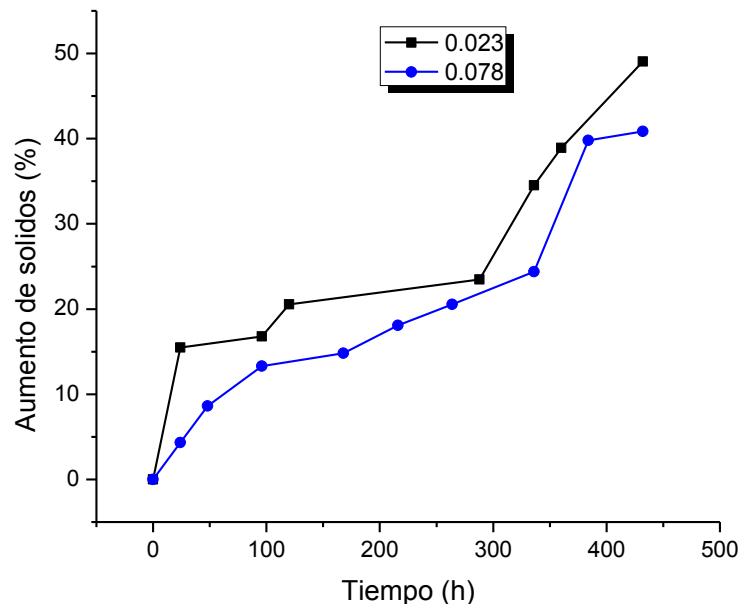


Figura 5. 20. Aumento de STV a diferentes relaciones S_0/X_0 (mg COT/ mg STV).

La Figura 5.21 nos muestra una comparación de la reducción de COT obtenida para las dos relaciones de sustrato-microorganismo empleadas, observándose que las tendencias fueron muy similares, al tener una mayor reducción en las primeras 96 horas para ambos casos y después de este tiempo la reducción permanece casi constante, sin embargo se obtuvo una mayor reducción utilizando una $S_0/X_0 = 0.078$ mg de COT/mg de STV en un menor tiempo, esto se pudo deber a la cantidad inicial de microorganismos fue mayor.

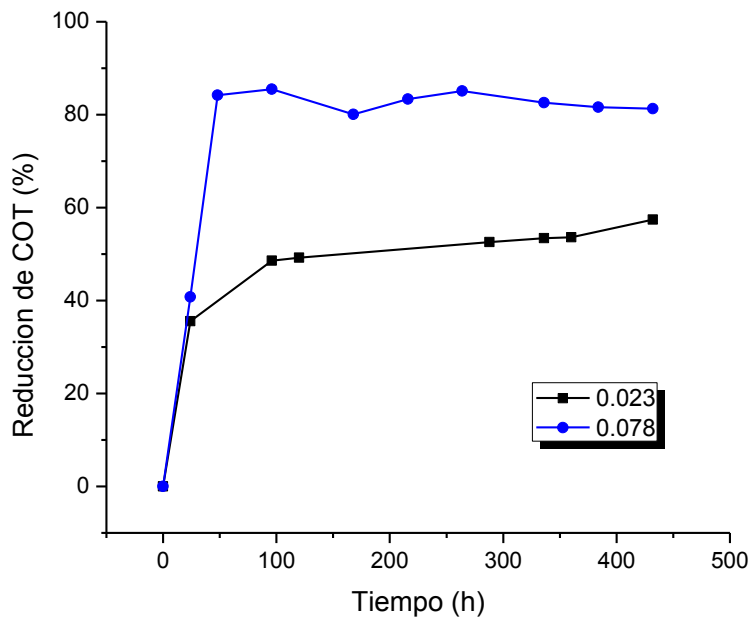


Figura 5. 21. Reducción de COT a diferentes relaciones S_0/X_0 (mg COT/ mg STV).

La Tabla 5.2 nos muestra los resultados obtenidos para las pruebas en las que se agregó agua residual como única fuente de carbono comparándose las dos relaciones sustrato-microorganismo utilizadas.

Tabla 5. 2. Resultados de las pruebas utilizando agua residual como única fuente de carbono, para diferentes relaciones sustrato/microorganismos.

Relación S_0/X_0 (mg COT/mg STV)	Reducción de COT (%)	Tiempo (h)	Aumento de STV (%)	Tiempo (h)
0.023	57.39	432	49.06	432
0.078	85.48	96	40.84	432

Con la finalidad de conocer la capacidad de las bacterias frente a la salinidad y observar si se logra una posible reducción en la cantidad de sales presentes, se realizan mediciones de conductividad, salinidad y sólidos totales disueltos en el sistema, de acuerdo a la sección 4.3.1. Así como de pH para conocer su efecto durante el proceso. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en las Figuras 5.22 y 5.23.

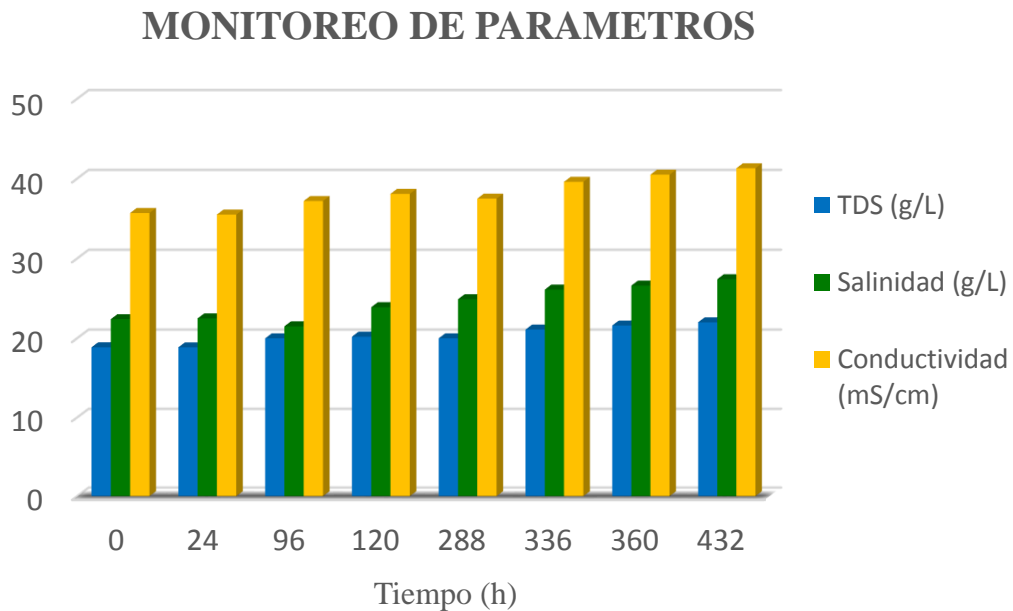


Figura 5. 22. Resultados de pH, STD, Salinidad y Conductividad conforme al tiempo, para la relación $S_0/X_0 = 0.023$ mg/mg.

MONITOREO DE PARAMETROS

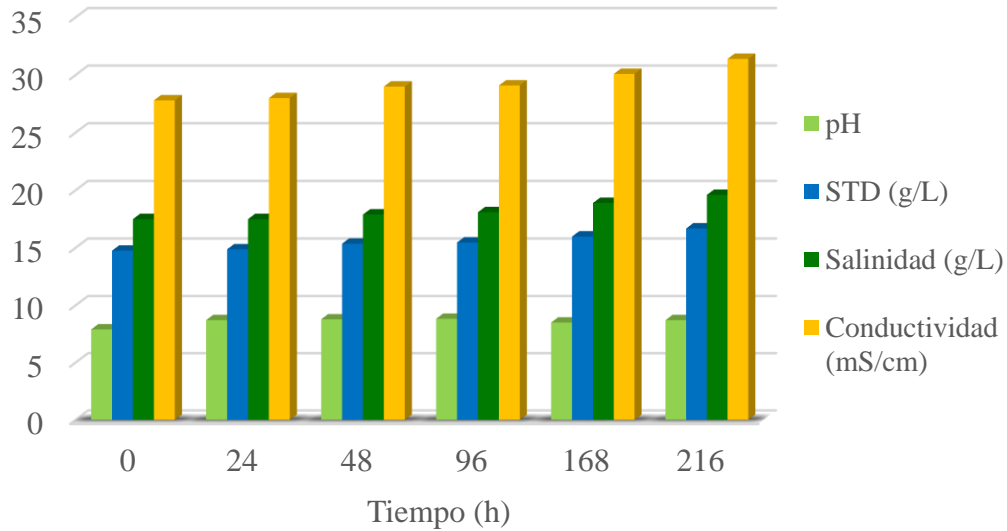


Figura 5. 23. Resultados de pH, STD, Salinidad y Conductividad conforme al tiempo, para la relación $S_0/X_0 = 0.078$ mg/mg.

De acuerdo a las Figuras 5.22 y 5.23 se puede observar que no se logró una reducción significativa en ninguno de los parámetros medidos, en especial los resultados de salinidad que es de nuestro interés, lo cual se puede atribuir a que los microorganismos que se lograron obtener, mantuvieron concentraciones intracelulares de sal equivalente a la concentración externa de sal (en el medio), es decir se logró un equilibrio entre la concentración de sal en el interior y en el exterior de la célula, sin embargo pudieron sobrevivir a ambientes con altas concentraciones de sal. Los resultados de conductividad y salinidad mostraron un ligero aumento lo que se le atribuye a la evaporación de la muestra y a la pérdida de volumen para la obtención de los resultados de STV, por lo que se puede considerar que se mantienen constantes conforme al tiempo.

