

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Comparación de remoción de nitratos en aguas residuales entre  
*Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* en condiciones anóxicas a escala  
laboratorio

Trabajo de graduación presentado por Hans Martin Marroquin Padilla para optar al grado  
académico de Licenciado en Ingeniería Química

Guatemala,

2023



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



*Excelencia que trasciende*

**DEL VALLE**  
GRUPO EDUCATIVO

Comparación de remoción de nitratos en aguas residuales entre  
*Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* en condiciones anóxicas a escala  
laboratorio

Trabajo de graduación presentado por Hans Martin Marroquin Padilla para optar al grado  
académico de Licenciado en Ingeniería Química

Guatemala,

2023

Vo. Bo.

(f) Carlo Martínez

Lic. Carlo Martínez

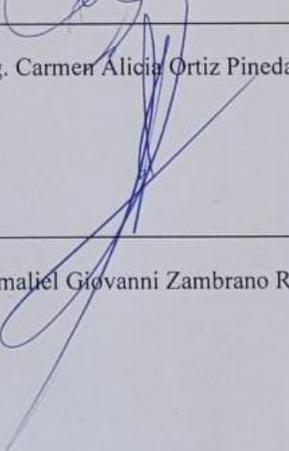
Terna examinadora

(f) Carlo Martínez

Lic. Carlo Martínez

(f) 

MSc. Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda

(f) 

Msc. Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano

Fecha de aprobación: Guatemala, 3 de enero de 2023

## Prefacio

El presente trabajo es la finalización de la carrera de Ingeniería Química para mí. A lo largo de toda la carrera me he dado cuenta de todas las problemática ambientales que nuestra sociedad enfrente hoy en día por lo que quise realizar este proyecto, debido a que tengo una preocupación personal por el estado del agua en el futuro, ya que el agua es fundamental para todos los seres vivos y es importante que esta abunde porque tiene que ser accesiblemente económica para todos, por lo que es imperativo para mí, hallar nuevas maneras de sanar el agua. Los problemas encontrados fueron varios, siendo el primero, la consecución de la muestra de aguas residuales, ya que no todos estaban dispuestos a darlas. Por otro lado también se complicó el crecimiento de las bacterias utilizadas, ya que no estaban en las mejores condiciones. Sin embargo, con perseverancia y esfuerzo, logré llevar a cabo la fase experimental y, por último, la fase de redacción.

En los 5 años de mi carrera, he tenido a bastantes personas que siempre me ha apoyado en todo sentido. Todo esto no hubiera sido posible sin el apoyo de mis padres en cualquier sentido. Le agradezco a mis perros, Klaus y Luigi, los cuales me brindaron alegría en momentos donde la necesitaba.

También quiero agradecerle a Hemm-Tech S.A por su apoyo durante la realización de mi trabajo de graduación, ya que sin su aporte, la fase experimental no se podría haber llevado a cabo. También agradecerle al Lic. Carlo Martínez por su constante ayuda en la mejora de este trabajo así como los apoyos en la fase experimental. Finalmente, quiero agradecerle a mis amigos, ya que sin ellos, la experiencia en la universidad habría sido un vacío completamente. Su apoyo y su amistad es algo que siempre voy a valorar por el resto de mi vida.

## Contenido

I.	Introducción .....	1
II.	Antecedentes .....	2
III.	Justificación.....	6
IV.	Objetivos.....	7
A.	General .....	7
B.	Específicos .....	7
V.	Marco teórico.....	8
A.	Marco legal .....	8
B.	Proceso de aguas residuales .....	8
C.	Nitrificación .....	11
D.	Desnitrificación.....	13
E.	Bacterias desnitrificadoras .....	24
F.	Ciclo del nitrógeno .....	26
G.	DQO y DBO .....	27
H.	Nuevas tecnologías .....	28
I.	Absorbancia.....	29
VI.	Metodología .....	31
VII.	Resultados .....	35
VIII.	Discusión .....	38
IX.	Conclusiones .....	43
X.	Recomendaciones.....	44
XI.	Literatura citada .....	45
XII.	Anexos.....	47
A.	Datos originales .....	47
B.	Figuras originales .....	49

C.	Cálculos .....	57
D.	Análisis estadístico .....	58
E.	Análisis de error .....	61
F.	Datos calculados .....	62
H.	Fotografías .....	62
XIII.	Glosario .....	65

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Cantidad de elaboración de medio.....	4
<b>Tabla 2.</b> Capacidad de remoción de nitrógeno total dependiendo del sistema a utilizar.....	16
<b>Tabla 3.</b> Parámetros iniciales de la muestra de aguas residuales.....	35
<b>Tabla 4.</b> Tasas de remoción por parte del <i>Bacillus cereus</i> y <i>subtilis</i> .....	37
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de remoción de nitratos y nitritos por parte del <i>Bacillus subtilis</i> .....	37
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de remoción de nitratos y nitritos por parte del <i>Bacillus cereus</i> .....	37
<b>Tabla 7.</b> Datos de la corrida 1 del <i>Bacillus subtilis</i> .....	47
<b>Tabla 8.</b> Datos de la corrida 2 del <i>Bacillus subtilis</i> .....	47
<b>Tabla 9.</b> Datos de la corrida 3 del <i>Bacillus subtilis</i> .....	47
<b>Tabla 10.</b> Datos de la corrida 1 del <i>Bacillus cereus</i> .....	48
<b>Tabla 11.</b> Datos de la corrida 2 del <i>Bacillus cereus</i> .....	48
<b>Tabla 12.</b> Datos de la corrida 3 del <i>Bacillus cereus</i> .....	48
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza para los nitratos.....	59
<b>Tabla 14.</b> Residuos estándar para el análisis de varianza de nitratos.....	59
<b>Tabla 15.</b> Análisis de varianza para nitritos.....	60
<b>Tabla 16.</b> Residuos estándar para el análisis de varianza de nitritos.....	61
<b>Tabla 17.</b> Tasas de remoción de <i>Bacillus subtilis</i> .....	62
<b>Tabla 18.</b> Tasas de remoción de <i>Bacillus cereus</i> .....	62
<b>Tabla 19.</b> Eficiencias de remoción del <i>Bacillus subtilis</i> .....	62
<b>Tabla 20.</b> Eficiencias de remoción del <i>Bacillus cereus</i> .....	62

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama de proceso de una PTAR aerobia .....	8
<b>Figura 2.</b> Reacciones de desnitrificación con la fuente externa de carbono.....	14
<b>Figura 3.</b> Proceso de Bath, Bremmer y Lewis .....	17
<b>Figura 4.</b> Comportamiento de la tasa de desnitrificación frente al pH.....	22
<b>Figura 5.</b> Balance de masa teórico del proceso de desnitrificación .....	25
<b>Figura 6.</b> Balance de energía teórico del proceso de desnitrificación.....	25
<b>Figura 7.</b> Diagrama de reacciones de desnitrificación.....	26
<b>Figura 8.</b> Ciclo del nitrógeno .....	27
<b>Figura 9.</b> Concentración promedio de $\text{NO}_3^- \text{N}$ utilizando <i>Bacillus subtilis</i> .....	35
<b>Figura 10.</b> Concentración promedio de $\text{NO}_2^- \text{N}$ utilizando <i>Bacillus subtilis</i> .....	36
<b>Figura 11.</b> Concentración promedio de $\text{NO}_3^- \text{N}$ utilizando <i>Bacillus cereus</i> .....	36
<b>Figura 12.</b> Concentración promedio de $\text{NO}_2^- \text{N}$ utilizando <i>Bacillus cereus</i> .....	37
<b>Figura 13.</b> Concentración de $\text{NO}_3^- \text{N}$ de la corrida 1 del <i>Bacillus subtilis</i> .....	49
<b>Figura 14.</b> Concentración de $\text{NO}_2^- \text{N}$ de la corrida 1 del <i>Bacillus subtilis</i> .....	49
<b>Figura 15.</b> Concentración de $\text{NO}_3^- \text{N}$ de la corrida 2 del <i>Bacillus subtilis</i> .....	50
<b>Figura 16.</b> Concentración de $\text{NO}_2^- \text{N}$ de la corrida 2 del <i>Bacillus subtilis</i> .....	50
<b>Figura 17.</b> Concentración de $\text{NO}_3^- \text{N}$ de la corrida 3 del <i>Bacillus subtilis</i> .....	51
<b>Figura 18.</b> Concentración de $\text{NO}_2^- \text{N}$ de la corrida 3 del <i>Bacillus subtilis</i> .....	51
<b>Figura 19.</b> Concentración de $\text{NO}_3^- \text{N}$ de la corrida 1 del <i>Bacillus cereus</i> .....	52
<b>Figura 20.</b> Concentración de $\text{NO}_2^- \text{N}$ de la corrida 1 del <i>Bacillus cereus</i> .....	52
<b>Figura 21.</b> Concentración de $\text{NO}_3^- \text{N}$ de la corrida 2 del <i>Bacillus cereus</i> .....	53
<b>Figura 22.</b> Concentración de $\text{NO}_2^- \text{N}$ de la corrida 2 del <i>Bacillus cereus</i> .....	53
<b>Figura 23.</b> Concentración de $\text{NO}_3^- \text{N}$ de la corrida 3 del <i>Bacillus cereus</i> .....	54
<b>Figura 24.</b> Concentración de $\text{NO}_2^- \text{N}$ de la corrida 3 del <i>Bacillus cereus</i> .....	54
<b>Figura 25.</b> Balance de masa de compuestos nitrogenados utilizando <i>Bacillus cereus</i> .....	55
<b>Figura 26.</b> Balance de masa de compuestos nitrogenados utilizando <i>Bacillus subtilis</i> .....	55
<b>Figura 27.</b> Balance de energía de compuestos nitrogenados utilizando <i>Bacillus cereus</i> .....	56
<b>Figura 28.</b> Balance de energía de compuestos nitrogenados utilizando <i>Bacillus subtilis</i> .....	56
<b>Figura 29.</b> Residuos estándar del análisis de varianza de nitratos.....	60
<b>Figura 30.</b> Residuos estándar del análisis de varianza de nitritos .....	61
<b>Figura 31.</b> Siembra de microorganismo .....	62
<b>Figura 32.</b> Inoculación de microorganismos.....	63
<b>Figura 33.</b> Muestra de agua esterilizada.....	63
<b>Figura 34.</b> Procedimiento para medición de nitratos y nitritos .....	64
<b>Figura 35.</b> Fotómetro utilizado .....	64

## Resumen

El objetivo general de este trabajo de graduación es la comparación de la remoción de nitratos entre *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*. Se utilizó una muestra modificada de aguas residuales de tipo ordinario, donde a estas se le agregaron 10g de sacarosa comercial con el fin de proveerle a los microorganismos una fuente externa de carbono, debido a que el DBO de la muestra era de 14.9 ppm, siendo este muy pequeño para fungir como fuente de energía para los microorganismos, se midió el DBO después de 65 ppm, por lo que la sacarosa cumplió su meta de aumentar el DBO.

Se procedió a inocular las muestras de aguas residuales con ambas bacterias, donde este proceso de fermentación o desnitrificación ocurrió desde martes a viernes. Se calculaban muestras intermedias, donde el martes se tomó 1 muestra, miércoles y jueves 2 muestras por día y el viernes una muestra, siendo un total de 6 muestras por nitratos y 6 por nitritos por cada microorganismo. Se procedió a hacer un análisis de varianza de 1 factor para la influencia de los microorganismos en la eficiencia de remoción de nitratos y nitritos.

Se logró determinar las tasas de remoción de nitratos y nitritos de ambos microorganismos, en los nitratos la del *Bacillus cereus* fue de 0.1171 ppm/h mientras que la del *Bacillus subtilis* fue de 0.0941 ppm/h, por otro lado en los nitritos la del *Bacillus cereus* fue de 0.0185 ppm/h y la del *Bacillus subtilis* fue de 0.0339 ppm/h.

Por otro lado, la eficiencia de remoción de nitratos por parte del *Bacillus cereus* fue de un 49% mientras que el *Bacillus subtilis* fue de un 38%. Ahora, por parte de los nitritos, la eficiencia de remoción para el *Bacillus cereus* fue de un 7% mientras que para el *Bacillus subtilis* fue de un 12%.

Según el análisis de varianza realizado, si existe una evidencia estadísticamente significativa que nos permite concluir que el *Bacillus cereus* es un mejor microorganismo en términos de remoción de nitratos que el *Bacillus subtilis*. Ahora, el análisis de varianza efectuado para la remoción de nitritos nos indica que no hay evidencia estadísticamente significativa que permite concluir cuál de los dos microorganismos tuvo una mayor eficiencia en la remoción de nitritos.

## I. Introducción

La tecnología del tratamiento de aguas residuales ha venido en un constante crecimiento en los últimos 10a 20 años, esto debido a que la población mundial se ha multiplicado incansablemente y por lo tanto el consumo de agua aumentará, y las aguas residuales aumentarán, por lo que se han ido buscando nuevas maneras para su control y reducción de consumo. Los gobiernos de los países donde el tratamiento se ha vuelto crítico han instalado regulaciones fuertes para la descarga de aguas residuales. El objetivo primario del tratamiento de las aguas residuales es volver a utilizar esas aguas para consumo humano, mientras que el secundario sería para disminuir la contaminación de cuerpos receptores.

Las aguas residuales se definen como las aguas con impurezas que proceden de diferentes lugares, tales como casas, diferentes tipos de industria. Esta definitivamente contendrá altas concentraciones de compuestos orgánicos e inorgánicos. La descarga ilegal sin tratar del efluente provocará una contaminación severa, este promoverá que la calidad de agua siga bajando mientras que la población sigue en aumento. Por lo que entra en acción un nuevo concepto, el cual se llama ingeniería sustentable en aguas residuales, donde esta quiere utilizar los principios de la biotecnología e ingeniería para realizar los tratamientos de aguas residuales de forma eficiente, siempre cumpliendo con los parámetros pero haciendo el proceso rentable económicamente también, ya que ese es un gran problema por el cual grandes industrias no tratan las aguas (Ecomar, 2020).

Han surgido diferentes emergencias que deben tener nuestra atención. Los costos económicos para la operación de la planta de tratamiento. El realizar una disposición correcta de los lodos generados en la planta. La escasez de agua limpia y lista para uso humano. Por lo tanto el tratamiento de las aguas residuales debería ir siguiendo ciertos parámetros para concentrar su esfuerzo en ellas. La primera es la generación de energía, ya que en la actualidad esta consume mucha energía para los digestores o diferentes equipos que se emplean, por lo que es necesario utilizar el metano que se puede generar a partir de los lodos con el fin de utilizar esa energía para el consumo propio de la planta o para otras partes de la empresa. La segunda sería reducción de costo económico y operativo, esto ya que a veces se invierten demasiados equipos o materia prima para el funcionamiento óptimo de la planta, por lo que ahí entraría la biotecnología para que a través de microorganismos realizar procesos más eficientes que requieren una menor inversión energética y por lo tanto facilitarán al operación de esta (Riffat & Husnain, 2020).

Cabe destacar que este es solo el principio frente a la lucha por la sostenibilidad hídrica. Por eso es necesario fortalecer los requerimientos legales de cada país para que estos jueguen un rol significativo para un tratamiento óptimo de aguas residuales. Así mismo es necesario la investigación para establecer periódicamente nuevas metas e innovación en la metodología. Es necesario que los gobiernos de cada país también implementen monitoreos constantes para constatar el tratamiento de las aguas para cada industria.

## II. Antecedentes

Autor: Yang et al.

Año: 2021

Lugar de realización: China

Los *Bacillus* son una especie que a lo largo se ha venido mencionado que algunas cepas de ellos podrían tener capacidades desnitrificadoras. Se aisló una cepa denominada JD-014, donde previamente se encontró que está demostraba capacidades desnitrificadoras con una tolerancia arriba de lo normal contra la toxicidad por parte de los nitritos. Sin embargo, la aplicación desnitrificadora en un proceso real todavía no se confirmó.

Como metodología, se aisló la cepa como primer punto, después esta fue sembrada en un medio Luria Bertani a 37 grados Celsius y 200 rpm por una noche. El medio de a fermentar o desnitrificar fue elaborado artificialmente y este mismo fue inoculado a 37 grados Celsius a 200 rpm por 5 días. Se utilizó una concentración celular de 0.2 de acuerdo con el OD<sub>600</sub>.

Los resultados mencionaron que cuando NO<sub>3</sub><sup>-</sup>N era utilizado como la única fuente de nitrógeno, esta concentración permanecía estable por las primeras 48 horas y después empezaba a descender hasta las 78 horas. Durante el tiempo de experimentación, la máxima eficiencia que se tuvo de remoción de TN y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>N fue de 87.74% y 98.1% respectivamente, donde las tasas fueron 1.08 y 1.13 ppm/h. Ahora, si NO<sub>2</sub><sup>-</sup>N fue la única fuente de nitrógeno en el sistema, la cepa de *Bacillus subtilis* demostraba una remoción eficiente de nitrógeno, donde la remoción máxima de TN y NO<sub>2</sub><sup>-</sup>N fue de 72.24% y 81.99%, con unas tasas de 0.99 y 1.09 ppm/h.

Se menciona que el experimento fue llevado a cabo en un pequeño reactor continuo, por lo que había requerimientos de carbono y nitrógeno que entraban de forma continua, por lo que se le otorgaron suficientes nutrientes para el crecimiento de la cepa. Además la liberación simultánea del agua tratada limitó la acumulación de células muertas y residuos tóxicos en el reactor, por ende las condiciones para el desarrollo de la cepa también mejoraron.

Además se realizó un análisis genómico de dicha cepa, donde se reveló la desnitrificación en niveles genéticos. Se encontraron 43 genes asociados al nitrógeno donde 9 de estos fueron validados que participaban en procesos de desnitrificación. Finalmente, se menciona que el *Bacillus subtilis* tiene un gran potencial de aplicación en la biorremediación de aguas residuales conteniendo altas concentraciones de nitrógeno. El entendimiento de las rutas metabólicas del nitrógeno provee un alto conocimiento sobre como las especies de *Bacillus* se modifican y desarrollan.

Autor: Zarrella et al.  
Año: 2019  
Lugar de realización: Italia

El objetivo de este trabajo es estudiar el desempeño de las bacterias facultativas desnitrificadoras como los *Bacillus cereus* en condiciones anaerobias en la presencia de aguas residuales sintéticas enriquecidas de nitratos. Se utilizó la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 10876. Para permitir que las células bacterianas crecieran rápidamente, estas crecieron de manera aeróbica en un medio libre de nitratos a 30 grados Celsius. Las células se congelaron en un caldo de glicerol y se reactivaron a través de una incubación por 4 horas a una concentración que corresponde a un OD<sub>600</sub> de 0.05. La cepa fue inoculada en medio enriquecido incubado a 30 grados Celsius, con una agitación constante de 200 rpm. Después de la centrifugación, se recolectaron las células, se lavaron y se transfirieron a un envase hasta que el OD<sub>600</sub> fuera de 0.01. Después se transfirieron estas soluciones a los medios a desnitrificar.

El desempeño desnitrificador del *Bacillus cereus* se analizó donde se determinaron las mejores condiciones para permitir la eficiencia más alta de remoción de nitratos. Se controló el DBO, la variación de pH, y la concentración de nitratos presentes en el medio. El resultado más importante obtenido fue la completa transformación de nitratos a nitrógeno molecular sin obtener acumulación de nitritos, como se había reportado en otros artículos. Se demostró que este microorganismo puede acabar con la concentración de nitratos en aguas residuales sintéticas desde una concentración de 200 ppm, siempre que se le otorga la suficiente energía en términos de fuentes externas de carbón y también verificar que el pH se mantuviera neutral. Cuando se tenían concentraciones altas de nitratos y no había buffer en el medio, se inhibía el consumo de compuestos nitrosos, sin embargo, la transformación de nitrato a nitrito se llevaba a cabo.

Por medio de un análisis cinético se comprobó que tenía un comportamiento similar a la ecuación de Monod, sin embargo, la ecuación de velocidad se podía aproximar a una de orden cero por el consumo de nitrógeno.

Autor: Yang et al.  
Año: 2020  
Lugar de realización: China

La bioenergía proveniente de la biomasa juega un papel importante como fuentes de energía para equiparar la demanda de esta. Sin embargo, durante la producción de biomasa, el agua es un factor importante para tomar en cuenta, como la disponibilidad, calidad y otros. Por otro lado, la producción de bioenergía puede generar una contaminación de agua, por lo que es urgente tomar iniciativas para mejorar la calidad de los cuerpos de agua. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar 4 cepas de *Bacillus* caracterizarlas y estudiar las propiedades de remoción de nitrógeno. Se utilizó un medio Luria Bertani para el enriquecimiento y aislamiento de las bacterias. Se elaboró un medio a desnitrificar con las siguientes cantidades:

**Tabla 1.** Cantidad de elaboración de medio

Reactivo	Cantidad (g)
NaNO <sub>3</sub>	0.84
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5

Se tuvieron que cultivar las bacterias por 16 horas a 37 grados Celsius y 200 pm y las células bacterianas fueron recuperadas a partir de la centrifugación. Se utilizó 1 mL de la solución de microorganismos para 100 mL del medio a desnitrificar, donde esta solución tuvo un OD<sub>600</sub> de 0.1. Se dejó incubar por 5 días.

Para medir el nitrógeno gaseoso liberado por la reacción de desnitrificación, se sellaron los envases donde se da la reacción y a través de jeringas se dirigieron los gases a un cromatógrafo de gases para cuantificar el nitrógeno gaseoso y monóxido de di nitrógeno. Si el nitrato de sodio fue la única fuente de nitrógeno, las cepas utilizadas demostraron una remoción de nitratos, siendo la máxima entre una de ellas de un 66.87% con una tasa de 1.03 ppm/h. El pH se elevó de 7.2 a 9.2 debido a la acumulación de iones hidroxilo durante la desnitrificación. Si el nitrito de sodio fue la única fuente de nitrógeno, esto provoco, que las bacterias entrarán a un periodo de latencia por días aproximadamente. Eventualmente, la densidad óptica fue aumentando y se llegó a remover el nitrito, siendo la más alta entre las cepas, una tasa de remoción del 73.42% mientras que la tasa máxima de remoción fue de 1.07 ppm/h. Se logró determinar que las 4 cepas envueltas desde el inicio en el experimento demostraron tener capacidades reductoras de nitrógeno así también como alta resistencia a la toxicidad de los nitritos.

Autor: Sobieszuk & Szewczyk

Año: 2019

Lugar de realización: Inglaterra

La desnitrificación usualmente es llevada a cabo por microorganismos heterótrofos, donde estos para que lleven a cabo dicha reacción, ese necesario que tengan una fuente de energía, en este caso una fuente externa de carbono. Por lo que algo a tomar en cuenta es la relación carbono-nitrógeno en la desnitrificación, donde esta describe la cantidad de carbono disponible para que reducir los compuestos de nitrógeno presentes. Se describen dos situaciones. La primera, cuando el valor de esta relación en las aguas residuales es menor que el valor crítico, el nitrógeno excede el carbono disponible y la eficiencia de la desnitrificación es baja. Ahora describiendo la segunda situación, si la relación carbono nitrógeno es mayor a la crítica, significa que va a haber una pequeña cantidad de nitrógeno en la presencia de un exceso de fuentes externas de carbono y por lo tanto las posibilidades que se dé la reacción de desnitrificación es casi del 100%.

Finalmente, a través de balances de masa del proceso de desnitrificación es posible estimar la relación C/N crítica. La relación entre nitratos removidos y carbono consumido dependerá del grado de reducción de la fuente de carbono así como del rendimiento de la biomasa. Se determinó que cuando se usa metanol como única fuente de carbono, la eficiencia de desnitrificación disminuía, mientras que si se utilizaba una mezcla de acetato y metanol, se obtenía una reacción de desnitrificación completa.

### III. Justificación

El Agua es uno de los activos más valiosos para el ser humano. Y debido al alto crecimiento poblacional, el tratamiento de las aguas residuales se vuelve crítico para poder conservar el ciclo natural del agua.

Actualmente, las aguas residuales constituyen un segmento de problema en la contaminación del agua, por lo que su tratamiento es esencial para que el agua tratada tenga parámetros adecuados que no permitan una mayor contaminación. Existe varias formas de que estas estén contaminadas, ya sea por presencia de bacterias patógenas, metales pesados como plata, cromo, plomo, etc y también por los compuestos nitrogenados o fosforados. Los nitratos se encuentran en altas concentraciones en las mismas, debido a que la mayoría de aguas residuales es una mezcla de desechos humanos que contiene heces fecales y orina en términos generales, y por diversos procesos bioquímicos como la amonificación y nitrificación, los nitratos se llegan a formar y a estos no ser eliminados a los parámetros adecuados, y en dado caso llegan a ser descartados a cuerpos receptores aportaran un exceso de nutrientes al agua produciendo la eutrofización y pasa lo que se puede observar con varios lagos aquí en Guatemala, como el lago de Atitlán y Amatitlán (Water Education, 2020).

Existen varias maneras de tratar las aguas, siendo las plantas de tratamiento los principales procesos, donde pueden existir plantas aerobias o anaerobias. En este caso se enfocarán en las aerobias, donde en este proceso ocurre una reacción conocida como desnitrificación, donde ciertos microorganismos utilizan los nitratos como aceptor de electrones para su ciclo de respiración y llegan a transformar dichos nitratos hasta nitrógeno molecular el cual es un gas inerte y que tampoco contribuye al efecto invernadero.

Generalmente, existen varias bacterias desnitrificadoras en las PTAR aeróbicas, sin embargo, no se tiene específicamente cuales son las que más se usan en la desnitrificación, por lo que en este trabajo se pretende comparar dos microorganismos los cuales *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* para determinar cuál de estas dos posee un mayor rendimiento de remoción de nitratos (Science Direct, s.f).

## IV. Objetivos

### A. General

- Comparar la remoción de nitratos en aguas residuales utilizando *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* en condiciones anóxicas a escala laboratorio.

### B. Específicos

- Realizar una caracterización fisicoquímica de una muestra modificada de aguas residuales tipo ordinario para establecer los parámetros iniciales.
- Elaborar una curva de concentración  $\text{NO}_3^- \text{N}$  y  $\text{NO}_2^- \text{N}$  vs el tiempo para ambos microorganismos para determinar la tasa de remoción de estos.
- Realizar el balance de concentración de  $\text{NO}_3^- \text{N}$  y  $\text{NO}_2^- \text{N}$  para ambos microorganismos para determinar el rendimiento de reducción de nitrógeno.

## V. Marco teórico

### A. Marco legal

El reglamento de descargas y reúso de aguas residuales denominado como acuerdo gubernativo 236-2006 entró en vigor el 12 de mayo del 2006, donde este establece los criterios, límites permisibles y requisitos que deben cumplirse para la descarga y reúso de aguas residuales, así como para la disposición de lodos. Lo anterior con el propósito de prevenir el impacto adverso del ambiente, mantener el equilibrio ecológico y propiciar el mejoramiento progresivo de la calidad de las aguas y así contribuir a la sostenibilidad del recurso hídrico. El cumplimiento de los parámetros de medición de características de las aguas residuales se fijó a través de modelos de reducción progresiva, las cuales se fijaron en varias etapas desde el año 2011 y que finalmente deben ser cumplidas al 2 de mayo del 2024.

Las aguas residuales se definen como las aguas que han recibido uso y cuyas cualidades han cambiado. Las aguas residuales se dividen en aguas residuales del tipo especial y aguas residuales del tipo ordinario según el acuerdo gubernativo 236-2006 de la república de Guatemala. Las aguas residuales especiales se definen como las generadas a partir de actividades industriales, agrícolas, las provenientes de hospitales, etc. Las aguas residuales del tipo ordinario se definen como las generadas a partir de las actividades comunes o domésticas tales como uso de sanitarios, lavado de manos, lavado de ropa, etc (INFOM, 2006).

### B. Proceso de aguas residuales

**Figura 1.** Diagrama de proceso de una PTAR aerobia

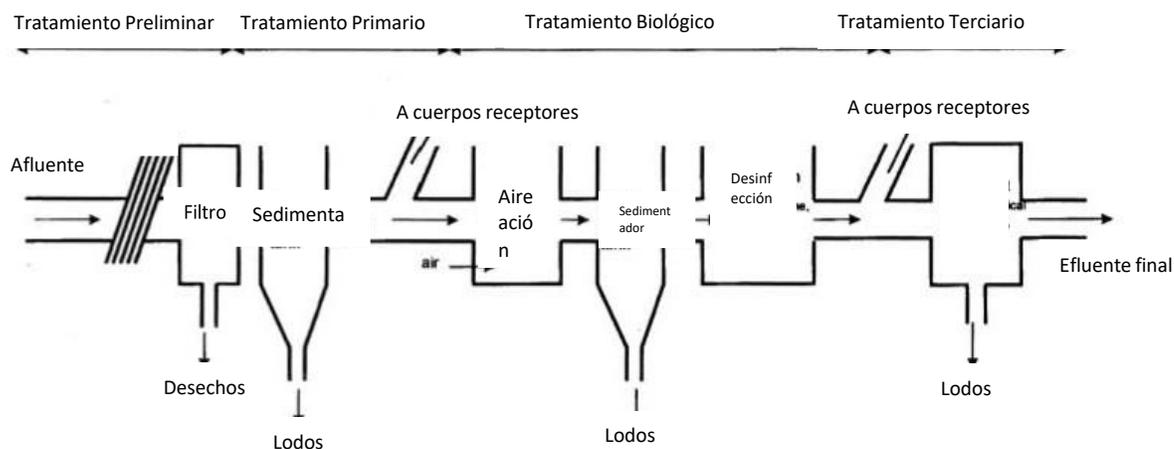


Figure 8.6 Planta de tratamiento

Una planta de tratamiento de aguas residuales tiene el siguiente diagrama como representación del proceso.