5.6. Degradación de Fenol en agua residual salina.

Con la finalidad de probar la capacidad degradadora de compuestos orgánicos de las bacterias halotolerantes, se analizaron los datos experimentales obtenidos a partir de la metodología descrita en las secciones 4.3.2 y 4.5.2. Se utilizaron tres diferentes concentraciones de Fenol, siendo estas de 21.17, 51.33 y 82.76 ppm. Por lo que se tienen los siguientes resultados:

Espectros UV-Visible

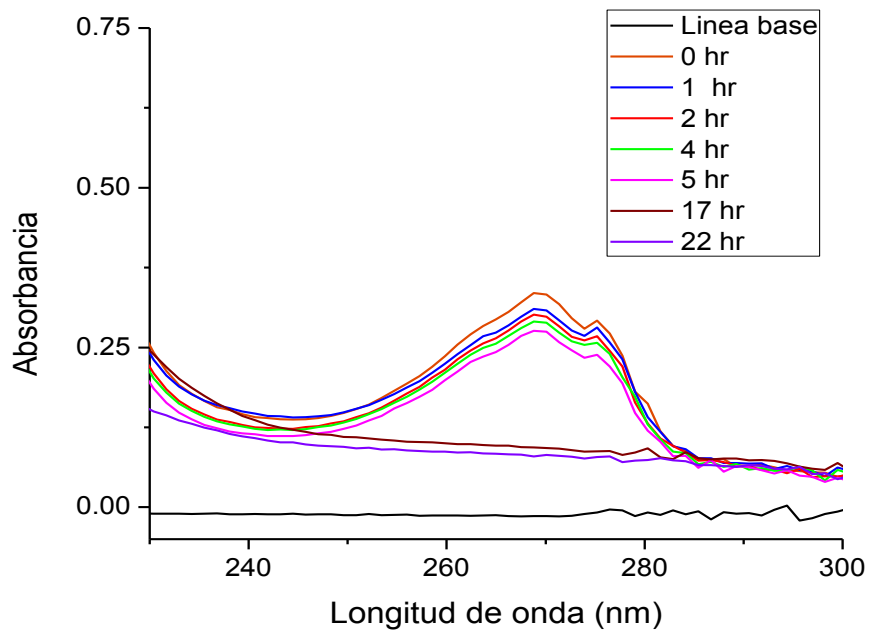


Figura 5. 24. Espectro UV-Visible para una concentración de 21.17 ppm de Fenol.

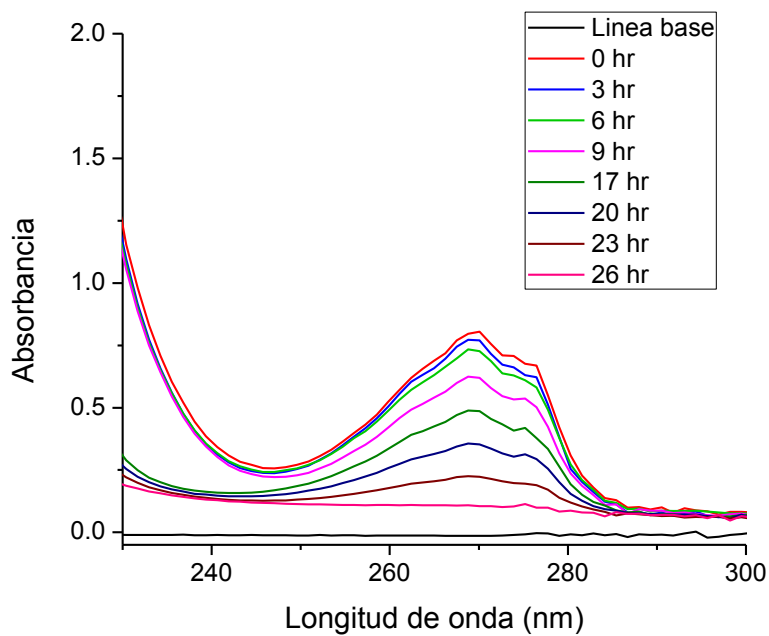


Figura 5. 25. Espectro UV-Visible para una concentración de 51.33 ppm de Fenol.

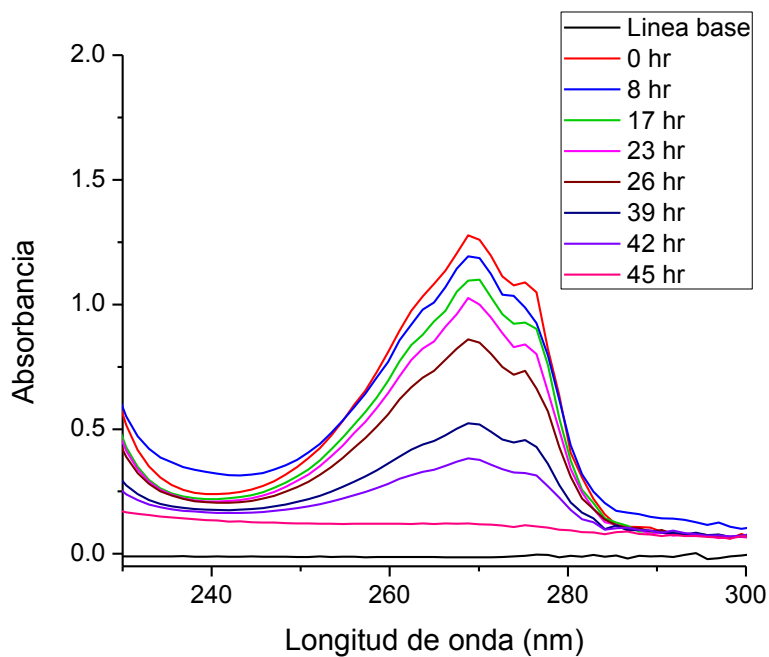


Figura 5. 26. Espectro UV-Visible para una concentración de 82.76 ppm de Fenol.

Para cada experimento que se realizó se calculó la concentración en el tiempo, aplicando la Ecuación 1, tomando la absorbancia arrojada por el equipo, a una longitud de onda de 268.792 nm, los resultados obtenidos se encuentran en el Anexo 3. La Tabla 5.3 nos muestra un resumen de los resultados de las tres concentraciones, así como el porcentaje máximo de biodegradación que se alcanzó.

Tabla 5. 3. Resultados de las pruebas de biodegradación de Fenol.

CONCENTRACIÓN INICIAL (ppm)	CONCENTRACIÓN FINAL (ppm)	TRH (h)	BIODEGRADACIÓN (%)
21.17	4.46	22	78.89
51.33	6.4	26	87.52
82.77	7.26	45	91.22

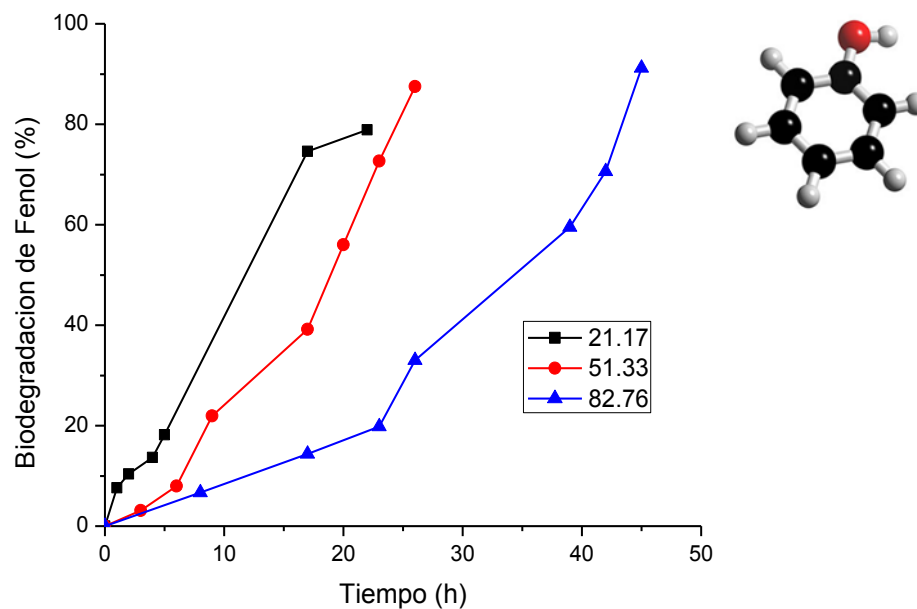


Figura 5. 27. Biodegradación de fenol a diferentes concentraciones.

En la Figura 5.27 podemos observar que a mayor concentración inicial de fenol se requirió de mayor tiempo para lograr una máxima biodegradación, lo cual se puede atribuir a que las bacterias necesitan más tiempo de adaptación a concentraciones mayores de este contaminante. Sin embargo se lograron muy buenos porcentajes de remoción para las tres concentraciones con las que se trabajó.

Los resultados del blanco fueron favorables, ya que no se obtuvo disminución en la concentración, por lo que la degradación obtenida en las tres pruebas se le atribuye a los microorganismos. Las Figuras de los espectros UV-Visible, se encuentran en el Anexo 3.

Resultados de Sólidos Totales Volátiles

Se calcularon los Sólidos Totales Volátiles de acuerdo a la sección 4.3.2, y se graficaron los resultados junto a la concentración de Fenol con respecto al tiempo.

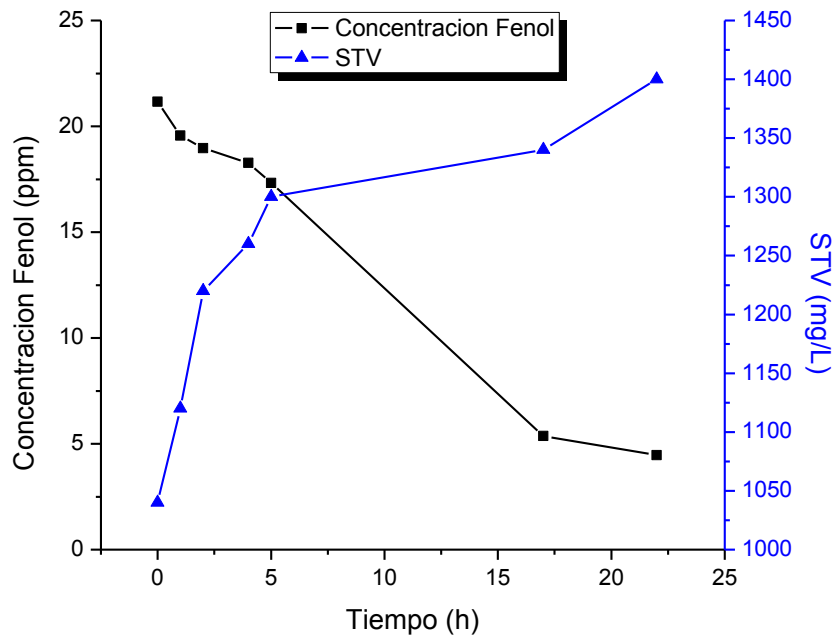


Figura 5. 28. Grafica de Tiempo vs Concentración de Fenol y STV para una concentración inicial de 21.17 ppm.