1. Remoción de sólidos grandes: En esta primera etapa, como se recolecta todo el agua de sanitarios, lavamanos, lavadoras, etc. Se trata del proceso físico de remoción de sólidos de

un diámetro grande, con el fin que estos no dañen las válvulas que se tienen en la planta o incluso las bombas. Estos residuos después de su remoción se recolectan y se desechan en un vertedero.

2. Desarenador: esta tiene la finalidad de separar ceniza, piedras pequeñas o inclusive arena, a través de una sedimentación. Existen desarenadores horizontales, aireados o de vórtice. Esto permite que los materiales pesados previamente mencionados, por su peso, se sedimenten por lo que el agua y la materia orgánica continua con su flujo. Es un proceso que tiene su importancia en comunidades donde los desagües se encuentran a la intemperie o ya sea que el agua pluvial desemboque en estos mismos.
3. La sedimentación primaria: Su principal función es de reducir la carga de materia orgánica al momento de empezar el tratamiento biológico. En este paso, lo que contiene el agua son los lodos o materia orgánica suspendida. Estos nuevamente por peso se sedimentan y una bomba es la encargada de la extracción. Las tasas de sedimentación nos indican que tan eficiente está siendo este proceso, de lo contrario, se tiene que modificar la alimentación con el fin de aumentar la eficiencia. Estos separan entre el 25% y 50% de los sólidos suspendidos. La razón de ser es permitir tener un flujo de agua más limpio, por eso es necesario monitorear el flujo de alimentación, ya que, si este es muy alto, los lodos no se podrán sedimentar y por lo tanto el proceso se complica y disminuye la calidad del agua a obtener, y por otro lado si la alimentación es muy lenta, el proceso como tal se estanca.

Tratamiento secundario

4. Tanque de aireación: El aire es bombeado dentro del tanque con el fin de promover el crecimiento de bacterias. La aeración se puede conseguir a través de una bomba o por medio de una agitación turbulenta para que se añada aire al agua. El oxígeno disuelto es clave en este proceso para determinar las mejores condiciones para las bacterias. Los parámetros esenciales son el DBO que es la demanda biológica de oxígeno, donde este nos indica la cantidad de materia orgánica existente, si esta baja, es un indicador de que las bacterias están haciendo correctamente su trabajo de degradación. Otros parámetros útiles para el control de esta unidad es el pH, temperatura, oxígeno disuelto, sólidos suspendidos totales, etc.
5. La sedimentación secundaria: Este tiene la finalidad de separar cualquier materia orgánica restante para permitir un flujo aún más limpio. Principalmente ahora los sólidos a separar se denominan lodos activados y estos están constituidos en mayor parte de bacterias. Usualmente se suele utilizar una parte de estos lodos activados como inóculo para el tanque de aireación para ayudar en la propagación de bacterias y, por ende, la disminución de materia orgánica. El resto es descartado. Comúnmente se usa un tanque horizontal de sedimentación, este requiere la remoción continua de lodos por una succión en el fondo de este. Este permite aprovechar en mayor medida el área efectiva del tanque, es decir, no habrá áreas muertas.
6. Desinfección o cloración: El cloro es añadido para matar cualquier resto de bacteria, proveniente de la unidad anterior. Este es el método más utilizado y viable económicamente, sin embargo, últimamente se ha utilizado los rayos UV y ozono, pero estos tienden a hacer más caro. Es necesario medir el nivel de cloro antes de la disposición final del agua, para confirmar que este en parámetros aceptables.

(Cole Parmer, 2021) (Environmental Protection Agency, s.f)

Las plantas que utilizan procesos biológicos para remover nutrientes tales como el fósforo y nitrógeno son conocidas como BNR – Biological Nutrient Removal Plants-. El método más común para la remoción de nitrógeno es conocido como el conjunto de nitrificación-desnitrificación. Los compuestos nitrogenados en las aguas residuales ordinarias son formados por la degradación progresiva de las proteínas y urea que provienen de los desechos humanos. Los límites establecidos de nitrógeno total son los siguientes de acuerdo con el CEC, 1991

- Poblaciones entre 10,000 y 100,000 habitantes, deben tener una concentración menos de 15 ppm o una remoción mínima del 70-80%
- Poblaciones arriba de 100,000 personas, deben tener una concentración menor a 10 ppm o una remoción mínima del 70-80%.

Cuando se analiza la posibilidad y el deseo de incorporar este tipo de plantas, se deben mantener una escala de prioridades. Muchos de los países más desarrollados ya resolvieron sus problemas en términos de DQO y DBO en sus caudales de salida de agua y ahora se mueven a otra etapa. (Sperling, 2007).

La caracterización de la materia en términos de nitrógeno es representada de la siguiente manera:

- La materia inorgánica nitrogenada es representada por el amoníaco tanto como el amonio. En la realidad, el amoníaco es presentado como una entrada en los flujos de aguas residuales por el hecho de la hidrólisis y la reacción de amonificación en el momento de la colección de aguas residuales. El amoníaco es usado tanto por bacterias autótrofas como heterótrofas
- La materia orgánica nitrogenada se clasifica por su biodegradabilidad.
  - Inerte
    - Soluble: Esta fracción se puede ignorar por lo pequeña que es
    - Particulada: La fracción asociada a lo no biodegradable de la materia orgánica del carbono, envuelta en la biomasa y removida por el exceso de lodos.
  - Biodegradable: La fracción biodegradable se puede subdividir en las siguientes:
    - Rápida degradación: La materia nitrogenada que se degrada rápido se encuentra en forma soluble y es convertida por bacterias heterotróficas en amoníaco, por el proceso de amonificación
    - Lenta degradación: Esta materia que se degrada lento se puede encontrar particulada, siendo convertida a una molécula soluble, por medio de una hidrólisis. Esta hidrólisis toma lugar al mismo tiempo que la hidrólisis de materia orgánica proveniente del carbono.

(Sperling, 2007)

La caracterización de la biomasa el cual es la responsable de la degradación biológica se divide así:

- Biomasa activa heterótrofa: La fuente de carbono de los microorganismos heterotróficos es la materia orgánica carbonatada. La biomasa heterótrofa utiliza rápidamente la materia orgánica biodegradable. La energía asociada a dichas moléculas es incorporada a la biomasa, mientras que el resto es usado para otorgarle a los microorganismos energía. En el tratamiento aeróbico, el crecimiento o acumulación de dicha biomasa ocurre en condiciones aeróbicas o anóxicas. El crecimiento es lento en condiciones anaeróbicas. Las bacterias heterótrofas usan al nitrógeno en forma de amoníaco para la síntesis y el nitrógeno en forma de nitrato como un aceptor de electrones. El decaimiento de biomasa heterótrofa genera además de un residuo inerte, materia carbonatada y nitrogenada de degradación

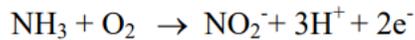
lenta. Este material necesita ser sometido a una hidrólisis para convertirse en materia que se degrada rápidamente, para que pueda usar otra vez por las mismas bacterias (Sperling, 2007).

- Biomasa activa autótrofa: La fuente de carbono para los microorganismos autótrofos es dióxido de carbono. Estos utilizan amoníaco como una fuente de energía. Bajo condiciones aerobias, estas bacterias utilizan el amoníaco del proceso de nitrificación. De manera similar, ocurre para los organismos heterótrofos. La degradación de la biomasa autótrofa igual genera un residuo inerte de lenta degradación (Sperling, 2007).

El residuo inerte formado por la degradación de la biomasa puede ocurrir por la acción de diferentes mecanismos, como el metabolismo endógeno, muerte, depredación entre otros.

### C. Nitrificación

La nitrificación es un proceso microbiano donde los compuestos reducidos de nitrógeno principalmente amoníaco básicamente son oxidados hacia nitratos. El amoníaco se produce principalmente por la descomposición del nitrógeno orgánico tal como proteínas y otras cosas. La nitrificación se lleva a cabo a partir de un grupo de bacterias autótrofas que utilizan el amoníaco como fuente de energía. La reacción completa de nitrificación se lleva en dos pasos.



En el segundo paso, las bacterias oxidan el nitrito hasta el nitrato. La bacteria más usual que se encarga de esta reacción es la *Nitrobacter*. La energía liberada en estas reacciones es usada por los microorganismos nitrificadores en la síntesis de compuestos orgánicos a partir de fuentes inorgánicas de carbono, como dióxido de carbono, bicarbonato y carbonato. Por lo tanto, la nitrificación está relacionada con el crecimiento de bacterias nitrificadoras. La tasa de crecimiento de los microorganismos nitrificadores, principalmente los *Nitrosomonas* son lentos, siendo más bajo que aquellas bacterias responsables de la degradación de materia orgánica de carbono. Por lo que un tratamiento biológico, donde la nitrificación quiera ser alcanzada, el promedio del tiempo de residencia o el lodo activado, van a permitir el desarrollo de bacterias nitrificadores, justo antes que estas sean desechadas del sistema de tratamiento. Dicho sistema, esta dictado por la velocidad de crecimiento de los *Nitrosomonas*, la cual es la más lenta. Las bacterias del género *Nitrobacter* tienden a tener una tasa de crecimiento más rápida y por esa razón no hay acumulación de nitritos en el sistema (Sperling, 2007).

Varios grupos de bacterias heterótrofas y hongos también pueden llevar a cabo la nitrificación, pero a una menor velocidad que las autótrofas. Sin embargo, en el rubro de tratamientos de aguas residuales, la nitrificación heterótrofa si ocurre (EPA, 2002).

Los factores que afectan la nitrificación son varios, la constante cinética es modelada como constante sin embargo, esta no será constante debido a que cada agua residual tendrá su propia. La temperatura es otro factor debido a que cambia completamente la constante. El reactor utilizada para llevar esta reacción tiene que estar aireado debido a que los organismos que ejecuta dicha reacción son aerobios.

La temperatura afecta significativamente la tasa de crecimiento máximo de los organismos nitrificadores. De acuerdo con Downing 1978, el efecto de la temperatura se ve dictado por esta ecuación.

**Ecuación 1.** Tasa de crecimiento modificada por la temperatura

$$\mu_{\max (T)} = \mu_{\max (20^{\circ}\text{C})} * \theta^{(T-20)}$$

Donde:

$\mu_{\max}$  es la máxima tasa de crecimiento a una temperatura dada

T es la temperatura en Celsius

$\theta$  es el coeficiente de temperatura

(Sperling, 2007).

La tasa de nitrificación tiene su máximo desempeño y es constante a un pH de 7.2 – 8.0. Debajo del límite inferior, la velocidad máxima de crecimiento decrece de acuerdo con la siguiente ecuación.

**Ecuación 2.** Tasa de crecimiento modificada por el pH

$$\mu_{\max (pH)} = \mu_{\max} [1 - 0.83(7.2 - pH)]$$

Donde:

$\mu_{\max(pH)}$  es la velocidad máxima de crecimiento a un pH dado

$\mu_{\max}$  es la velocidad máxima de crecimiento a un pH de 7.2

(Sperling, 2007).

El oxígeno disuelto en el reactor es un requisito indispensable para que ocurra la nitrificación. La concentración crítica de OD no debe bajar, el cual es alrededor de 0.2 ppm. Sin embargo, se desea que esté la concentración en valores más alto para asegurar que en espacios muertos dentro del tanque, haya un exceso de oxígeno y por lo tanto se pueda dar la reacción. El efecto del OD se refleja en la relación mostrada.

**Ecuación 3.** Tasa de crecimiento modificada por el oxígeno disuelto

$$\mu = \mu_{\max} * \left( \frac{DO}{K_o + DO} \right)$$

Donde:

DO es la concentración de oxígeno disuelto en ppm

$K_o$  es la constante de saturación medio del oxígeno en ppm

$\mu_{max}$  es la velocidad máxima de crecimiento

$\mu$  es la velocidad de crecimiento a dicha concentración de OD

(Sperling, 2007).

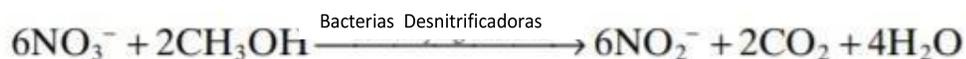
Existen ciertas sustancias tóxicas que pueden inhibir el crecimiento de las bacterias nitrificadoras, principalmente, las *Nitrosomonas* ya que estas son más sensibles. Uno de los aspectos más importantes en el diseño de una PTA es analizar la composición de la alimentación de la planta y si en dado caso se observa un compuesto inhibidor, lo más seguro es que se requiera un pretratamiento.

La oxidación del amoníaco implica un consumo de oxígeno, el cual debería de estar incluido en los requerimientos de oxígeno. El nitrógeno orgánico presente también en los desagües no necesariamente es sometido la nitrificación, pero es convertido inicialmente en amoníaco, por lo cual eventualmente es convertido a nitrato. Por lo que se asume que el nitrógeno orgánico y amoníaco son capaces de generar un consumo de oxígeno en el proceso de nitrificación. La suma de todo el nitrógeno orgánica y el amoníaco es representado por NTK (Nitrógeno total de Kjeldahl). Puede considerarse que en un desagüe, el NTK representa el total del nitrógeno entrante, ya que los nitritos y nitratos en la entrada se pueden tomar como mínimos. Por lo tanto el NTK el nitrógeno que tiene la capacidad de ser oxidado hacia la forma de nitratos. Las bacterias responsables de la nitrificación tienen un ritmo de crecimiento bastante lento, además que son muy sensibles a los cambios en el ambiente, por lo que la nitrificación queda sujeta que se cumplan ciertas condiciones para que esta se pueda dar. En las plantas de tratamiento de aguas aerobias, que se encuentran en climas tropicales o calientes, las posibilidades que ocurran la nitrificación son bastante altas, debido a que esas mismas temperaturas aceleran la tasa de crecimiento de los microorganismos nitrificadores. Por lo que si se recomienda por precauciones incluir la demanda de oxígeno por nitrificación en los requerimientos totales de oxígeno. La desnitrificación implica un descenso en los requerimientos de oxígeno, sin embargo para obtener ahorros económicos como energéticos, la desnitrificación debería incluirse como una meta fija al momento del diseño de la planta. La presencia de condiciones anóxicas es esencial para que ocurra dicha reacción (Sperling, 2007).

#### D. Desnitrificación

La desnitrificación es el proceso microbiológico que consta básicamente en reducir nitratos –  $\text{NO}_3^-$  y nitritos en gases como el óxido nitroso y nitrógeno molecular. Esta es llevada a cabo por una variedad de microorganismos que se explicarán más tarde. La desnitrificación ocurre como una respuesta a los cambios en la concentración del oxígeno. La clave está en cuando la concentración de oxígeno esta baja, en ese momento los microorganismos cambian su respiración aerobia por una anaerobia por lo que empiezan a aceptar los nitratos como un receptor de electrones. Las reacciones de la desnitrificación son las siguientes (Skiba, 2008).

**Figura 2.** Reacciones de desnitrificación con la fuente externa de carbono



En sistemas biológicos de remoción de nitrógeno, el nitrógeno es removido por una transferencia desde la fase líquida para las fases sólidas y gaseosas. Aproximadamente un 20% del nitrógeno de entrada es incorporado al proceso como lodos activados, pero el resto de nitrógeno es removido a partir de la desnitrificación por la transferencia a la fase gaseosa del nitrógeno. En el proceso nitrificación, el nitrógeno se queda en la fase líquida porque se transforma desde amoníaco a nitrato. En la desnitrificación, el nitrógeno pasa de líquido a la fase gaseosa y se escapa a la atmósfera (Henze et al, 2020).