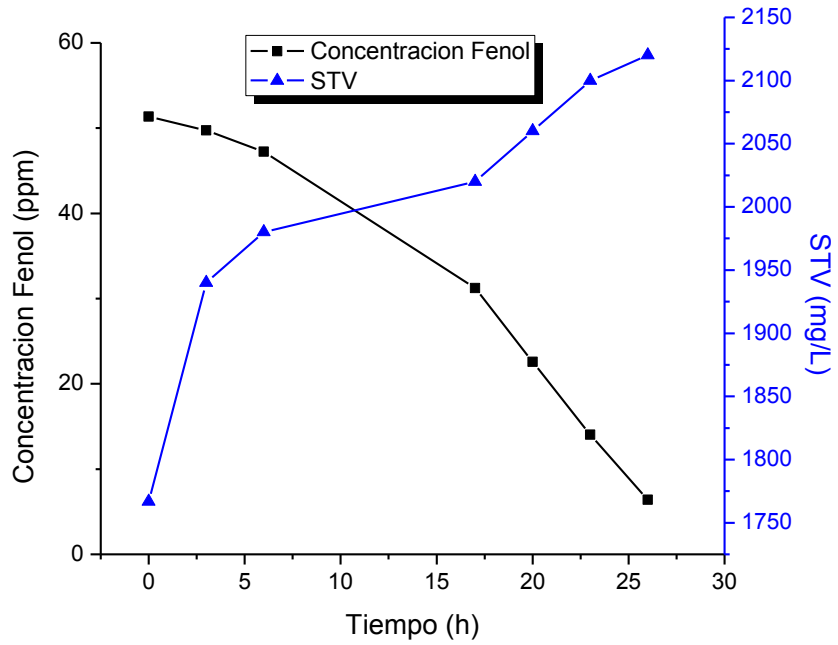


Figura 5. 29. Grafica de Tiempo vs Concentración de Fenol y STV para una concentración inicial de 51.33 ppm.

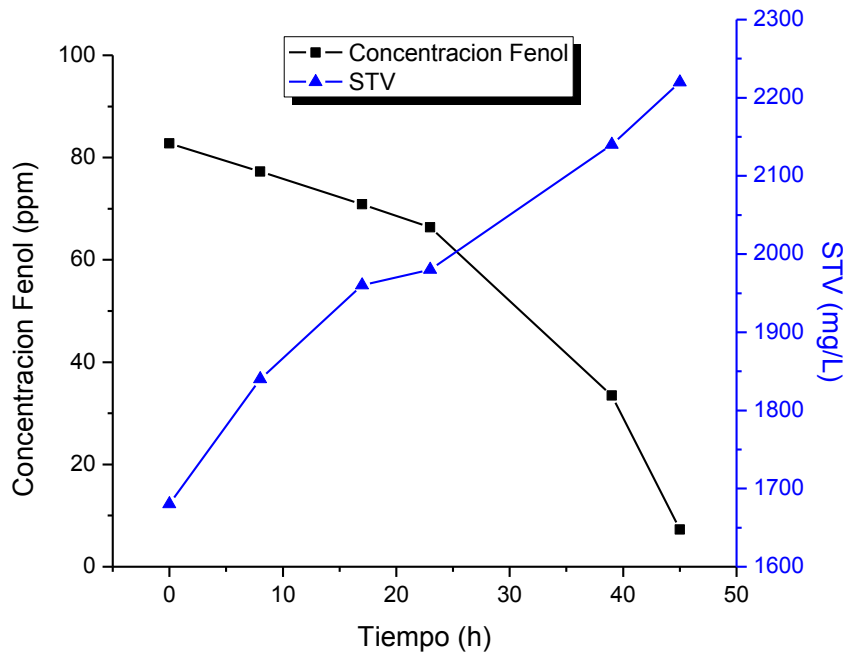


Figura 5. 30. Grafica de Tiempo vs Concentración de Fenol y STV para una concentración inicial de 82.76 ppm.

- Para una concentración inicial de 21.17 ppm de Fenol, se alcanzó una máxima reducción del 78.89 %. Y un máximo crecimiento de Sólidos Volátiles Totales del 34.61 %. En un tiempo de 22 horas.
- Con una concentración inicial de 51.33 ppm de Fenol, se alcanzó una máxima reducción de Fenol del 87.52 %. Y un máximo crecimiento de Sólidos Volátiles Totales del 20 %. En un tiempo de 26 horas.
- La máxima reducción obtenida para la concentración de 82.76 ppm fue del 91.21 %. Así como un aumento de Sólidos Totales Volátiles del 32.14 %. En un tiempo de 45 horas.

A pesar de que el incremento de Sólidos Totales Volátiles fue poco en cada una de las tres concentraciones con las que se trabajó, se obtuvieron buenos porcentajes de biodegradación de Fenol.

Cálculo de los órdenes de reacción

Con los datos de degradación de Fenol, se calculó el orden de reacción para cada una de las concentraciones, obteniéndose las siguientes gráficas:

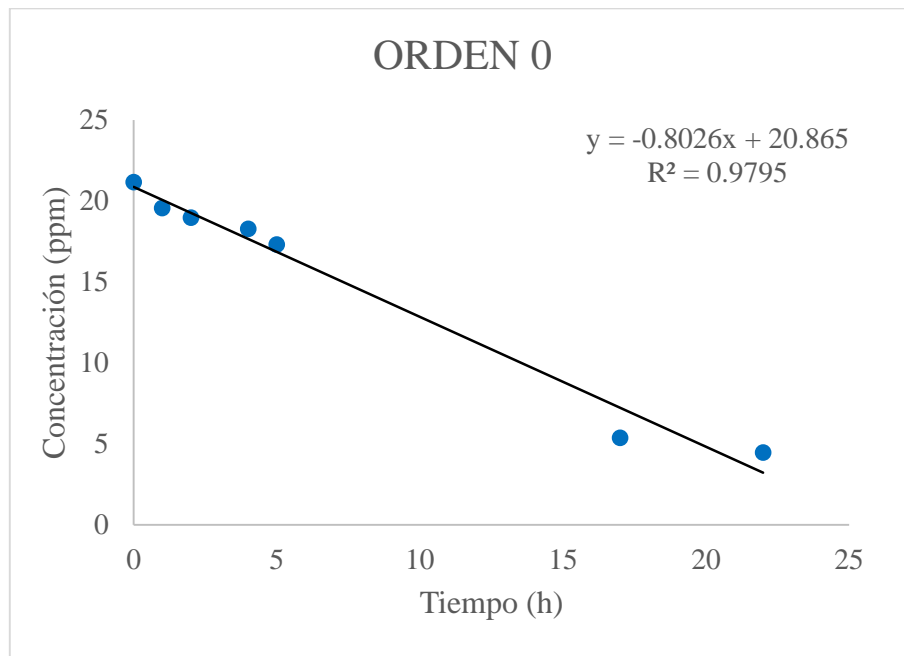


Figura 5. 31. Orden de reacción, para una concentración inicial de 21.17 ppm de Fenol.

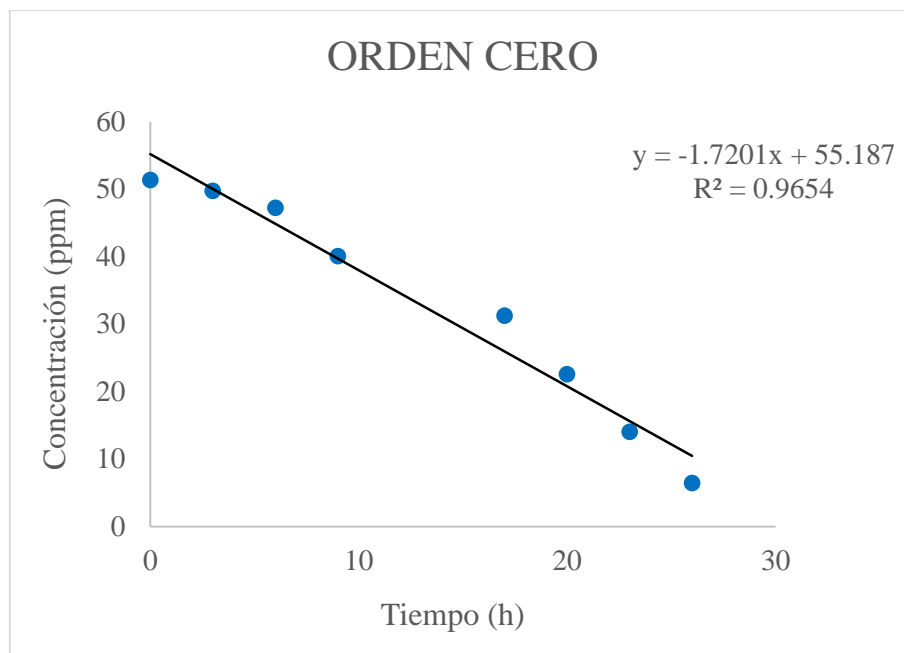


Figura 5. 32. Orden de reacción, para una concentración inicial de 51.33 ppm.

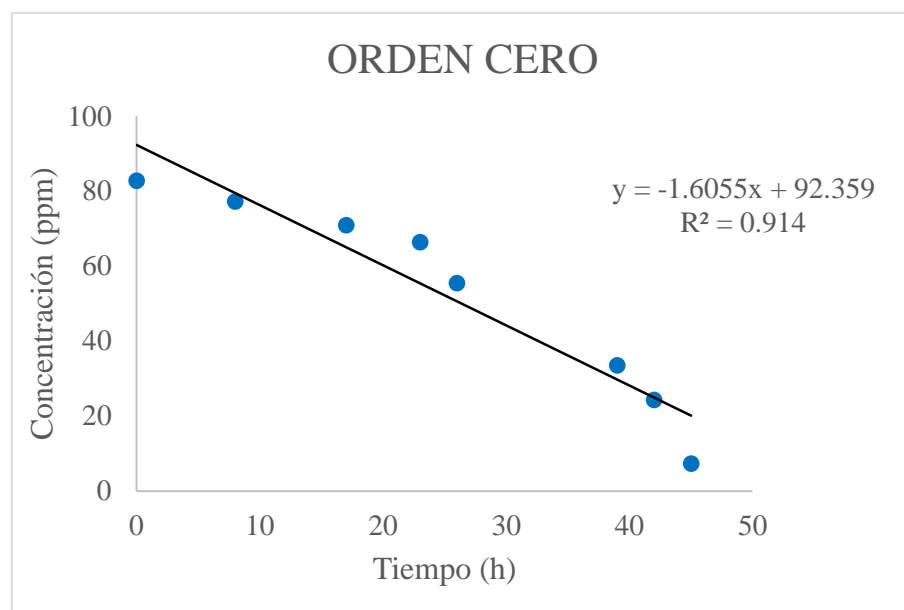


Figura 5. 33. Orden de reacción, concentración inicial de 82.76 ppm Fenol.