La desnitrificación consta de un proceso de dos etapas, ya que los nitritos pueden actuar como intermediarios. A esto se le conoce como disimilación. El primer paso consta en la reducción de nitrato a nitrito, mientras que el segundo se basa en la reducción de nitrito a nitrógeno gaseoso. En ciertos microorganismos la reacción llega hasta la producción de óxido nitroso pero generalmente todas las bacterias llegan generalmente a producir  $\text{N}_2$  (Riffat & Husnain, 2020).

La desnitrificación posee varios beneficios tales como la reducción de nitratos, lo que se ve reflejado en una disminución de lodos activados. También se puede recuperar la alcalinidad del reactor donde se esté llevando la reacción. Se reduce la demanda de oxígeno, algo que cabe aclarar es que bajo condiciones anóxicas, el ion nitrato funciona como aceptor de electrones en lugar del oxígeno disuelto en el proceso de degradación de materia orgánica por microorganismos heterótrofos facultativos. El oxígeno equivalente de un ion nitrato es de 2.86 mg  $\text{O}_2$  / mg  $\text{NO}_3\text{N}$  lo que significa que 1 mg de  $\text{NO}_3\text{N}$  convertido en nitrógeno molecular tiene la misma capacidad de aceptar electrones que 2.86 mg de oxígeno puro. En la nitrificación, el nitrógeno cambia de un estado de valencia de -3 a +5. Ahora en desnitrificación, el nitrógeno pasa de un estado de +5 a 0. Por lo tanto 1 mg de nitrato convertido a nitrógeno molecular en el tanque anóxico requerirá 8.6 mg de DQO. 2.86 mg menos de oxígeno que se provee en el tanque aeróbico. Una vez que se establece que hay una oportunidad de la nitrificación es impecable considerar adjuntar a este proceso, la desnitrificación, ya que se puede tener una recuperación de oxígeno de hasta el 50% (Henze et al, 2020).

Como resultado de los diferentes mecanismos de reducción de nitrógeno, es impecable establecer donde se ubicará el tanque anóxico. Existen diferentes configuraciones o maneras para hallar dicha posición pero al final aquí se dictamina 2. Existe el método post-desnitrificación y pre-desnitrificación. Con la primera mencionada, el primer reactor es aeróbico que es aquí donde se lleva la nitrificación, ahora el segundo reactor es anóxico. El efluente es descargado en el reactor aeróbico donde se propicia el crecimiento de bacterias heterótrofas y nitrificadoras. Suponiendo que la vida del lodo es lo suficientemente largo y que su porción aireada sea suficiente, la nitrificación en teoría debería darse completa. La mezcla del reactor aeróbico pasa al reactor anóxico. El efluente de este segundo reactor pasa por un tanque sedimentador y es recirculado al tanque aeróbico. El DQO liberado en el primer tanque sirve como fuente de carbono externa para

que se lleve a cabo la desnitrificación en el 2do. Sin embargo, la tasa con la que se libera dicha energía o fuente es lenta y baja por lo que la desnitrificación de la misma manera. Teóricamente, este proceso tiene la capacidad de remover todos los nitratos, pero ya en la industria, se necesita tener una tanque anóxico muy grande para que eso se lleve a cabo, pero si en dado caso ocurre eso, la nitrificación ya no ocurrir iría y por ende no habrían nitratos que remover, también otro factor a tomar en cuenta es que los microorganismos mueren, y al morir liberan amoníaco, reduciendo así la eficiencia del proceso de remoción de nitrógeno, sin embargo para este problema, las medidas que usualmente se toman, es de re airear un reactor posterior al anóxico, para provocar la nitrificación y hacer una recirculación hacia el tanque anóxico para inducir de nuevo la desnitrificación. Los problemas descritos demuestran que este proceso no es viable industrialmente (Henze et al, 2020).

En 1962, Ludzack y Ettinger propusieron el primer sistema nitrificación-desnitrificación, donde el principio consistía en utilizar los compuestos orgánicos biodegradables que venían en el flujo de entrada como fuente para la desnitrificación. Este proceso consiste en dos reactores conectados en serie, donde el flujo principal entra de primero al tanque anóxico, donde este se mezcla sin aireación. El segundo reactor posee aireación y es ahí donde se da la nitrificación, luego la salida de este tanque se dirige a un sedimentador, donde lo sedimentando se recircula al tanque anóxico, utilizando las bacterias presentes en ese lodo para seguir estimulando la desnitrificación en el primer reactor, sin embargo, se le hicieron modificaciones al proceso, siendo una de ellas, también recircular cierto volumen del tanque aeróbico al tanque anóxico, esta modificación provocó una mejora en la remoción del nitrógeno (Henze et al, 2020).

Debido a las ineficiencias en la remoción de N en el sistema de Ludzack y Ettinger, Barnard planteó otro proceso, donde la diferencia era la adición de segundo reactor anóxico y un reactor de aireación. Este autor planteó que la poca concentración de nitratos a la salida del reactor aeróbico fuera dirigida al segundo reactor anóxico para llevar a cabo la desnitrificación ahí, y por lo tanto dar un efluente libre de nitratos, mientras que la función del tanque de aireación posterior es retirar el nitrógeno gaseoso que se libera de la desnitrificación. Teóricamente, este proceso puede dar un efluente libre de nitrógeno, sin embargo, para que eso pase en la industria tiene que haber una relación Nitrógeno/DQO muy baja, por lo que al final sale más rentable desechar el segundo reactor anóxico así también como el de aireación, y mejor se utiliza un reactor primario anóxico más grande y se aumenta la recirculación de mezcla de lodos activados (Henze et al, 2020).

La concentración de nitratos por litro de afluente que un tanque anóxico puede desnitrificar por rutas biológicas es conocido como el potencial de desnitrificación, esta dependerá en su mayoría de la carga de nitratos que entra al reactor anóxico. Si poca concentración de nitratos es reciclada al reactor anóxico, el flujo total reciclado de nitratos será desnitrificado y la remoción de nitratos, en general será más baja que lo previsto. Por lo tanto para aumentar la desnitrificación es necesario incrementar la relación de recirculación, ya que esta aumentará la carga de nitratos en el reactor. Una vez que las relaciones de reflujo permitan que la carga de nitratos sea igual a la desnitrificación máxima, entonces el sistema entero está en equilibrio y si llega al punto máximo u óptimo de la operación. Cabe destacar que a partir de este punto, el aumentar la relación de reflujo no influirá en una mayor tasa de desnitrificación debido a que el sistema ya se encuentra en su límites en términos biológicos o cinéticos. Es más, si se siguen aumento los flujos de recirculación por arriba del

potencial del reactor, el proceso ya no es rentable económicamente debido al aumento de energía ya que se aumenta la capacidad de bombeo de dicha bomba y también por dicho bombeo, se agrega más oxígeno disuelto y eso le quita las propiedades anóxicas al tanque, y si aumento el oxígeno en dicho tanque, la capacidad desnitrificadora disminuye. Finalmente, en resumen del principio de diseño para una desnitrificación se basa en 3 pasos, el primero es calcular el potencial de desnitrificación de dicho reactor anóxico, el segundo paso es establecer la carga de nitrato para que esta sea igual o similar al potencial de desnitrificación, ahora el último se basa en calcular las relaciones de reflujo para el 2do paso (Henze et al, 2020).

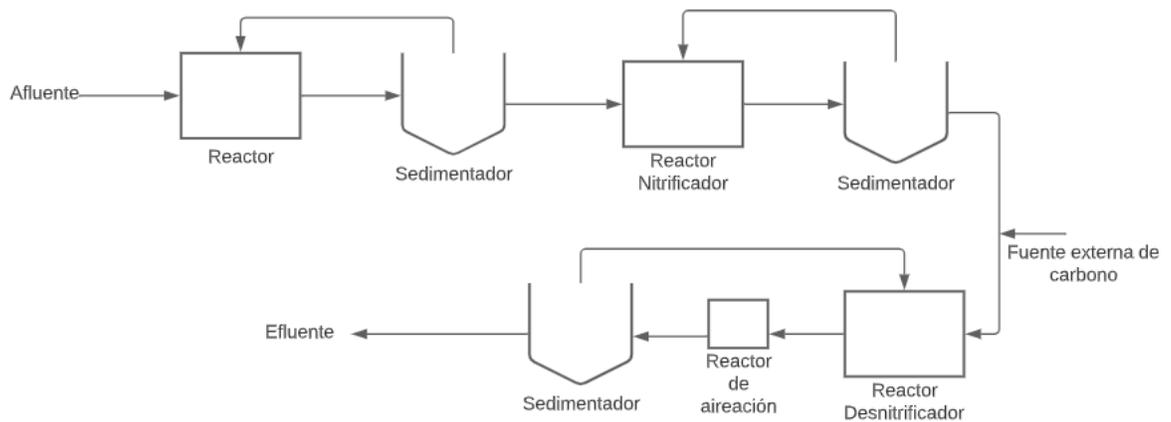
Existe otro proceso llamada Bardenpho, donde este corresponde a una combinación de los descritos previamente, donde contemplará la pre desnitrificación y post desnitrificación, además de una zona de aireación final. La eficiencia de remoción de nitrógeno es alta, al menos de un 90%, ya que los nitratos que no son removidos en el primer tanque anóxico tendrán una nueva oportunidad de ser removidos en el segundo tanque anóxico. La desventaja es que requiere reactores con un gran volumen, sin embargo, cuando se requiere una alta eficiencia de nitrógeno, este aspecto debería considerarse como un requisito y no como un problema (Sperling, 2007).

**Tabla 2.** Capacidad de remoción de nitrógeno total dependiendo del sistema a utilizar

Proceso	Amoníaco	Nitrógeno total		
	< 5ppm	8-12 ppm	6-8 ppm	3-6 ppm
Reactor pre desnitrificación	X	X	X	
Reactor post desnitrificación	X	X		
Bardenpho	X	X	X	X

El proceso de desnitrificación donde se utiliza una fuente externa de energía fue propuesto por Barth, Bremmer y Lewis. El sistema consiste en tres etapas completamente separadas. Cada etapa opera con su propio reactor, tanque sedimentador, su propio lodo activado y una recirculación. La primera etapa es aerobia y tiene un tiempo residencia muy corto. El objetivo de esta es remover las fuentes de carbono del agua. El efluente de la primera etapa pasa a la segunda etapa la cual opera a un tiempo de residencia más largo donde esta tiene como objetivo inducir la nitrificación, donde el lodo activado estará compuesto principalmente de microorganismos nitrificadores. Finalmente el efluente de esta etapa pasa a la última la cual es anóxica donde se dará la desnitrificación. Aquí la fuente externa de carbono se alimentará al tanque, manteniendo siempre, el ambiente anóxico donde el metabolismo de los microorganismos se dará a partir del uso de nitrato como aceptor de electrones.

**Figura 3.** Proceso de Bath, Bremmer y Lewis



Los sistemas de nitrificación-desnitrificación en donde la respiración endógena provee la energía necesaria para la desnitrificación fue propuesto por Wuhmann. Es uno de los sistemas donde se basa en un solo sistema o etapa. Este consiste en dos reactores en serie, donde el primero es aeróbico y el segundo anóxico. El afluente es descargado al primer reactor donde se lleva a cabo el crecimiento de bacterias heterótrofas y nitrificadores. Después de la formación del lodo activado, la nitrificación se lleva a cabo en dicho reactor. La mezcla del primer reactor se dirige hacia el segundo reactor, donde se mantiene una agitación, mas no aireación. El flujo de salida del reactor anóxico pasa al tanque sedimentador y una pequeña porción de dicho flujo se recircula al reactor aeróbico.

La energía liberada por los microorganismos debido a la pérdida de masa celular provee la fuente de energía para la desnitrificación en el reactor anóxico. Sin embargo, la tasa con la que se libera dicha energía endógena es baja, por lo que la tasa de desnitrificación será baja también. Por lo que si se quiere una tasa de remoción más alta, es necesario tener una porción anóxica más grande en el reactor, pero si se hace esto, la nitrificación se puede ver interrumpida. Teóricamente, este sistema propuesto tiene la capacidad de remover todos los nitratos posibles, pero desde un punto de vista práctico, no es posible debido a que la condición anóxica no se puede aplicar a todo el sistema de lo contrario, nunca se formará nitratos, por la falta de nitrificación.

La generación de energía en células microbianas va a depender de los microorganismos, puede ser a través de la respiración celular (catabolismo oxidativo) o fermentación (catabolismo fermentativo). En términos generales, la oxidación implica la pérdida de uno o más electrones por parte de la sustancia que está siendo oxidada. La materia oxidada puede ser materia orgánica, o compuestos inorgánicos, ya que ambos serán donadores de electrones. Los electrones son llevados desde la molécula oxidada a través de reacciones bioquímicas con la ayuda de enzimas específicas hacia otro componente que es denominado como aceptor de electrones. Cuando varios compuestos aceptores de electrones están disponibles en el medio de fermentación u otro, los microorganismos van a usar el que produzca una mayor cantidad de energía. Por esta razón, el oxígeno disuelto es el primero en ser usado, y después que se acaba, el sistema deja de ser aeróbico. Si hay nitratos libres en el medio fermentativo, los microorganismos son capaces de utilizar dichos nitratos en su ciclo de respiración y por ende llevar a cabo la desnitrificación. Estas condiciones permiten que el medio se le denomine como anóxico. Ahora describiendo, otra situación, cuando los nitratos se acaban, el medio es llamada anaeróbico, en estas condiciones, los sulfatos son usados y reducidos a sulfuros, y el dióxido de carbono es convertido a metano (Sperling, 2007).

En las plantas de tratamiento aeróbico, el oxígeno presente en la misma tiene que cumplir con la oxidación de materia orgánica, donde esta engloba la oxidación de carbono para darle energía a los microorganismos, y para la respiración de las células bacterianas. Finalmente, también necesita oxidar la materia presente que posee nitrógeno. En los sistemas con una desnitrificación biológica, los ahorros de oxígeno por la misma reacción deben ser tomados en cuenta

Los microorganismos heterótrofos son aquellos que dependen de una fuente de carbón para vivir. Aquí se incluyen diferentes tales como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paracoccus*. Estos microorganismos son aerobios, lo que significa que van a depender del  $O_2$  pero pueden transportarse a condiciones anaerobias cuando la concentración de oxígeno es baja o nula. Algo importante es que las enzimas que utilizan estos microorganismos para llevar a cabo la desnitrificación son activadas al bajar la presión parcial del oxígeno. La habilidad previamente explicada de sobrevivir en ambientes aerobios o anóxicos, les permite ser microorganismos altamente resistentes (Skiba, 2008).