Tabla 5. 4. Resultados de orden de reacción, R^2 , y k , a diferentes concentraciones de Fenol.

RESULTADO	CONCENTRACIÓN INICIAL (ppm)		
	21.17	51.33	82.76
Orden de reacción n	0	0	0
Coefficiente de correlación R^2	0.9795	0.9654	0.914
Constante cinética k $\text{ppm}^* \text{h}^{-1}$	0.8026	1.7201	1.6055

El orden de reacción para las tres concentraciones con las que se trabajó resultó ser igual a cero, por lo se deduce que la velocidad de reacción es independiente de la concentración del reactivo.

5.7. Efecto de la aplicación de corriente directa sobre un proceso biológico con agua salina.

Se decide aplicar pequeñas cantidades de corriente sobre las bacterias, con la finalidad de acelerar su crecimiento. Para lo cual se realiza un diseño de experimentos tipo Taguchi L9.

La Tabla 5.5 nos muestra los resultados obtenidos para las tres réplicas, conforme al diseño arrojado por el software Minitab 16.

Tabla 5. 5. Resultados experimentales del aumento de biomasa aplicando corriente.

Corrida	Tiempo (hr)	Corriente (mA)	Concentración de NaCl (g/L)	Concentración de carbono (ppm)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
1	8	0	10	0	7.69	5.26	5.26
2	8	2	20	500	24.14	16.19	22.03
3	8	4	30	1000	72.97	68.75	65.38
4	16	0	20	1000	6.78	9.84	11.29
5	16	2	30	0	13.94	16.67	16.67
6	16	4	10	500	34.21	38.14	36.84
7	24	0	30	500	10.42	8.51	12.24
8	24	2	10	1000	45.27	26.29	20.37
9	24	4	20	0	40	30.98	33.72

5.7.1. Análisis del diseño de experimentos.

a) Gráficas.

Se obtuvo una gráfica de efectos principales mediante el software Minitab 16, en la cual se toman en cuenta la relación señal-ruido para el tipo mayor es mejor. De la figura 3.34 se deduce que las condiciones óptimas del proceso se encuentran utilizando un tiempo de 24 horas, una corriente de 4 mA, una concentración de NaCl de 30 g/L y una concentración de carbono de 1000 ppm. Se realizaron gráficas de superficie obtenidas con el Software Statistica 7, en las cuales se obtuvieron los mismos resultados.

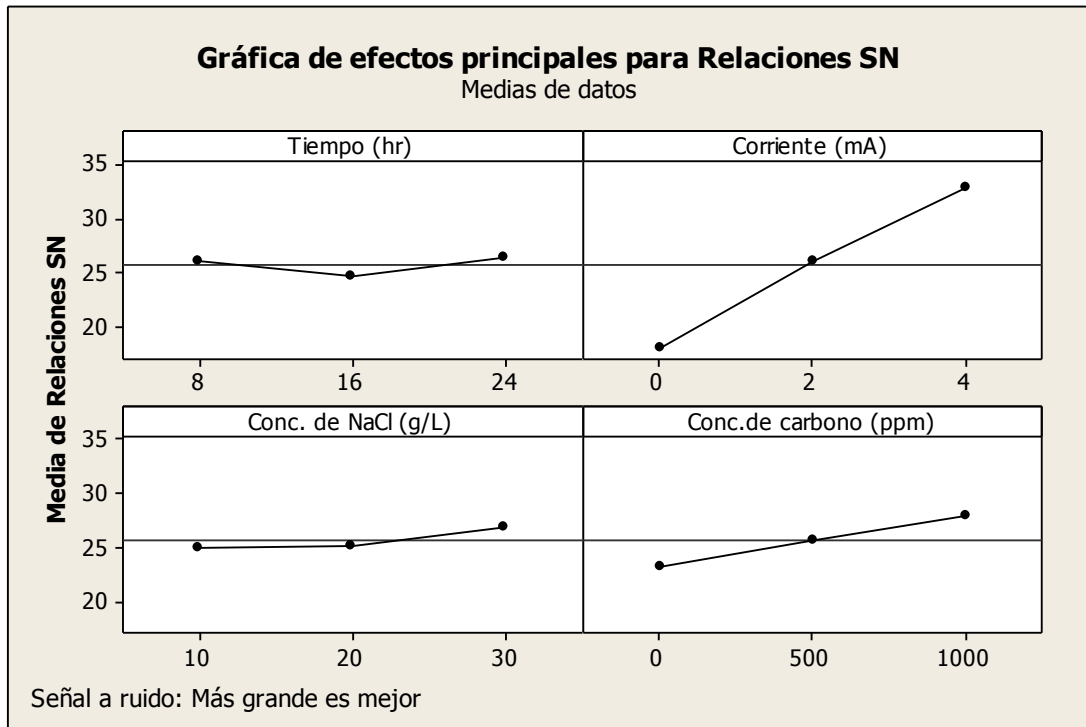


Figura 5. 34. Gráfica de efectos principales para relaciones señal-ruido (más grande es mejor).

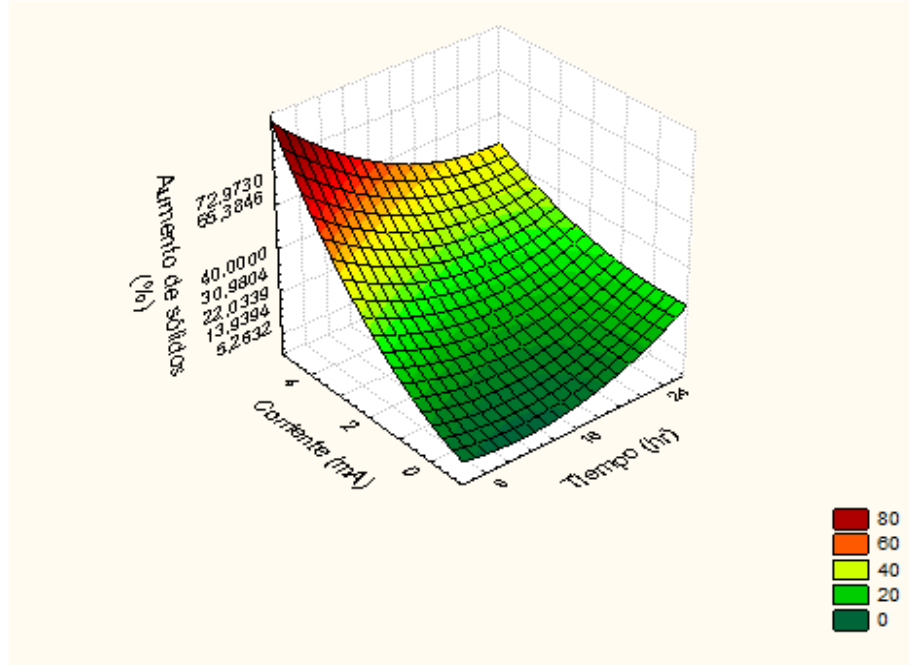


Figura 5. 35. Gráfica de superficie tiempo vs corriente, factor de respuesta aumento de sólidos.

En la Figura 5.35 se puede observar que al aplicar la mayor cantidad de corriente (4 mA) y a un tiempo de 8 horas, se pudo alcanzar un mayor aumento en los Sólidos Suspendidos Volátiles.

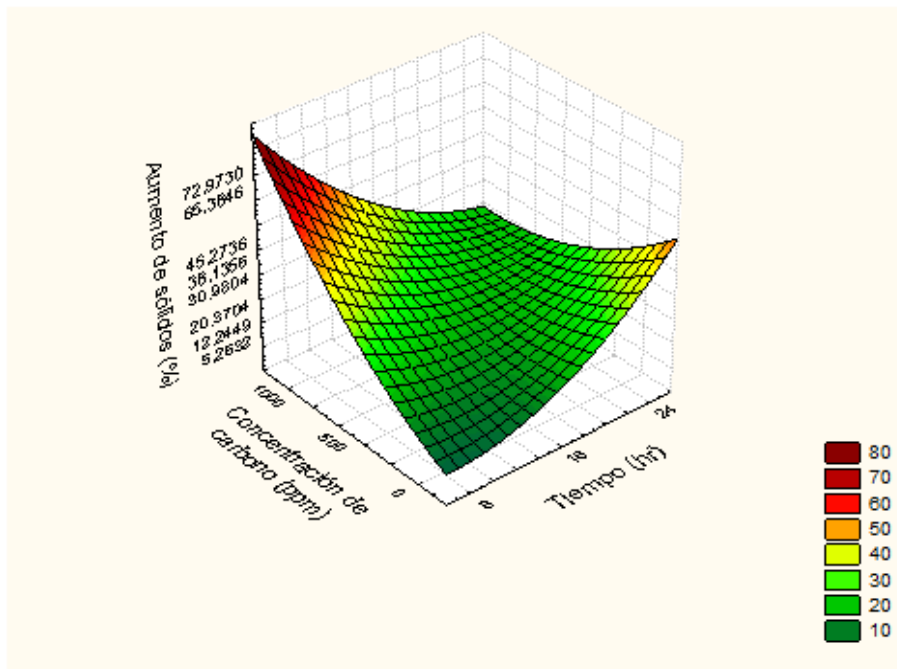


Figura 5. 36. Gráfica de superficie tiempo vs concentración de carbono, factor de respuesta aumento de sólidos.

En la Figura 5.36 se puede observar que el mayor aumento de Sólidos se da con una concentración de carbono de 1000 ppm y en un tiempo de 8 horas.

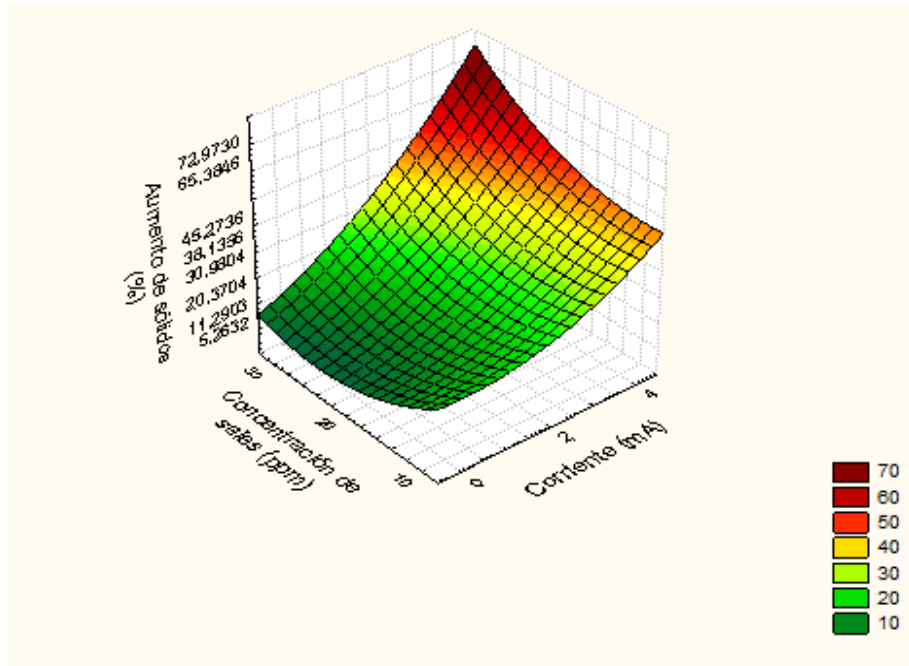


Figura 5. 37. Gráfica de superficie concentración de sales vs corriente, factor de respuesta aumento de sólidos.

De la Figura 5.37 se deduce que al aplicar una corriente de 4 mA y una concentración de NaCl de 30 g/L, se obtiene un mayor aumento de SSV.

Coefficiente de correlación

En la Tabla 5.6 nos muestra los coeficientes de correlación calculados mediante Excel en la cual podemos observar que el tiempo (h) es inversamente proporcional al aumento de SSV, lo que significa que el tiempo con el cual se trabajó no afecta de manera significativa en el aumento de sólidos.

En el caso de la corriente se puede observar un valor muy cercano a 1, lo cual nos indica que la corriente es directamente proporcional al aumento de SSV, por lo que podemos deducir que la corriente afecta al aumento de sólidos. Comprobándose los resultados obtenidos de las gráficas anteriores.

Tabla 5. 6. Coeficiente de correlación para el diseño Taguchi L9.

	Tiempo (h)	Corriente (mA)	Concentración sales (g/l)	Concentración carbono (ppm)	Δ SSV (%)
Tiempo (h)	1				
Corriente (mA)	0	1			
Concentración sales (g/L)	0	0	1		
Concentración carbono (ppm)	0	0	0	1	
Δ SSV (%)	-0.14247186	0.817654507	0.15752716	0.372913794	1

b) Análisis de varianza (ANOVA)

Debido a que se desea aumentar la cantidad de biomasa, utilizando la ecuación 12 se calcula la relación señal-ruido, quedando la siguiente tabla:

Tabla 5. 7. Resultados de la relación señal-ruido.

Tiempo (hr)	Corriente (mA)	Conc. de NaCl (g/L)	Conc. de carbono (ppm)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Relación S/N			S/N Promedio
							Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	
8	0	10	0	7.69	5.26	5.26	21.99	21.02	21.72	21.58
8	2	20	500	24.14	16.19	22.03	23.01	23.60	25.15	23.92
8	4	30	1000	72.97	68.75	65.38	22.62	23.52	24.95	23.70
16	0	20	1000	6.78	9.84	11.29	21.97	22.88	24.33	23.06
16	2	30	0	13.94	16.67	16.67	24.86	23.85	25.44	24.72
16	4	10	500	34.21	38.14	36.84	25.54	23.72	25.73	24.99
24	0	30	500	10.42	8.51	12.24	24.63	22.65	24.79	24.02
24	2	10	1000	45.27	26.29	20.37	32.55	29.05	27.84	29.81
24	4	20	0	40	30.98	33.72	32.04	29.82	30.56	30.81

Para realizar el ANOVA se utiliza la relación S/N promedio

Primero se calcula el factor de corrección utilizando la ecuación 15:

$$CF = \frac{(21.58 + 23.92 + 23.70 + \dots + 30.81)^2}{9} = 5706$$

Suma de cuadrados totales:

$$S_T = 21.58^2 + 23.92^2 + 23.70^2 + \dots + 30.81^2 - 5706 = 76$$

Para la suma de cuadrados de los factores primero se calculan los valores de A_1 , A_2 y A_3 , y así utilizarlos en las ecuaciones 16, 17, 18 y 19, quedando de la siguiente forma:

$$A_1 = 21.58 + 23.92 + 23.70 = 69.20$$

$$A_2 = 23.06 + 24.72 + 24.99 = 72.77$$

$$A_3 = 24.02 + 29.81 + 30.81 = 84.64$$

Suma de cuadrados de A

$$S_A = \frac{69.20^2 + 72.77^2 + 84.64^2}{3} - 5706 = 43.58$$

Para el factor B

$$B_1 = 21.58 + 23.06 + 24.02 = 68.66$$

$$B_2 = 23.92 + 24.72 + 29.81 = 78.45$$

$$B_3 = 23.70 + 24.99 + 30.81 = 79.50$$

$$S_B = \frac{68.66^2 + 78.45^2 + 79.50^2}{3} - 5706 = 23.81$$

Para el factor C

$$C_1 = 21.58 + 24.99 + 29.81 = 76.38$$

$$C_2 = 23.92 + 23.06 + 30.81 = 77.79$$

$$C_3 = 23.70 + 24.72 + 24.02 = 72.44$$

$$S_c = \frac{76.38^2 + 77.79^2 + 72.44^2}{3} - 5706 = 5.13$$

Para el factor D

$$D_1 = 21.58 + 24.72 + 30.81 = 77.10$$

$$D_2 = 23.92 + 24.99 + 24.02 = 72.94$$

$$D_3 = 23.70 + 23.06 + 29.81 = 76.57$$

$$S_D = \frac{77.10^2 + 72.94^2 + 72.94^2}{3} - 5706 = 3.43$$

Suma de cuadrados del error

$$S_e = 76 - 43.58 - 23.81 - 5.13 - 3.43 = 0.05$$

Tabla 5. 8. Análisis de varianza

EFECTOS	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	F exp	F tablas
A	43.57622441	2	21.7881122	435.762244	199.5
B	23.81164758	2	11.9058238	238.116476	
C	5.127266576	2	2.56363329	51.2726658	
D	3.425922318	2	1.71296116	34.2592232	
Error	0.05	1	0.05		
Total	75.99106089	9			

La F experimental se compara con F de tablas, utilizando un nivel de significancia de 0.05. Por lo tanto tenemos; $F_{0.05, 2, 1} = 199.5$. Debido a que la F experimental de los factores A y B son mayores que la F encontrada en tablas, se consideran factores significativos, por lo que se concluye que el tiempo y la corriente a aplicar afectan el aumento de biomasa en el proceso.

CONCLUSIONES

Se logró obtener un consorcio de microorganismos halófilos, tratándose de halotolerantes y halófilos débiles sin llegar a ser del tipo extremo, a partir de agua de mar. Debido a la falta de reactivo y equipo para lograr una identificación más específica, se llegó a la conclusión de que se trata de bacterias del tipo *Vibrio* spp y *Proteus* spp, esto a partir de las pruebas bioquímicas realizadas. Y de acuerdo a la observación en microscopio simple se observó la morfología de microorganismos *Euplotes Moebiusi Kahl, 1932*, las cuales de acuerdo a bibliografía consultada viven en ambientes marinos.

Se probó la capacidad de estas bacterias para degradar materia orgánica en agua residual salina utilizando dos relaciones sustrato/microorganismo, siendo estas de 0.023 y 0.078 mg/mg, la mayor degradación de Carbono Orgánico Total se dio a las 96 horas utilizando la relación más alta, siendo esta reducción de 85.48%. Por lo que se concluye que al utilizar mayor concentración inicial de microorganismos se puede alcanzar una mayor reducción de COT.

Debido a que las bacterias halófilas podrían llegar a reducir la salinidad en el agua de mar, ya que al emplear un mecanismo de adaptación a los ambientes salinos, existe la posibilidad de que incorporen sales a su metabolismo para crear un equilibrio osmótico entre su pared celular y el medio, para evitar su deshidratación, pudiendo obtener así un menor contenido de sales en el medio, al ser estas absorbidas por las bacterias. Es por esto que para estas pruebas también se realizaron mediciones de salinidad, sin embargo no se notó una diferencia significativa en los resultados, pudiendo esto deberse a que las bacterias cultivadas resultaron ser halotolerantes y halófilos débiles por lo que su resistencia a medios con alta cantidad de sales se ve limitada.

A pesar de esto resulta de interés seguir realizando pruebas de reducción de sales en agua de mar a través del uso de bacterias halófilas del tipo extremo, aislándolas a partir de una fuente con salinidad mayor a la del agua de mar, una posibilidad podría ser un lago salado, salinas marinas o suelos salados.

Debido a que el fenol es un contaminante orgánico difícil de degradar en un tratamiento biológico convencional, se realizaron algunas pruebas utilizando esta sustancia como única fuente de carbono para los microorganismos.

Se utilizaron diferentes concentraciones de fenol, obteniéndose remociones de hasta un 91 % de remoción en un periodo de tiempo de 45 horas para una concentración de 85.17 ppm de fenol. Comprobándose con esto la excelente capacidad de las bacterias halotolerantes para degradar compuestos orgánicos en presencia de sales.