Los requerimientos para que la desnitrificación ocurra son concentraciones bajas de oxígeno. La desnitrificación solo pasará cuando la población microbiana cambie de respiración aerobia a anaerobia, si el sistema de aguas residuales está muy aireado o con una alta concentración de oxígeno, los microorganismos no llevarán a cabo la desnitrificación. También puede existir cierta competencia entre microorganismos ya sea por la fuente de carbón por los nitratos. El carbón para añadir en esta etapa puede ser en forma de aguas residuales, el cual contiene un gran DBO, o añadiendo una fuente externa de carbón tales como etanol, metanol, glicerol, etc. Cuando una planta de tratamiento de aguas residuales requiere una gran remoción de nitrógeno, la materia orgánica presente en la misma resultará ser muy poca para llegar al nivel de desnitrificación. (Skiba, 2008).

La desnitrificación en aguas residuales usualmente siempre llega al producto final que  $N_2$ . Esta ocurre en los milímetros más altos de los sedimentos y las tasas de desnitrificación dependerán de las concentraciones de carbono orgánico y nitrógeno (Skiba, 2008).

Cuando ocurre la nitrificación, se debería de incluir la desnitrificación para que también se logre esta. Las ventajas de la inclusión de esta son las siguientes:

1. Economía de oxígeno: Como se observó antes, la oxidación de 1 mg de nitrógeno en forma amoniacal implica el consumo de 4.57 g de oxígeno. Por lo que si se obtiene una desnitrificación completa, se estaría salvando 62.5% de lo que se consume cuando se realiza la nitrificación. En el diseño de plantas, esto se debe de tomar en cuenta, por si se quiere hacer una reducción en la potencia de los aireadores. En la operación de la planta, la desnitrificación hará posible la reducción del consumo de energía, suponiendo que siempre se mantendrá controlado el nivel OD en los tanques aerobios.
2. Economía de alcalinidad: Es importante mantener en el nivel correcto la alcalinidad, ya que eso permitirá que el pH se mantenga estable para que ocurra una exitosa nitrificación. Por cada reducción de un mol de nitrato, se da un consumo de un mol de un ion hidronio. Durante la nitrificación, la formación de un mol de nitrato provoca la producción de dos moles de hidronios. Por lo que si la desnitrificación es incorporada a la PTAR, puede existir teóricamente la reducción del 50% de la liberación de iones hidronio, por lo que habrá una alcalinidad reducida en un 50%.
3. Tanque secundario de sedimentación: En estos tanques, el lodo activado tiene un tiempo de pausa. Para los flujos en la nitrificación, bajo ciertas condiciones, como por ejemplo las altas temperaturas, la situación se vuelve más favorable para que ocurra la desnitrificación

en este tanque de sedimentación. Por lo tanto, los nitratos formados en el reactor aerobio serán reducidos a nitrógeno gaseoso en el segundo tanque sedimentador. Esto implica la generación de pequeñas burbujas de nitrógeno gaseoso que se pegará al lodo activado, provocando que sedimenten, y que por lo tanto floten. Este lodo saldrá en el efluente, deteriorando la calidad de las aguas residuales de acuerdo con las disposiciones. Este efecto se da en país con climas templados o calientes, donde la misma temperatura afecta grandemente en el favor de la nitrificación y desnitrificación. Por lo que resulta imperativo, que la desnitrificación no se lleve a cabo en este 2do tanque de sedimentación.

4. Control de nutrientes: Usualmente con la desnitrificación, el primer punto a tratar es evitar la eutrofización de los cuerpos de agua a partir de la remoción de nutrientes en las aguas residuales como el nitrógeno. Ahora, cabe destacar que no todos los efluentes que provienen de las aguas residuales son descartados en cuerpos de agua limpios. Como segundo aspecto a recalcar, es que las cianobacterias, las cuales son comúnmente asociadas a etapas muy avanzadas de la eutrofización, en donde estas proliferan en gran cantidad, es que tienen la capacidad de absorber el nitrógeno atmosférico y convertirlo a una manera donde ellos asimilen dicho nitrógeno. Por lo que el nitrógeno en medio líquido no es un factor limitante para estos organismos, por lo que el único nutriente limitante para ellos es el fósforo

(Sperling, 2007)

La ausencia de oxígeno es un requisito fundamental para que ocurra la desnitrificación. Las condiciones anóxicas son necesitadas dentro del tanque de forma inmediata para las bacterias. Es posible que haya oxígeno disuelto a bajas concentraciones en el medio a fermentar y es posible que la desnitrificación se dé, pero por el hecho de que las bacterias estén un microambiente anóxico. La ecuación que determinar la tasa de desnitrificación es la siguiente:

**Ecuación 4.** Tasa de desnitrificación afectada por el oxígeno disuelto

$$SDR_{DO} = SDR_{20^{\circ}\text{C}} * (1.0 - DO)$$

Donde:

$SDR_{20^{\circ}\text{C}}$  es la tasa específica de desnitrificación con inhibición en la presencia de OD

$SDR$  es la tasa específica de desnitrificación

OD es el oxígeno disuelto

(Sperling, 2007).

La tasa específica de crecimiento de las bacterias desnitrificadoras puede modelarse de acuerdo con la ecuación de Monod.

**Ecuación 5.** Velocidad de crecimiento a partir de Monod

$$\mu = \mu_{max} * \left( \frac{S}{K_S + S} \right) * \left( \frac{NO_3^-}{K_{NO_3^-} + NO_3^-} \right) * \left( \frac{K_O}{K_O + DO} \right)$$

Naturalmente, en un reactor anóxico bien diseñado y operado, el oxígeno disuelto debería de estar muy cercano a cero, ya que no hay aireación en esa zona. La desnitrificación puede ocurrir en ese reactor de una forma correcta.

Cabe destacar que es generalmente aceptado que como se ha mencionado, la presencia de oxígeno disuelto inhibe la desnitrificación, sin embargo, el mecanismo de dicha inhibición a nivel celular todavía se desconoce. El oxígeno disuelto puede reprimir la formación de la enzima nitrato reductasa o actúa como un aceptor de electrones bloqueando el uso de los nitratos. Un problema grande al momento de cuantificar la influencia de la concentración de oxígeno disuelto en la desnitrificación es que los gradientes de concentración provocan el desarrollo de flóculos de microorganismos por lo que la concentración de oxígeno disuelto puede variar en ciertas partes del reactor en comparación con el oxígeno medido para todo el reactor. Es más, por eso se ha visto que en ciertos reactores aerobios se ha logrado llevar la desnitrificación, ya que en ciertas ubicaciones de dicho reactores, hay microambientes anóxicos.

La temperatura es un factor importante para un desenlace correcto de la desnitrificación. La actividad microbiana a menos de 5°C tenderá a ser muy lenta, después linealmente empieza a aumentar a una temperatura pico entre 25°C y 30 °C a temperaturas más altas se vuelve más lenta la actividad debido a la desnaturalización de las enzimas entro de los microorganismos. Ciertos microorganismos han logrado evolucionar a sobrevivir a temperaturas extremas ya sean calientes o frías. Esta también tiene 2 efectos como tal. El primero es que afecta la tasa de difusión de los sustratos y nutrientes hacia las células bacterianas. El segundo es que afecta la tasa de actividad enzimática. Sin embargo, para esta última si afecta demasiado, ya que por cada 10 grados centígrados de aumento, la actividad enzimática se vuelve el doble, pero no hay que exceder el límite ya que las enzimas son proteínas por lo que a una temperatura muy alta perderán su función. La influencia de la temperatura se ve dictada por la siguiente ecuación (Gerardi, 2006) (Sperling, 2007).

**Ecuación 6.** Tasa de desnitrificación afectada por la temperatura

$$SDR_T = SDR_{20^\circ C} * \theta^{(T-20)}$$

Donde:

$SDR_{20^\circ C}$  es la tasa específica de desnitrificación a una temperatura de 20 °C

SDR es la tasa específica de desnitrificación a una temperatura dada

T es la temperatura del medio

$\theta$  es el coeficiente de temperatura

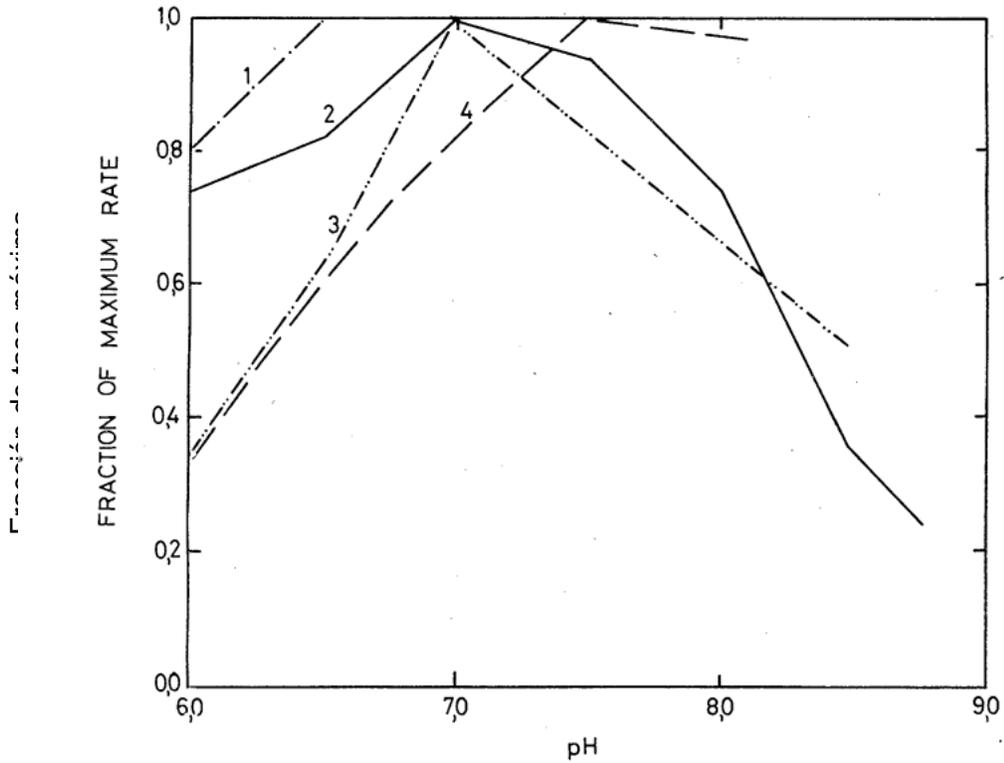
(Sperling, 2007)

La cantidad soluble de cBOD es el factor más importante que influencia en la desnitrificación. Mientras más grande sea la cantidad soluble de cBOD, mayor será la demanda por aceptadores de electrones como nitratos y oxígeno molecular. Mientras el cBOD es degradado en las células bacterianas, los electrones son liberados y aceptados por los receptores, por lo que el oxígeno será eliminado más rápido y por lo tanto ocurrirá de manera más sencilla la desnitrificación (Gerardi, 2006).

Como se mencionó la desnitrificación es un proceso biológico. Por lo que la competición entre especies es un factor crítico para el éxito de un tratamiento biológico. El principio dice que solo una especie puede ocupar un lugar o nicho en cualquier tiempo. La especie que ocupe el nicho va a ser la especie que puede utilizar los recursos que les proporciona el ambiente donde se encuentran de una manera eficiente. Aun así hay ciertos parámetros que afectan el crecimiento de la bacteria independientemente de la competición (Gerardi, 2006).

El pH es uno, ya que todas las bacterias tienen un pH óptimo en el cual crecen mejor. Para la mayoría esto suele ser neutral o sea de 7, siendo un rango general aceptable de [6-8]. Los problemas que pueden ocurrir cuando se trabajan a procesos con un pH menor a 6, serán una ralentización de la actividad enzimática, se fomentará la formación del sulfuro de hidrógeno, no ocurrirá la nitrificación y mucho menos la desnitrificación. Mientras que si se trabaja con un pH mayor a 8, habrá un incremento de amoníaco. Un aspecto para tomar en cuenta es que las bacterias desnitrificadoras incrementan el pH de la unidad bajo tratamiento debido a la liberación de iones hidroxilo (Gerardi, 2006).

**Figura 4.** Comportamiento de la tasa de desnitrificación frente al pH



Las sustancias tóxicas también pueden afectar. La ruta principal es que es la desnitrificación ocurra después que la nitrificación, como previamente se discutió. Las bacterias nitrificadores son mucho más sensibles a sustancias inhibidoras o tóxicas que las bacterias heterótrofas. Siguiendo, las bacterias desnitrificadoras están presentes en varias especies, lo cual reduce el impacto que tenga algún potencial agente inhibidor. Además, si sustancias tóxicas o inhibidoras están presentes, es mucho más probable que la desnitrificación se vea reducida o eliminada simplemente, porque no hay nitratos y por ende, porque no se llevó a cabo la nitrificación.

Las bacterias desnitrificadoras reducen los nitratos a cBOD, cuando el oxígeno moléculas no se encuentran presente en el ambiente, a esto se le conoce como una reducción disimilatoria de nitratos, ya que el nitrógeno separado no lo incorporan a su ciclo celular, solo se queda con el oxígeno mientras que el nitrógeno lo liberan. Cuando este proceso lo utilizan para su respiración celular, lo hacen porque necesitan al nitrógeno como nutriente. El nutriente en forma de nitrógeno preferido para las bacterias es el amonio, por lo que cuando no está disponible, usan los nitratos (Gerardi, 2006).

Los sistemas de nitrificación-desnitrificación pueden ser clasificados de acuerdo con el material orgánica que sea utilizado en la desnitrificación:

1. Las fuentes de energía no están presentes en las aguas residuales, por lo que se tiene que añadir una fuente de carbono externa justo en el momento donde ocurre la desnitrificación. Normalmente se utiliza metanol, metano, etanol, acetona y ácido acético

2. Las fuentes de energía están presentes en las aguas residuales, por lo que ya existe una fuente de carbono para que se lleve la desnitrificación
3. Las fuentes de energía que son generadas dentro del sistema a través de la liberación de nutrientes por organismos como resultados de su muerte o una lisis celular

La frecuencia con la que pueda ocurrir la desnitrificación puede ser de manera intencional o accidental. La intencional se va a observar como un producto de un proceso anóxico para llegar a la desnitrificación deseada. Un período anóxico necesita establecerse en un tanque donde se quiera llevar a cabo la desnitrificación para satisfacer los límites de descarga de nitrógeno. Las condiciones anóxicas se pueden utilizar en un tanque de aireación para fomentar la formación de flóculos, también se pueden controlar el crecimiento de microorganismos no deseados filamentosos, también se reducen costos eléctricos en relación con la degradación del DBO también regresar al nivel de alcalinidad que se perdió durante la nitrificación. La desnitrificación accidental es el resultado de que ocurran condiciones anóxicas, por lo que se verá aumentando los costos operacionales, problemas operacionales e incumplimientos de las descargas de nitrógeno. Este proceso se ve observado usualmente en clarificadores secundarios, pero también puede ocurrir en el sistema de drenaje, clarificadores principales u otros.

Los problemas de desnitrificación en el sistema de tuberías provienen debido a la descarga de nitritos y nitratos de ciertas industrias en específico. Cuando la desnitrificación ocurre en dicho sistema, el DBO soluble se degrada a una tasa muy rápida. La degradación del DBO en el sistema resulta en un decaimiento de este al momento de entrar a la PTAR. Con una cantidad reducida de DBO en la entrada, se vuelve más difícil en un proceso aerobio la remoción de materia nitrogenada. Esta dificultad se ve reflejada en una violación de los acuerdos locales. El que ocurra esta situación va a provocar una reducción de la cantidad soluble de DBO o de los sustratos que entran al tanque de aireación. Con un nutrientes limitados, la probabilidad que crezcan los microorganismos es muy baja. Y si en dado caso crecen las bacterias, la poca cantidad de nutrientes provocarán una respiración endógena o que mueran. La muerte de varias bacterias provocará una lisis celular. Mientras estas se mueren, van a liberar contenido celular por la misma lisis donde este contenido puede llevar trazas de amoníaco, y la liberación de estos aumentará la concentración de amoníaco en el efluente.

Los beneficios de la desnitrificación son varios si esta es llevada cabo de la manera correcta. Los beneficios incluyen la protección de la calidad de agua que se vaya a descartar, que se cumplan con los estándares fisicoquímicos y reducción de costos de tratamiento de aguas residuales. Al llevar a cabo la desnitrificación, la cantidad de nitritos y nitratos que se descartan en el agua son casi nulos. Los iones son usados como un tipo de nutriente nitrogenado por varias plantas acuáticas. La reducción en la cantidad de estos compuestos a los cuerpos receptores de agua permite la prevención de una sobrepoblación de plantas acuáticas y su posterior eutrofización.

Los iones nitritos son muy tóxicas para la vida acuática. La desnitrificación reduce la cantidad de nitritos que son descargados hacia los cuerpos receptores de agua. La reducción de nitritos también permitirá una mejora en la calidad de vida de los organismos acuáticos.

Ahora, por otro lado, los procesos donde se utilice lodo activado van a tener que desnitrificarse, ya que esto permitirá que se cumpla con los acuerdos locales sobre la descarga de aguas residuales.

La desnitrificación promueve la formación de flóculos firmes y densos. Esto lo que hará que estos flóculos creados sean resistentes a los acciones cortantes sobre ellos y que tengan mucho mejores propiedades en términos de sedimentación. Un ambiente anóxico promueve a través de la

desnitrificación, el crecimiento de bacterias facultativas, bacterias formadoras de flóculos y limita el crecimiento de bacterias aerobias, organismos filamentosos entre otros. Por lo tanto, al haber parado este crecimiento, los organismos mueren en este ambiente anóxico que se creó.

A pesar de que hay ciertos microorganismos como los facultativos débiles, o los organismos filamentosos anaeróbicos que pueden utilizar el oxígeno molecular libre y también los nitritos y nitratos, pues estos microorganismos no pueden competir de una manera ideal por los nitratos y nitritos contra los microorganismos facultativos o las bacterias formadoras de flóculos. Por lo tanto, el crecimiento de estos tipos de microorganismos mencionados al inicio del párrafo es parado y por ende morirán en un ambiente anóxico.

Casi todos los procesos que requieran el uso de lodo activado también tienen que llevar a cabo la nitrificación para desnitrificar. En resumen, la nitrificación provoca una pérdida de alcalinidad mientras que la desnitrificación aumenta el grado de alcalinidad. A través de la desnitrificación, una gran porción de la alcalinidad perdida durante la nitrificación puede ser regresada al proceso a través de la desnitrificación.

Al utilizar los nitritos y nitratos producidos en la desnitrificación para disminuir el DBO, un proceso de remoción no necesita tener como requerimiento oxígeno para llevar a cabo dicha operación, por lo que esto resulta en un ahorro monetario y energético para la empresa, ya que se pueden ahorrar el uso de bombas para el tanque principal de aireación.

#### E. Bacterias desnitrificadoras

La desnitrificación a nivel de bacterias puede ocurrir de dos maneras, autótrofa y heterótrofa. La parte autótrofa consta en que las bacterias autótrofas utilizan una fuente inorgánica como fuente de energía, ya sea azufre en forma de iones, dióxido de carbono o bicarbonato. El azufre elemental aparenta ser el compuesto relacionado a azufre más viable para ser aceptado por las bacterias, esto es ventajoso ya que no se agrega una carga orgánica al efluente, sin embargo, las desventajas que tiene es que aumenta el ion sulfato en las aguas residuales, se reduce la alcalinidad, por lo que habría que utilizar químicos para nivelar el pH para las mismas bacterias. Ahora las bacterias heterótrofas realizan el mismo proceso, pero estas requieren una fuente de carbono orgánico como fuente de energía. La eficiencia de la heterótrofa es mucho más alta, sin embargo la comunidad científica les preocupa el hecho de la formación de lodos y residuos tóxicos por el hecho de añadir esas fuentes externas de carbón.

*Bacillus subtilis* es una bacteria que forma esporas, es gram-positiva naturalmente aerobia. Se puede encontrar naturalmente en el suelo y vegetación donde la temperatura ronde entre los 25 y 35 grados Celsius. Esta bacteria es reconocida principalmente por la habilidad para producir y secretar antibióticos. La clave está en que contiene 5 genes de peptidasa para la secreción de los anteriores. Puede secretar subtilina, micobacilina, etc. Estos se secretan durante la esporulación con el objetivo de incrementar el porcentaje de supervivencia del microorganismo para matar a la competencia. Esta bacteria no es patógena pero puede contaminar comida, usualmente la usan en semillas y vegetales por la misma función de la secreción de antibióticos (Microchem Lab, s.f).

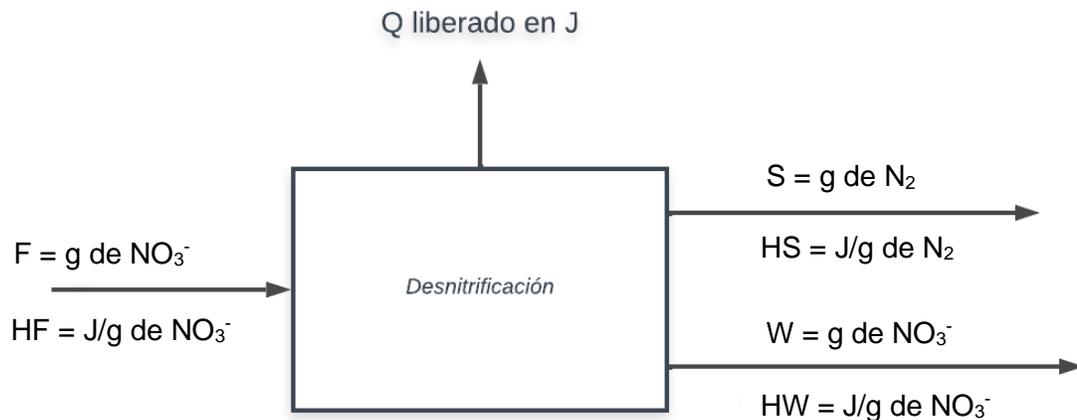
Esta se ha usado últimamente para la producción de enzimas siendo la encargada de producir alrededor del 60% de las enzimas comerciales. También es usado en el ámbito alimentario para la producción de productos fermentados, endulzantes saborizantes, etc. También ha demostrado ser eficiente en el proceso de desnitrificación. Debido a las tantas aplicaciones biotecnológicas que se tiene, se ha logrado avanzar más en el proceso de comprensión del microorganismo (Science Direct, s.f).

*Bacillus cereus* es una bacteria gram-positiva conocida principalmente por causar una leve contaminación de comida. Es un organismo aeróbico o facultativo. Se reproduce en forma de esporas. Como se explicó anteriormente, el género *Bacillus* ha mostrado propiedades de biorremediación del agua, y esta especie es de las más usadas debido a su estabilidad y resistencia frente a otros patógenos también presentes en el agua. Estos han demostrado ser capaces de tratar el agua, cuando esta tiene metales, pesticidas y otros compuestos orgánicos. Ha demostrado ser eficiente en la remoción de nitratos, y también bajo ciertas condiciones logra disminuir la concentración de nitritos, pero estos a veces pueden impedir la correcta reacción de la desnitrificación. Su tiempo de generación aproximadamente es de 15 a 30 minutos y para que lleven de manera más eficiente la desnitrificación, que son las enzimas en el microorganismo, se tiene que trabajar a condiciones anóxicas o bajas de oxígeno (Zarella, 2019).

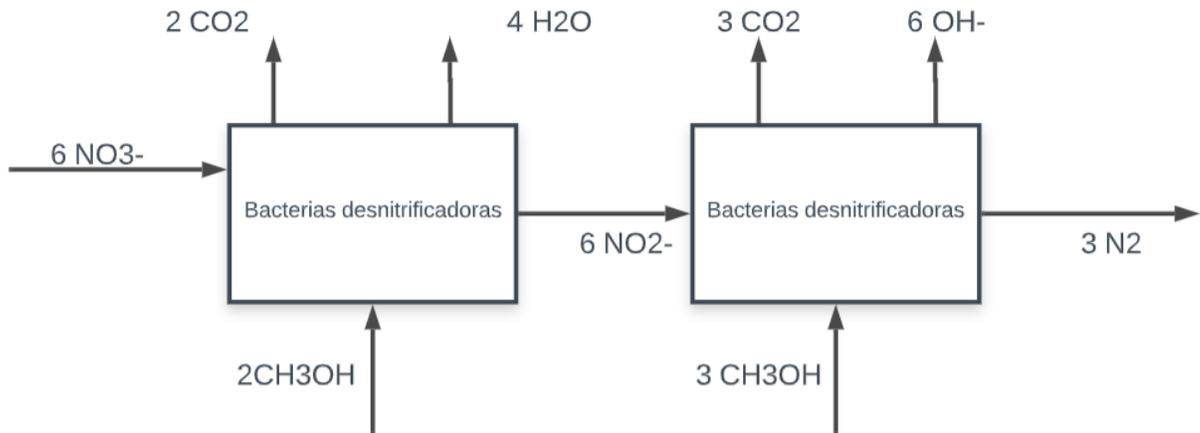
**Figura 5.** Balance de masa teórico del proceso de desnitrificación



**Figura 6.** Balance de energía teórico del proceso de desnitrificación



**Figura 7.** Diagrama de reacciones de desnitrificación



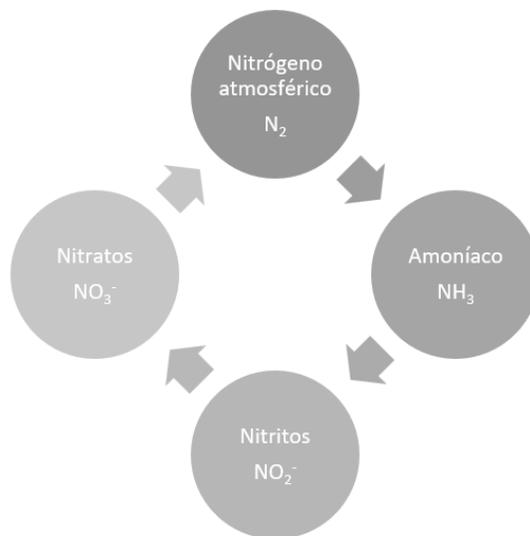
#### F. Ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno es importante comprenderlo ya que todas las formas de vida dependen de este elemento. El ciclo se define como el proceso el cual el nitrógeno pasa y se mueve en todo el mundo. La primera etapa denominada fijación, lo que ocurre aquí es que el nitrógeno gaseoso que se encuentra en la atmósfera es introducido a la tierra. Ciertas bacterias convierten en el N<sub>2</sub> a formas moleculares diferentes para que las plantas lo puedan utilizar (Frontiers, 2019).

La segunda etapa se conoce como mineralización o amonificación, aquí ocurre la acción de las bacterias sobre materia orgánica para convertirlo a nutrientes que las plantas puedan utilizar, normalmente el producto que se genera en este proceso es el NH<sub>3</sub>. La siguiente etapa es la nitrificación, aquí como dice el nombre, a través de acción bacteriana, el amoniaco es convertido a nitritos y posteriormente nitratos. La familia Nitrobacter o Nitrosomas son las encargadas de llevar a cabo este proceso. La penúltima etapa conocida como inmovilización, esta tiene como objetivo controlar el nivel de nitrógeno en la tierra, ya que ciertos compuestos nitrogenados son absorbidos por microorganismos. La última etapa es la desnitrificación donde aquí los nitratos son convertidos a N<sub>2</sub> por acción microbiana. En este proceso la tierra pierde nitrógeno ya que regresa al punto de inicio (Frontiers, 2019).

Cabe destacar que bajo condiciones anóxicas en la presencia de dióxido de nitrógeno, los organismos pueden convertir amonio con dióxido de nitrógeno al gas monóxido de nitrógeno. Este proceso conduce a la remoción de amonio, lo cual es bueno, sin embargo, da otro un gas del efecto invernadero. Entonces se han ido descubriendo y probando nuevas cepas de microorganismos, y recientemente se halló una llamada oxidantes de amonio. La función de estas es oxidar amoniaco directamente al nitrógeno molecular, siendo el aceptor de electrones, el nitrito en condiciones anaerobias. Esto actúa como un atajo en el ciclo del nitrógeno, y ha sido demostrado que las bacterias envueltas en dicho proceso son muy comunes. El 50% de la desnitrificación ahora se lleva a cabo por dichas bacterias (Henze et al, 2020).

**Figura 8.** Ciclo del nitrógeno



#### G. DQO y DBO

La materia orgánica es el componente más contaminante presente en las aguas residuales, esta se puede medir ya sea por medio del DQO (demanda química de oxígeno) y por el DBO (demanda biológica de oxígeno). El DQO funciona a través de la oxidación química por el ion dicromato presente en la mayoría de la materia orgánica. El DQO es utilizado para el balance de masa en el tratamiento de aguas. Ahora el DQO se divide en dos categorías, suspendido y soluble. El valor obtenido de esta prueba es una manera indirecta de la materia orgánica presente. La mayor diferencia entre el DBO es la ruta de cada prueba, ya que el DBO toma en cuenta la oxidación bioquímica de la materia orgánica, que realizan los microorganismos, mientras que el DQO mide la oxidación química a través de otro compuesto como el dicromato de potasio. Las principales ventajas de usar el método de DQO son las siguientes:

1. La prueba dura de 2 a 3 horas
2. Gracias a la velocidad de la prueba, se puede usar para un control industrial casi inmediato
3. Los resultados nos dan una aproximación bastante certera del oxígeno requerido para la materia orgánica
4. Finalmente, la prueba no se ve afectada por la nitrificación, por lo que nos da una indicación de la demanda del oxígeno proveniente del carbono orgánico.