De los gráficos realizados para el análisis del diseño de experimentos se obtiene que el factor que más afecta al sistema es la corriente. Y los niveles óptimos de los cuatro factores utilizados son: A₃, B₃, C₃ y D₃, correspondiendo a un periodo de tiempo de 8 horas, una corriente de 4 mA, en un medio que contenía 30 g/L de NaCl y adicionando una concentración de carbono de 1000 ppm. Del ANOVA se obtiene que los factores más significativos son el tiempo y la corriente. La corrida en la que se obtuvo un mayor aumento de Sólidos contenía una cantidad de SSV iniciales de 500 mg/L, y se alcanzó una concentración final de 1850 mg/L, aumentando en un 72% la cantidad de sólidos aproximadamente.

Debido a los resultados favorables obtenidos al aplicar corriente a los microorganismos se puede considerar un tratamiento combinando un reactor bioelectroquímico, operado con las condiciones óptimas con las que se logró un mayor aumento de SSV y posteriormente un proceso puramente biológico para tratar aguas residuales salinas, aumentando así la cantidad de microorganismos en menor tiempo para lograr una mayor reducción de compuestos orgánicos presentes en este tipo de aguas.

PERSPECTIVAS

Con el fin de mejorar el estudio realizado y buscar una optimización de los parámetros utilizados se propone lo siguiente:

- Aislar los microorganismos halotolerantes obtenidos, y realizar pruebas de reducción de compuestos orgánicos en agua residual salina, con la finalidad de mejorar el proceso y obtener mayores porcentajes de biodegradación.
- Estudiar el sistema de reducción de fenol en agua residual salina a otras concentraciones iniciales para poder obtener la cinética del proceso y ajustar a un modelo.
- Realizar pruebas de biodegradación utilizando microorganismos halotolerantes con otros compuestos contaminantes, por ejemplo: hidrocarburos, catecol, nitratos, etc.
- Estudiar el proceso de reducción de compuestos orgánicos en un reactor de alimentación secuenciada (SBR), para optimizar los parámetros utilizados y mejorar los porcentajes de biodegradación.
- Obtener una cepa pura halófila del tipo extremo, para realizar estudios de reducción de salinidad, ya que este tipo de microorganismos son capaces de metabolizar la sal, por lo que podrían llegar a reducir la salinidad en el medio en el que se encuentran.
- Estudiar el proceso de reducción de salinidad en una celda de desalación microbiana, utilizando microorganismos halotolerantes, debido a que esta celda se compone de tres cámaras, se pueden utilizar estos microorganismos para lograr una reducción de compuestos orgánicos en las cámaras de ambos extremos, y utilizar la energía que estos liberan para lograr un intercambio de iones en la cámara central, a través de membranas de intercambio catiónico y aniónico, logrando así una reducción de sales en la cámara central y a la vez una biodegradación de compuestos orgánicos contaminantes en las cámaras extremas.

BIBLIOGRAFÍA

Agarry S.E, Solomon B.O, Layokun S.K. (2008). Substrate inhibition kinetics of phenol degradation by binary mixed culture of Pseudomonas Aeruginosa and Pseudomonas fluorescence from steady state and wash-out data. African Journal of Biotechnology. Vol.7. Págs. 3927-3933. Abuja, Nigeria.

Albertario María Elisa, Contreras Edgardo, Bertola Nora, Zritzzy Noemi. Degradación biológica de fenol utilizando técnicas respirométricas. (2007). Revista AIDIS. Vol. 1. Núm. 2. La Plata, Argentina.

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th edition. Washington, D.C.

Anderson Iain, Tindall Brian, Pomrenke Helga, Goker Markus, Lapidus Alla, Nolan Matt, Copeland Alex, Galvina del Rio Tijana, et al. (2009). Complete genome sequence of Halorhabdus Utahensis type strain (AX-2^T). Standards in Genomic Sciences. Vol.1 Págs: 218-225. California, USA.

Bindiya Hari P, Lea Mathew, (2010). Biological treatment of saline wastewater using salt tolerant microorganisms in batch reactors. Department of Civil Engineering. Trivandrum, India.

Bódalo A, Gómez J.L, Gómez E, Hidalgo A.M., Gómez M. y Murcia M.D. Alternativas en la eliminación de residuos salinos. (2006). Ingeniería Química. Págs. 136-143. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Murcia, España.

Castillo Pedro, Bezanilla José, Amieva Juan, Jácome Alfredo, Tejero Iñaki. (1995). Depuración de agua residual con salinidad variable empleando un proceso de biodiscos (RBC). Ingeniería del Agua. Vol.2. Núm. 1. Págs. 25-30. Universidad de Cantabria, España.

Dan, N.P., Visvanathan, C., Polprasert, C., Ben Aim, R. (2002). High salinity wastewater treatment using yeast and bacterial membrane bioreactors. Water Sci Technol. Vol. 46. Núm. 9. Págs. 1-9. Thailand.

Flores L., Mónica, Zavaleta I., Amparo, Zambrano, Yanina, Cervantes, Liliam e Izaguirre Víctor. (2010). Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. Ciencia e Investigación. Vol. 13. Núm.1. Págs. 42 - 46. Lima, Perú.

González García, Yolanda, Nungaray Arellano, Jesús, Gómez Hermosillo, et al. (2005). Capacidad de degradación de Fenol por la bacteria Microbulbifer degradans 2-40. XI Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería. Guadalajara, Jalisco.

González Hernández, Juan Carlos, Peña Antonio. (2002). Estrategias de adaptación de adaptación de microorganismos halófilos y Debaryomyces hansenii (Levadura halófila). Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 44. Núm. 3-4. Pp. 137-156. México. DF.

Hee Kim, Yang, Jee Park, Yoon, Hoon Song, Seung y Je Yoo, Young. (2007). Nitrate removal without carbon source feeding by permeabilized Ochrobactrum anthropic SY509 using an electrochemical bioreactor. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 41. Págs. 663-668. Republic of Korea.

Huo Ying-Yi, Wang Chu- Sheng, Yang Jun-Yi, Wu Min y Xu Xue-Wei. (2008). Marinobacter mobilis sp.nov. and Marinobacter zhejiangensis sp.nov., Halophilic bacteria isolated from East China Sea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol.58. Págs. 2885-2889. China.

Hyun Dong-Wook, Woong Whon Tae, Cho Young-Joon, Chun Jongsik, Kim Min-Soo, Jung Mi-Ja, Shin Na-Ri, Kim Joon-Yong, Kim Pil Soo, Yun Ji-Hyun, Lee Jina, Joon Oh Sei y Bae Jin Woo. Genome sequence of the moderately Halophilic bacterium Salinicoccus carniancri type strain Crm^T (=DSM 23852^T).Standars in Genomic Sciences. Vol. 8. Núm. 2. Págs. 1-15. Republic of Korea.

Jeong Cho, Eun y Ellington, Andrew D. (2007). Optimization of the biological component of a bioelectrochemical cell. Bioelectrochemistry. Vol. 70. Págs 165-172. Texas, USA.

Kargi F, Uygur A. (1995). Biological treatment of saline wastewater in an aerated percolator unit utilizing Halophilic bacteria. Environmental Technology, Vol.17. Págs. 325-330. Izmir, Turkey.

Kumar Arinjay, Kumar Shashi, Kumar Surendra. (2004). Biodegradation kinetics of phenol and catecol using Pseudomonas putida MTCC 1194. Biochemical Engineering Journal. Vol. 22. Págs. 151-159. Uttaranchal, India.

Kotturi Gopaul, Robinson Campell, Inniss William. (1991). Phenol degradation by a psychotropic strain of Pseudomonas putida. Applied and Microbiology Biotechnology. Vol.34. Págs. 539-543. Ontario, Canada.

Kyu Kim Kwang, Jin Long, Chan Yang Hee y Lee Sung-Taik. (2007). Halomonas gomseomensis sp. nov., Halomonas janggokensis sp. nov., Halomonas salaria sp. nov. and Halomonas denitrificans sp. nov., moderately Halophilic bacteria isolated from saline water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 57. Págs. 675-681. República de Korea.

López Muñoz I., Abalde J. y Herrero C. (1992). Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. Nova Acta Científica Compostelana (Biología). Vol. 3. Págs. 59-65. La Coruña, España.

Madero A, Bravo G, Carvajal F y Díaz M. (1998). Adaptación y monitoreo de microorganismos en procesos de nitrificación en aguas residuales de la industria petrolera. Revista colombiana de biotecnología. Vol. 1. Págs. 46-50. Colombia.

Margesin, Rosa y Schinner, Franz. (2001). Potencial of halotolerant and Halophilic microorganisms for biotechnology. Mini-Review. Extremophiles. Vol. 5. Págs. 73-83. Innsbruck, Austria.

Marrot, Benoit, Barrios Martinez, Adrian, Moulin, Philippe y Roche, Nicolas. (2006). Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. Biochemical Engineering Journal. Vol. 30. Págs. 174-183. France.

Meseguer Soria, Inmaculada. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. Ciencia e Investigación VII. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Vol. 2. Págs. 13-17. Universidad Miguel Hernández de Elche. Alicante, España.

Meza Escalante, E.R, Dévora Isiordia, G.E, Estrada Alvarado, M.I, Soto Padilla, M.Y, y Cervantes Carrillo, F.J. (2012). Evaluación de un proceso desnitrificante en continuo con un consorcio halotolerante. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. Págs. 9-14. Obregón, Sonora.

Molina Pérez, Francisco, Rodríguez Loaiza, Diana y Puerta Bolívar, Beatriz. (2008). Manual de Laboratorio de Procesos Biológicos. Dirección de bienestar universitario y departamento de publicaciones. Antioquia, Medellín.

Molina Pimentel, Javier Freddy. (2008). Caracterización de cepas halófilas y halotolerantes con capacidad de producir amilasa, provenientes de la región Andina de Bolivia. Publicación de la IV Feria de ciencias y Tecnología. Cochabamba, Bolivia. Págs. 1-14.

Monsreal José Franco, Lara Zaragoza Erika B., Villa Ruano Nemesio, Canul Lorena G. y Hernández Pacheco Yesenia. (2012). Vibrio damsela, Vibrio fluvialis y Vibrio furnissii, en alimentos marinos de origen animal de coctelerías, cooperativa, pescaderías, restaurantes y supermercados de isla del Carmen, Campeche, México. Revista salud pública y nutrición. Vol. 13. Núm 1. México.

Montenegro J., Koch A., y Naranjo B. (2010). Disminución de la concentración de fenol mediante un consorcio bacteriano nativo aerobio. Revista digital VI Congreso de ciencia y tecnología. Págs. 1-7. Sangolquí, Ecuador.

Montgomery Douglas y Runger George. (2008). Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. Editorial Limusa Wiley. Segunda edición. México.

NORMA Oficial Mexicana NOM-073-ECOL-1994, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de las industrias farmacéutica y farmoquímica.

Olszanowski A., y Piechowiak K. (2006). The use of an electric field to enhance bacterial movement and hydrocarbon biodegradation in soils. Polish J. Environ. Stud. Vol. 15, Núm.2. Págs. 309-309. Polonia.

Oren, Aharon. (2010). Industrial and environmental applications of Halophilic microorganisms. Environmental Technology. Vol.31, núm. 8-9, págs. 825-834. Jerusalem, Israel.

Peña, Antonio y Dreyfus Georges. (1990). La Ciencia desde México. México. DF. http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/092/htm/sec_6.htm.

Ramírez N, Sandoval AH, Serrano JA. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Vol. 24. Núm. 1-2. Caracas, Venezuela.

Ramos Alvaríño Caridad. (2006). Los residuos en la industria farmacéutica. Ciencias Biológicas. Vol. 37. Núm. 1. La Habana, Cuba.

Ramírez D. Ninfa, Serrano, José Antonio, Sandoval Horacio. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, Vol.37, Número 003, Págs. 64-65.

Rovirosa Morell Nobel, González Hernández Patricia, Pellón Arrechea Alexis, Espinosa Lloréns María. (2003). Tratamiento de aguas residuales en zonas costeras con intrusión marina salina. Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ). Vol.18. Núm. 2. Págs. 71-80. Habana, Cuba.

Said, Antonio y Acevedo, Elva. Los microorganismos y su impacto en procesos biotecnológicos. Cáhuil, Chile, Noviembre 2004.

<http://www.geocities.ws/dapacimu8/proyecto.htm>

Sánchez Leal, Ligia Consuelo y Arguello Arias, Heliodoro. (2006). Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio in Vitro y su posible aplicación en bioremediación en suelos salinos-sódicos. Nova. Publicación científica. Vol. 4. Págs: 19-32. Bogotá, Colombia.

Santos Santiago, Sergio Alberto. (2005). Arreglos ortogonales aplicados a la evaluación de la calidad y optimización en el proceso de coagulación-floculación en una planta de tratamiento de aguas residuales. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Celaya, Guanajuato.

Sasaki Kengo, Sasaki Daisuke, Morita Masahiko, Hirano Shin-ichi, Matsumoto Norio, Ohmura Naoya e Igarashi Yasuo. (2010). Bioelectrochemical system stabilizes methane fermentation from garbage slurry. Biosource Technology. Vol.101. Págs. 3415-3422. Tokyo, Japón.

Sasaki Kengo, Hirano Shin-ichi, Morita Masahiko, Sasaki Daisuke, Matsumoto Norio, Ohmura Naoya e Igarashi Yasuo. (2011). Bioelectrochemical system accelerates microbial growth and degradation of filter paper. Microbiol Biothechnol. Vol. 89. Págs. 449-455. Tokyo, Japón.

Shaw W. A., Brosdal J. D, y Echeandia S. (2011). Estrategias para minimizar el vertido de aguas residuales. Procesos de vertido líquido cero. Ingeniería Química. Núm. 495. Págs. 76-84.

Stackebrandt Erko, Chertkov Olga, Lapidus Alla, Nola Matt, Lucas Susan, Han Cliff, Cheng Jan-Fang, Tapia Roxanne, Goodwin Lynne A., Bruce David, et al. (2013). High-quality-draff genome sequence of the yellow-pigmented flavobacterium Joostella marina type strain (En5^T). Standards in Genomic Sciences. Vol.8. Núm.1.

Strycharz, Sarah M, Woodard, Trevor L, Johnson, Jessica P, Nevin, Kelly P, Sanford, Robert A, Löffler, Frank E, Lovley, Derek R. (2008). Graphite Electrode as a Sole Electron Donor for Reductive Dechlorination of Tetrachlorethene by Geobacter lovleyi. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 74. Núm. 19. Págs. 5943-5947. Massachusetts.

Tchobanoglous, George, Burton, Franklin y Stensel, David. Metcalf y Eddy, Inc. (2003). Wastewater Engineering Treatment and Reuse. Edit. Mc. Graw Hill. Cuarta edición.

Thrash, Cameron y Coates, John. (2008). Review: Direct and Indirect Electrical Stimulation of Microbial Metabolism. Environmental science & technology. Vol. 42. Núm.11. Págs. 3921-3931. Berkeley, California.

Valle A, Zanardini E, Abbruscato P, Argenzio P, Lustrato G, Ranalli G y Sorlini C. (2007). Effects of low electric current (LEC) treatment on pure bacterial cultures. Journal of Applied Microbiology. Vol. 103. Págs. 1376-1385. Italia.

Velasco Álvarez, Nancy, Gutiérrez Rojas, Mariano, González Martínez, Ignacio y Damián Matsumura, Pablo. (2011). Tesis: Alteración en el metabolismo de Aspergillus niger expuesto a una corriente eléctrica durante la degradación de hexadecano. México, D.F.

Wang Yu, Wu Yue-Hong, Wang Chu-Sheng, Xu Xue-Wei, Oren Aharon, Zhu Xu-Fen y Wu Min. (2008). Halomonas salifodinae sp. nov, a Halophilic bacterium isolated from a salt mine in China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 58. Págs. 2855-2858. China.

Woolard C. R., e Irvine R.L. (1995). Treatment of hypersaline wastewater in the Sequencing Batch Reactor. Water Research. Vol.29, No.4, pp. 1159 – 1168. University of Notre Dame, USA.

Xu Ying, Nogi Yuichi, Kato Chiaki, Liang Ziyuang Ruder Hans-Jurgen, De Kegel Daniel y Glansdorff Nicolas. (2003). Moritella profunda sp.nov. and Moritella abyssi sp.nov., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol.53. Págs. 533-538. Gran Bretaña.

Xuliang Zhuang, Zhen Han, Zhihui Bai, Guoqiang Zhuang, y Hojae Shim. (2010) Progress in decontamination by Halophilic microorganisms in saline wastewater and soil. Environmental Pollution. Elsevier. Vol. 158. Págs. 1119-1126. China.

Yacuzzi Enrique, Martín Fernando, Quiñones Hugo Marcelo, y Popovsky Matías Julián. (2004). El diseño experimental y los métodos de Taguchi: Conceptos y aplicaciones en la industria farmacéutica. Serie documentos de trabajo. Universidad del Cema. Buenos Aires, Argentina.

Yoshida Masaru, Matsubara Keiko, Kudo Takuji y Horikoshi. Actinopolyspora mortivallis sp. nov., a Moderately Halophilic Actinomycete. (2009). International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 41. Núm. 1. Págs. 15-20. Japón.

Zhang Lehua, Jia Jinping, Zhu Youchun, Zhu Nanwen, Wang Yalin e Yang Ji. (2005). Electrochemically improved bio-degradation of municipal sewage. Biochemical Engineering Journal. Vol. 22. Págs. 239-244. China.

Zongyin Duan. (2011). Microbial degradation of phenol by activated sludge in a batch reactor. Environmental Protection Engineering. Vol. 37. Núm.2. Págs. 53-63. Tongling, China.

ANEXO 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Agua peptonada

Peptona	1.0	g
Cloruro de sodio	8.5	g
Agua	1.0	l

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7 ± 0.1 con hidróxido de sodio 1.0 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición. Se incuba 48 horas a 35°C .

Agar Nutritivo Modificado

Extracto de carne	1.0	g
Extracto de levadura	2.0	g
Peptona	5.0	g
NaCl	5.0	g
Agar	15.0	g

Se disuelven los gramos indicados por litro. Se vierte el medio en placas y se esterilizan a 121°C y 15 psi, durante 15 minutos en autoclave. Se realiza una siembra por el método de estría. Posteriormente se incuba de $35 - 37^{\circ}\text{C}$, durante 18 – 24 horas, aunque algunos microorganismos pueden requerir más tiempo. El pH debe ser de 7 ± 0.2 .

Agar Mac Conkey

Peptona de caseína	17.0 g
Peptona de carne	3.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	1.5 g
NaCl	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	15.0 g

Se disuelven los gramos indicados por litro. Se hace el medio en tubo y se esteriliza 15 minutos en la autoclave a 121°C 15 psi. Se deja solidificar en posición horizontal. Se siembra por picadura y estría. Se cultiva a 35-37°C durante 18-24 horas, aunque algunos microorganismos pueden requerir más tiempo. El pH debe ser de 6.8 ± 0.2

Agar Sal y manitol

Digerido Péptico de Tejido Animal	5.0 g
NaCl	75.0 g
Digerido Pancreático de Caseína	5.0 g
D-Manitol	10.0 g
Extracto de Carne	1.0 g
Rojo de Fenol	0.025 g
Agar Bacteriológico	15.0 g

Suspender 111 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C) y vaciar en placas de Petri estériles. El pH debe ser de 7.4 ± 0.2 .

Agar BAB (Blood Agar Base)

Mezcla de peptona seleccionada	21.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
NaCl	5.0 g
D-glucosa	0.5 g
Sulfato de magnesio	0.045 g
Agar	10.5 g

Suspender 39 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles. Si se prepara en tubos vaciar antes de ingresar a la autoclave. El pH debe ser de 7.3 ± 0.2 .

ANEXO 2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Prueba MIO

La prueba de Movilidad Indol Ornitina (MIO) permite detectar estas tres características en un solo tubo. La movilidad se demuestra con el enturbiamiento del medio. La ornitina produce un color púrpura y el Indol produce un color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's.