Ahora las limitantes son las siguientes:

1. Toma en cuenta las fracciones de oxígeno biodegradables tanto como inertes, por lo que puede sobre estimar la demanda de oxígeno que se requiere para el tratamiento de aguas.
2. No provee una tasa de consumo de materia orgánica
3. Ciertos compuestos inorgánicos pueden interferir

(Sperling, 2007)

El DBO representa la cantidad de oxígeno requerido para estabilizar, a través de procesos bioquímicos, el carbono orgánico. La estabilización de este requiere un tiempo aproximado de 20 días. Sin embargo, para acortar dicho tiempo, se han realizado ciertas pruebas estandarizadas que duren menos tiempo, siendo una de ellas el DBO5, ya que se toma en cuenta el oxígeno consumido en los 5 días de la prueba. Sin embargo, a veces dependiendo de la fuente de aguas residuales, se tendrán que hacer ciertas adaptaciones. A veces se tienen unas altas de concentraciones de materia orgánica, por lo que el oxígeno se consume muy rápido, usualmente antes de los 5 días establecidos de la prueba, por lo que es necesario realizar diluciones para disminuir la concentración de materia orgánica, para que el consumo de oxígeno en 5 días sea numéricamente menos que el oxígeno disponible en la muestra. También es necesario, introducir un inóculo, para permitir que estos comiencen el proceso de descomposición y así se dé una variación en el oxígeno. Las ventajas de realizar la prueba del DBO son las siguientes:

1. Nos indica un porcentaje de la fracción biodegradable presente en las aguas residuales
2. Nos provee la tasa de degradación del agua residual
3. Una aproximación del consumo de oxígeno en función del tiempo

Mientras que las limitaciones son estas:

1. Se pueden obtener valores falsos de DBO si los microorganismos encargados de la degradación no se adaptan al sustrato orgánico.
2. Los metales pesados u otras sustancias pueden matar a los microorganismos
3. La prueba se toma 5 días, por lo que es necesario planificar bien la misma por si se quiere realizar modificaciones a la PTAR

(Sperling, 2007)

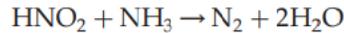
## H. Nuevas tecnologías

Las nuevas tecnologías que han venido resurgiendo son varias, siendo una de ellas, la nitrificación-desnitrificación. En este paso, el amoníaco se convierte a nitrito, por lo que ya no se llega a convertir hasta nitrato. Esto se traduce en que este proceso requiere un 25% menos de aireación, ya que no depende tanto del oxígeno. La reducción de nitritos para el gas nitrógeno molecular depende un 40% menos de una fuente de carbón externa. Esto reduce fuertemente los costos debido a que cuando haya una baja relación de Carbono/Nitrógeno en las aguas residuales no se tendrá que agregar una fuente externa de donadores de electrones, como metanol, etanol, ácido benzoico, etc. También el lodo activado producido en esta reacción es un 40% menor.

Para forzar que la remoción de nitratos o nitrógeno se dé por esta ruta, se puede seguir 2 maneras, usando presiones selectivas y manteniendo la concentración de oxígeno baja. La oxidación de amoníaco es más sensible frente a cambios de temperatura que la oxidación de nitritos. A temperaturas mayor a 20 grados Celsius, las bacterias oxidantes de amonio, tienen una mayor tasa de crecimiento que las bacterias que oxidan nitritos.

Para expandir el significado de la desnitrificación autótrofa o inorgánica, esta se puede llevar a cabo utilizando sulfuros, hidrógeno y amoníaco como donadores de electrones. Sin embargo, las concentraciones de hidrógeno y sulfuros en las aguas residuales son muy bajas, como para ser consideradas en algún proceso real. Según Van de Graaf, el amoníaco es el más factible de los mencionados anteriormente, como donador de electrones para la reducción de nitrito a nitrógeno

molecular. El amoníaco es oxidado bajo condiciones anaerobias o condiciones anóxicas bajo la siguiente reacción.



A este proceso se le es conocido como Anammox, y es clasificado como subproceso de la desnitrificación, ya que tiene como producto final de interés el nitrógeno molecular. Las bacterias encargadas de este proceso son autótrofas donde utilizan carbono inorgánico como su fuente de carbono celular.

Las enzimas utilizadas para la degradación del amoníaco en nitrógeno molecular son sensibles a las luces tales como UV y otras presentes en el ambiente. Por lo que bajo condiciones muy fuertes de luz, los nitrificadores se verán superados por otras formas de vida que necesitan la luz para la obtención del carbono inorgánico. Los efectos de la temperatura y pH pueden analizarse en términos del aumento o decrecimiento de la velocidad máxima de crecimiento. Esta velocidad aumenta con la temperatura justo antes que las enzimas responsables por la nitrificación se desnaturalicen en un rango de 32 a 35 grados Celsius. Mientras que el pH ideal para el proceso es entre 8 y 9. Como se mencionó, el pH también ha estado relacionado en otros estudios a la inhibición por sustrato, especialmente a pH mayor a 9. También se ha reportado que a pH menor a 6, las condiciones no son favorables para un desenlace correcto del proceso (MARA, 2022)

## I. Absorbancia

La absorbancia es un proceso donde la luz interactúa con la materia. Cuando la luz choca con un material o cosa, y esta absorbe un poco de esa luz, eso es absorbancia. La luz que no fue absorbida, no se pierde, esta es transformada en calor o energía química mientras que la molécula absorbente se excita. La absorbancia es un proceso físico que ocurre todos los días en forma de colores. La luz blanca como la luz del sol contiene todos los colores o patrones del espectro visible. Como por ejemplo, cuando esta luz ilumina un pasto verde, este solo absorbe el verde, y deja pasar todos los demás.

El principio de la absorbancia es utilizado en varios campos como la biología o química para cuantificar las moléculas absorbentes en la solución. Muchas biomoléculas absorben dicha a luz a cierta longitud de onda o tiene su máxima de absorción de luz también a una longitud de onda específica.

La absorción puede expresarse a través de la Ley de Beer-Lambert, donde esta nos indica cuantitativamente como la cantidad de absorción de luz depende la concentración de las moléculas absorbentes así también como de la longitud de onda en donde ocurre dicha absorción. Mientras la luz atraviesa el medio que contiene el analito absorbente, la intensidad de la luz va a disminuir, ya que el analito se empieza a excitar a través de dicha absorción.

Tradicionalmente, las mediciones de absorbancia se llevan a cabo en una celda. La solución con el analito que se desea cuantificar se coloca en la celda. Después un fotómetro determina la absorbancia a través de la intensidad de la luz que pasa a través de la muestra. La luz que no pasa a través del detectores fue absorbida por la muestra o se perdió (Skoog et al, 2014).

El método para la determinación de nitratos se le conoce como “Reducción a través de Cadmio” o como el método 353.4. El nitrato es una forma de nitrógeno que esta siempre listo para su uso por parte de las plantas acuáticas y el fitoplancton. Cuando se encuentra en excesivas cantidades puede aumentar la producción de las plantas acuáticas y fitoplancton, resultando en un proceso acelerado de eutrofización y por ende una menor calidad del agua. Por lo que es importante la medición de nitratos en las aguas contaminadas para el control y realización de propuestas para ir mejorando la calidad del agua.

Este método se basa en la reducción de nitrato a nitrito, utilizando al cadmio como un catalizador y después mide la concentración de nitritos que se generó, así también como otros nitritos presentes en la muestra. Para este método la interferencias están causadas por las siguientes variables:

- Amoníaco
- Aminas
- Urea
- Aminas alifáticas
- Cloruros a partir de 100 ppm
- Cloro a partir de 2 ppm
- Hierro en su estado de oxidación III
- Cobre
- Sustancias oxidantes fuertes
- Sustancias reductoras
- Sulfuros

(Skoog et al, 2014)

El método para la detección de nitritos es conocido como 354.1. El compuesto diazonio formado por la reacción entre la sulfanilamida y el nitrito en agua bajo condiciones ácidas es juntado con un compuesto para producir un color rojo-morado en presencia de nitritos a una longitud de onda máxima de absorción de 540 nm. Este método es aplicable a un rango de 0.01 a 1 ppm de nitratos. Los oxidantes y reductores pueden afectar las concentraciones de los nitritos así también como una alcalinidad mayor a 600 ppm, proporcionará resultados imprecisos debido a una perturbación en el pH. Así también existen estos interferentes:

- Iones ferrosos y férricos
- Iones cúpricos
- Iones de mercurio
- Plata y plomo
- Metavanadato
- Cloroplatinato
- Agentes reductores fuertes
- Agentes oxidantes fuertes
- Alta concentración de nitratos mayor a 100 ppm

(Skoog et al, 2014)

## VI. Metodología

Se realizó la metodología en base a un diseño de experimento llamado Análisis ANOVA de 1 factor. Se van a comparar dos diferentes tratamientos que son los dos diferentes tipos de microorganismos *Bacillus cereus* y *subtilis*. Se quieren comparar las medias globales para ver si se tiene una diferencia estadísticamente significativa que permita comparar las tasas de remoción entre dichas bacterias.

### Materiales

#### Inoculación de *Bacillus subtilis*

1. Desinfectar la superficie con etanol al 95%
2. Posicionar mecheros de etanol para mantener estéril el ambiente
3. Traspasar una colonia del cultivo madre de *Bacillus subtilis* a una caja Petri con medio agar utilizado un asa de estriado
4. Incubar la caja Petri a 35°C por 48 hr en la incubadora
5. Agarrar una colonia por medio de la técnica de estriado de la caja Petri, e introducirla a un Erlenmeyer de 150 mL que contenga caldo nutritivo.
6. Incubar dicho caldo por 48 hr a 170 rpm a una temperatura de 35°C.
7. Tomar 0.5 mL del caldo nutritivo
8. Verter en plato limpio y tarado en la balanza de humedad
9. Obtener el peso seco del caldo a través del porcentaje evaporado
10. Centrifugar el caldo por 15 minutos y descartar sobrenadante.
11. Suspender dichas células en agua destilada estéril para que al agregar 1 mL de esta nueva solución en el medio de interés haya una concentración inicial de  $6 \cdot 10^5$  por cada mL

#### Inoculación de *Bacillus cereus*

1. Desinfecta la superficie con etanol
2. Posicionar mecheros de etanol para mantener estéril el ambiente
3. Desinfecta la superficie con etanol
4. Traspasar una colonia del cultivo madre de *Bacillus cereus* a una caja Petri con medio LB
5. Incubar la caja Petri a 37°C por 48 hr
6. Agarrar una colonia por medio de la técnica de estriado de la caja Petri, e introducirla a un Erlenmeyer de 150 mL que contenga caldo nutritivo.
7. Dejar incubar dicho caldo por 48 hr a 170 rpm a una temperatura de 37°C.
8. Tomar 0.5 mL del caldo nutritivo
9. Verter en plato limpio y tarado en la balanza de humedad
10. Obtener el peso seco del caldo a través del porcentaje evaporado
11. Centrifugar el caldo por 15 minutos y descartar sobrenadante.
12. Suspender dichas células en agua destilada estéril para que al agregar 1 mL de esta nueva solución en el medio de interés haya una concentración inicial de  $6 \cdot 10^5$  por cada mL

#### Recolección de muestra de aguas residuales

1. Utilizar un envase de 5L donde este tiene que ser de plástico específicamente polietileno.

2. Lavar y secar correctamente el envase
3. Rotularlo con tinta indeleble con # de muestra, lugar de muestreo, fecha y hora
4. Colocarse guantes de nitrilo desechables antes de interactuar con la muestra
5. Con un balde tomar la muestra de agua proveniente de la llave de toma de muestra del tanque aeróbico debido a que aquí es donde se encuentran los nitratos
6. Regresar dicha muestra a la planta para asegurar que no sea un agua residual estancada
7. Volver a tomar con el balde una muestra de agua residual de la llave
8. Con el previo balde hacer un lavado de 2 a 3 veces al envase donde se almacenará la muestra
9. Llenar el envase designado pero haciendo énfasis en siempre dejar un espacio vacío por una posible expansión térmica
10. Cerrar el envase lo más rápido posible
11. Mantener el envase a una refrigeración entre 2°C y 5°C y en la oscuridad
12. Con base a las condiciones previas, la muestra se mantiene estable de 24 a 36 horas
13. En una bolsa de plástico, desechar los guantes utilizados para el procedimiento anterior

#### Tratamiento de muestra

1. Colocarse guantes de nitrilo desechables
2. Retirar el envase del enfriamiento
3. Tener otro envase del mismo volumen lavado y seco
4. Preparar un embudo de filtración junto con un papel filtro #4
5. Filtrar las aguas residuales a través del mencionado papel filtro
6. Desechar en el recipiente de residuos especiales, los lodos suspendidos obtenidos del paso anterior
7. Cerrar el envase lo más rápido posible para prevenir contaminación
8. Realizar el procedimiento en 30 min máximo para evitar que incremente la temperatura del sistema.
9. Inmediatamente, verter la muestra filtrada a un beaker de 2L y taparla con papel aluminio
10. Poner dicho beaker en un autoclave con el fin de esterilizar completamente la muestra.
11. Repetir paso 9 y 10 para la muestra de agua restante si en dado caso hay

#### Desnitrificación

- a. Se tendrán 6 pruebas en total, 3 por cada microorganismo según el análisis del tamaño de muestra a analizar según el cálculo 3
- b. Añadir 150 mL de aguas residuales a 6 Erlenmeyer de 250 mL cada uno
- c. Añadir 10 g de azúcar comercial a cada Erlenmeyer
- d. Etiquetar Erlenmeyer de 3 por cada microorganismo
- e. Esterilizar en el autoclave los Erlenmeyer
- f. Añadir la misma concentración de *Bacillus subtilis* a 3 Erlenmeyer y de *Bacillus cereus* a los 3 restantes

- g. Tapar los Erlenmeyer con aluminio y si es posible un hule para mantener las condiciones anóxicas.

#### Determinación de nitratos

- a. Se utilizará el fotómetro HI83099 marca Hannah
- b. Utilizar el reactivo denominado HI 93728-0 para la determinación de nitratos
- c. Seleccionar el método "Nitrato" en el fotómetro
- d. Con la pipeta, llenar la celda con 6 mL de la muestra que se desea analizar
- e. Poner la celda en el espacio indicado y cerrar la tapa
- f. Presionar tecla de "Zero" para la medición del blanco
- g. Remover la celda del fotómetro
- h. Añadir el contenido de un paquete del reactivo mencionado en el paso b a la solución
- i. Agitar vigorosamente de arriba para abajo por 10 segundos
- j. Agitar por medio de voltear la celda, siempre teniendo cuidado de que no se introduzcan burbujas de aire. No se disolverá por completo el contenido
- k. Reinsertar la celda al fotómetro
- l. Presionar la tecla "Timer"
- m. Esperar por 4 minutos y 30 segundos para que la reacción se complete
- n. Presionar la tecla "Read" para tener el resultado final
- o. Medir la concentración de nitratos dos veces al día durante 4 días, teniendo un tiempo intermedio de aproximadamente 6 horas
- p. Realizar una curva de concentración de nitratos vs el tiempo con los datos recabados.

#### Determinación de nitritos

- a. Se utilizará el fotómetro HI83099 marca Hannah
- b. Utilizar el reactivo denominado HI 707-25 para la determinación de nitritos
- c. Seleccionar el método "Nitrito LR" en el fotómetro
- d. Llenar la celda con 10 mL de la muestra que se desea analizar
- e. Poner la celda en el fotómetro
- f. Cerra la tapa del fotómetro
- g. Presionar la tecla "Zero" para la medición de blanco
- h. Remover la celda
- i. Agregar el contenido de un sobre del reactivo mencionado en el paso b
- j. Agitar suavemente la celda con el contenido por 15 segundos
- k. Reinsertar la celda al fotómetro
- l. Presionar la tecla "Timer"
- m. Esperar por 6 minutos para que la reacción se completa
- n. Presionar la tecla "Read" para obtener el resultado final
- o. Medir la concentración de nitritos dos veces al día durante 4 días, teniendo un tiempo intermedio de aproximadamente 6 horas
- p. Realizar una curva de concentración de nitratos vs el tiempo con los datos recabados.