Medio MIO

Dextrosa	1.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	10.0 g
Tripteína	10.0 g
Clorhidrato de L-Ornitina	5.0 g
Agar	2.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g

Se disuelven 31 g por litro. Se hace el medio en tubo y se esteriliza 15 minutos en la autoclave a 121°C 15 psi. Se siembra por picadura dado que es un medio semisólido. Se cultiva a 35-37°C durante 18-24 horas. El pH debe ser de 6.5 ± 0.2

Prueba LIA

El Agar de Hierro y Lisina (LIA) es un medio utilizado para la diferenciación de microorganismos entéricos en base a su capacidad para desaminar o descarboxilar la lisina y de producir sulfuro de hidrógeno. La producción de H₂S da positivo si se produce un precipitado negro. La descarboxilización de la lisina da positivo si se produce un color púrpura. La desaminación de la lisina produce una superficie roja.

Medio Agar Lisina-Hierro

Peptona de Gelatina	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
L-Lisina	10.0 g
Tiosulfato de Sodio	0.04 g
Dextrosa	1.0 g
Citrato de Hierro y Amonio	0.5 g
Púrpura de Bromocresol	0.02 g
Agar Bacteriológico	13.5 g

Se disuelven 23 g por litro. Se hace el medio en tubo y se esteriliza 15 minutos en la autoclave a 121°C 15 psi. Se deja cuajar en posición horizontal. Se siembra por picadura y estría. Se cultiva a 35-37°C durante 18-48 horas. El pH debe ser de 6.7 ± 0.2

Prueba TSI/Prueba de Kligler

Este medio se utiliza para la identificación de la capacidad de los microorganismos para fermentar hidratos de carbono y para indicar la producción de H₂S. Se pueden usar ambos medios, sin embargo, el TSI contiene glucosa mientras que el KIA no. La fermentación de los hidratos de carbono se observa con una coloración amarilla por la acidificación del medio. La producción de H₂S se observa con un precipitado negro.

Medio Agar Hierro-Triple Azúcar (TSI)

Peptona	20.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
NaCl	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Citrato férrico	0.3 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
R rojo Fenol	0.025 g
Agar	12.0 g

Medio Agar hierro de Kligler (KIA)

Peptona	20.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
NaCl	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Citrato férrico	0.3 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
R rojo Fenol	0.025 g
Agar	12.0 g

Se disuelven los gramos indicados por litro. Se hace el medio en tubo y se esteriliza 15 minutos en la autoclave a 121°C 15 psi. Se deja cuajar en posición horizontal. Se siembra por picadura y estría. Se cultiva a 35-37°C durante 18-24 horas. El pH debe ser de 7.4 ± 0.2 .

Prueba Citrato

Este medio se usa para determinar la capacidad de los microorganismos de usar el citrato como fuente de carbono con el resultado de un medio alcalino. Esto se muestra con el vire del medio a un color azul intenso.

Medio Citrato de Simmons

NH ₄ H ₂ PO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NaCl	5.0 g
Citrato de sodio	2.0 g
MgSO ₄	0.2 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar	12.0 g

Se disuelven los gramos indicados por litro. Se hace el medio en tubo y se esteriliza 15 minutos en la autoclave a 121°C 15 psi. Se deja cuajar en posición horizontal. Se siembra por picadura y estría. Se cultiva a 35-37°C durante 18-24 horas. El pH debe ser de 6.6 ± 0.2

Prueba SIM

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la Tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar Indol El Indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o de Erlich, para originar un compuesto de color rojo que da positivo a la técnica. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro.

Medio SIM

Tripteína	20.0 g
Peptona	6.1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agar	3.5 g

Se disuelven 30 g por litro. Se hace el medio en tubo y se esteriliza 15 minutos en la autoclave a 121°C 15 psi. Se deja cuajar en posición vertical. Se siembra por picadura. Se cultiva a 35-37°C durante 18-24 horas. El pH debe ser de 7.3 ± 0.2 .

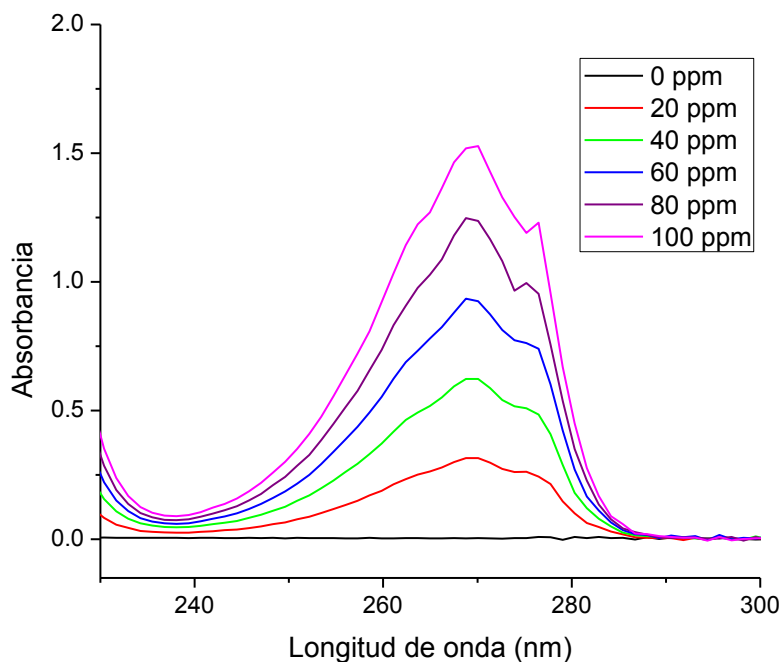
Prueba Catalasa

Esta prueba revela la producción de catalasa mediante la adición de peróxido de hidrogeno, lo que provoca la producción de espuma encima de la colonia tratada.

Peróxido de hidrogeno 3%

ANEXO 3. RESULTADOS DE LA BIODEGRADACIÓN DE FENOL

Curva de calibración de Fenol. Espectro UV-Visible.



Resultados obtenidos para la biodegradación de fenol a una concentración inicial de 21.17 ppm

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración de Fenol (ppm)	Reducción (%)
0	0.33507	21.16797386	0
1	0.31043	19.55751634	7.607990861
2	0.30136	18.96470588	10.40849724
4	0.29079	18.27385621	13.67215241
5	0.27614	17.31633987	18.1955723
17	0.0934	5.37254902	74.61944607
22	0.07954	4.466666667	78.89894093

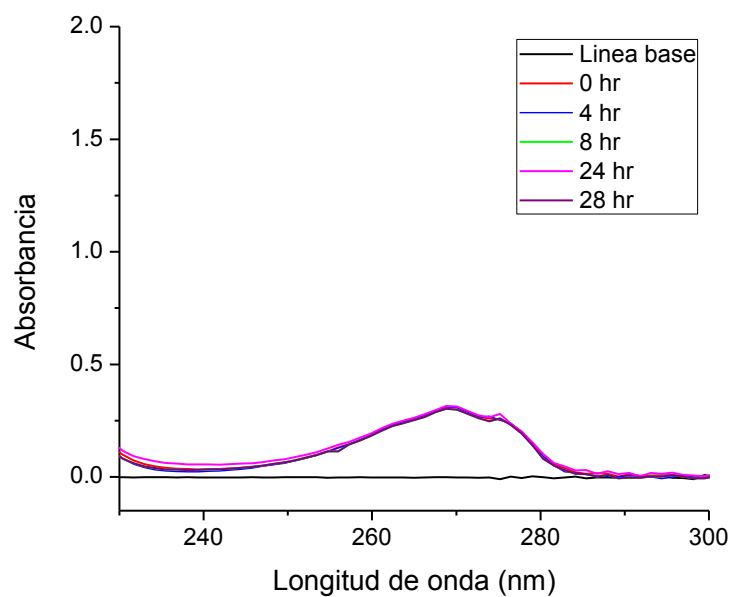
Concentración inicial de 51.33 ppm

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración de Fenol (ppm)	Reducción (%)
0	0.79657	51.33137255	0
3	0.77194	49.72156863	3.136101455
6	0.73405	47.24509804	7.96057909
9	0.62425	40.06862745	21.94125062
17	0.48896	31.22614379	39.16752613
20	0.35666	22.57908497	56.01308937
23	0.22585	14.02941176	72.66893311
26	0.10919	6.404575163	87.52307829

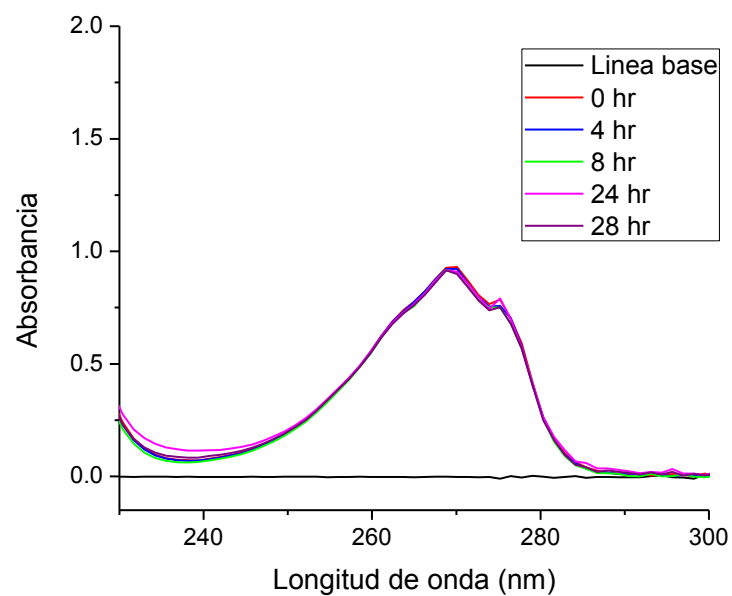
Concentración inicial de 82.76 ppm

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración de Fenol (ppm)	Reducción (%)
0	1.27753	82.76666667	0
8	1.19314	77.25098039	6.664139679
17	1.09535	70.85947712	14.38645535
23	1.02663	66.36797386	19.81316087
26	0.85968	55.45620915	32.99692813
39	0.52334	33.47320261	59.55714545
42	0.38338	24.3254902	70.60955675
45	0.12239	7.267320261	91.21950834

Espectro UV-Vis del blanco 20 ppm



Espectro UV-Vis del blanco 60 ppm



Espectro UV-Vis del blanco 100 ppm