#### Realización de análisis de varianza de un factor

- a. Establecer el cuadro del diseño experimental con las réplicas y los factores utilizados
- b. Ir al apartado de análisis de datos en Microsoft Excel
- c. Realizar el análisis de varianza de 1 factor
- d. Establecer las pruebas de hipótesis donde la nula menciona que las medias de los tratamientos por factor son iguales mientras que la alterna indica que las medias de los tratamientos difieren entre sí.
- e. Verificar que el valor F de prueba sea mayor el F crítico proporcionado por el análisis de Excel.
- f. Si el F de prueba es mayor al F crítico, se rechaza la hipótesis nula, sin aceptar la hipótesis alterna.
- g. Otro método de rechazo es ver si el valor de significancia utilizado es mayor al valor-p proporcionado por el análisis de Excel.
- h. Hallar el valor de LSD a través de la siguiente ecuación

**Ecuación 7.** Cálculo de LSD

$$LSD = [t_{\frac{\alpha}{2}, (a(n-1))}] * \sqrt{\frac{2MCE}{n}}$$

Donde:

Alfa es la significancia de 0.05

N es el número de réplicas

A es el número de tratamientos

MCE es la media cuadrática del error

- i. Se calcula la diferencia de las medias de los tratamientos en valor absoluto
- j. Si la diferencia de medias es mayor al valor de LSD, las medias difieren estadísticamente entre sí
- k. Si la diferencia de medias es menor al valor de LSD, las medias no difieren estadísticamente entre sí
- l. Calcular los residuos a partir de la siguiente ecuación

**Ecuación 8.** Cálculo de residuo

$$E_{ij} = y_{ij} - \bar{y}_i.$$

Donde:

$y_{ij}$  son las réplicas j del factor i

$\bar{y}_i$  son las medias del factor i

- m. Calcular los residuos estándar a partir la ecuación

**Ecuación 9.** Cálculo de residuos estándar

$$d_{ij} = \frac{E_{ij}}{\sqrt{MCE}}$$

Donde:

$E_{ij}$  es el residuo calculado a partir de la ecuación 2

MCE es la media cuadrática del error

- n. Analizar los residuos para verificar que cumplan con las suposiciones de media cero, varianza constante e independencia

## VII. Resultados

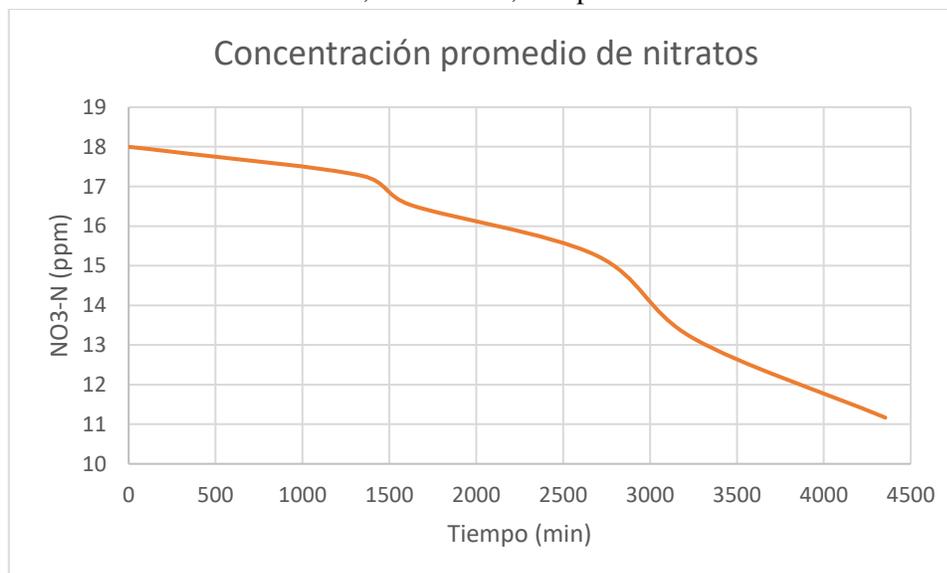
**Tabla 3.** Parámetros iniciales de la muestra de aguas residuales

\*Corresponden al análisis de la única muestra de aguas residuales recolectada

Parámetros	Resultado	Valor aceptable de referencia
Nitratos (NO <sub>3</sub> -N ppm)	18±0.1	>10 ppm
Nitritos (NO <sub>2</sub> -N ppm)	21±0.1	>10 ppm
DQO (ppm)	17±0.1	>50 ppm
DBO (ppm)	14.9±0.1	> 40 ppm
pH	6.54±0.01	[5,7]
Oxígeno disuelto (ppm)	3.1±0.1	<4 ppm
Temperatura (Celsius)	25.5±0.1	[24,27]
Material suspendido	Ausente	Presente

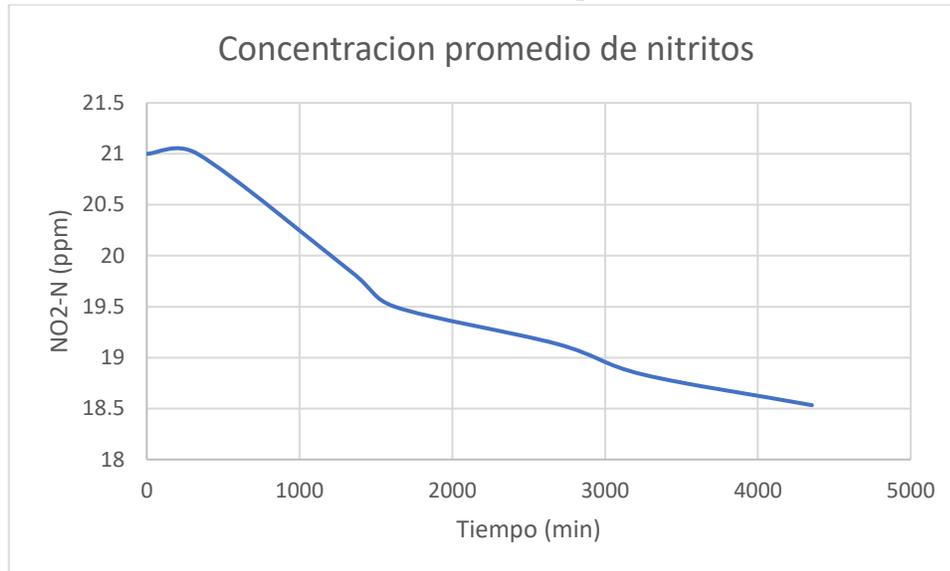
**Figura 9.** Concentración promedio de NO<sub>3</sub>-N utilizando *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas



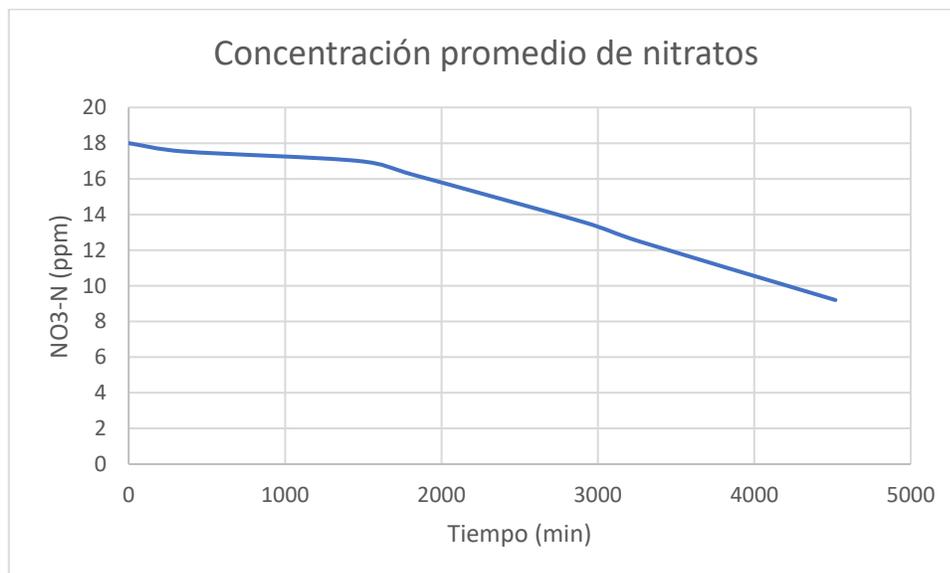
**Figura 10.** Concentración promedio de  $\text{NO}_2\text{-N}$  utilizando *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas



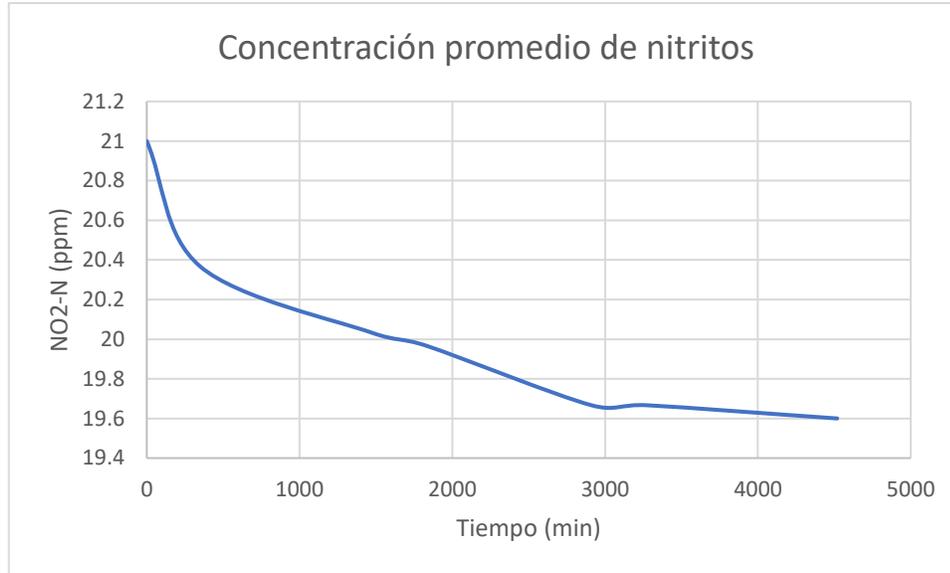
**Figura 11.** Concentración promedio de  $\text{NO}_3\text{-N}$  utilizando *Bacillus cereus*

@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas



**Figura 12.** Concentración promedio de NO<sub>2</sub>-N utilizando *Bacillus cereus*

@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas



**Tabla 4.** Tasas de remoción por parte del *Bacillus cereus* y *subtilis*

	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
NO <sub>3</sub> -N (ppm/h)	0.1171±0.0083	0.0941±0.0119
NO <sub>2</sub> -N (ppm/h)	0.0185±0.0033	0.0339±0.0072

**Tabla 5.** Porcentaje de remoción de nitratos y nitritos por parte del *Bacillus subtilis*

	Entrada	Salida	% de remoción
NO <sub>3</sub> -N (ppm)	18±0.1	11.2±0.1	38%±4.32
NO <sub>2</sub> -N (ppm)	21±0.1	18.5±0.1	12%±2.49

**Tabla 6.** Porcentaje de remoción de nitratos y nitritos por parte del *Bacillus cereus*

	Entrada	Salida	% de remoción
NO <sub>3</sub> -N (ppm)	18±0.1	9.2±0.1	49%±2.4
NO <sub>2</sub> -N (ppm)	21±0.1	19.6±0.1	7%±1.7

## VIII. Discusión

Con base en la Tabla 3, se puede observar que hay una alta concentración de nitritos de 21 ppm, esto es poco usual ya que la muestra se tomó en un tanque aeróbico, esto debido a que este proceso biológico de remoción de nitratos, consta de dos partes especiales: la nitrificación y desnitrificación, ya que la nitrificación como, genera nitratos a través de nitritos como intermediarios, por lo que esta cantidad alta de nitritos, es porque en ese momento se estaba ejecutando dicha reacción sin embargo, al esterilizar la muestra, se eliminaron dichas bacterias que estaban ejecutando esa reacción, por lo que los nitritos nunca se lograron completar hasta el punto final de convertirse a nitratos.

Por otro lado, se puede ver que el DQO obtenido es de 17 ppm, por lo que este se encuentra muy bajo de acuerdo con la teoría investigada donde mencionan que un mínimo para que ocurra la desnitrificación es de 50 a 60 ppm de DQO. Esta bajo ya que al momento de la esterilización, se filtró toda la materia orgánica suspendida, ocasionando que el DQO disminuyera. Además, se determinó el DBO original de la muestra filtrada de aguas residuales siendo este de 14.9 ppm. Esto provocará un desempeño erróneo por parte de los microorganismos, debido a que estos son heterótrofos por lo que requieren una fuente de carbono extra para llevar cabo la desnitrificación. Observando que el DBO era bajo, se procedió a agregar sacarosa, debido a que es una fuente fácil de conseguir y es barata, a las muestras de aguas residuales con el fin de aumentar la carga orgánica y que por lo tanto ambos microorganismos puedan utilizar dicha fuente de carbono externa para llevar a cabo la remoción de nitratos. Después de haber agregado dicho componente a la muestra, se procedió a medir nuevamente los valores de DQO y DBO, siendo estos de 79 ppm y 65 ppm, proporcionando así una ambiente más favorable para la remoción de nitratos

Empezando con el *Bacillus subtilis*, se puede ver en la Figura 8 como empieza de una forma lineal con pendiente negativa la concentración de nitratos, y después a partir del minuto 1500 (25h), se comienza a notar un descenso de 17.3 ppm a 16.5 ppm esto pasa debido a que los microorganismos entran en una fase de adaptación a las condiciones del medio donde fueron introducidos, conforme avanza el tiempo, estos se adaptan y el consumo de nitratos tiende a aumentar. Esto mismo se puede ejemplificar con las tasas de remoción calculadas, donde, a partir del minuto 1346 (22.4h) aproximadamente, las tasas de consumo o remoción de nitratos aumentan en 0.01 ppm/h.

Se obtuvo un promedio de tasa de remoción de nitratos de 0.094 ppm/h, teniendo una dispersión de  $\pm 0.01188$  ppm/h, esto nos indica que podemos obtener una tasa máxima de remoción de nitratos de 0.11 ppm/h y una mínima de 0.082 ppm/h mientras que el coeficiente de variación de estos es del 12%, por lo que la dispersión de datos se encuentra acertada.

Continuando con el balance de concentración de los nitratos, se puede observar a través de la Tabla 5 que se obtuvo una eficiencia de remoción promedio del 38%. Esto se podría considerar baja respecto a lo reportado en la literatura (80%-90%), sin embargo, con la desviación calculada de la eficiencia de remoción de 4.32%, se puede obtener un máximo de desnitrificación de 42.32% o un mínimo de 33.64% por lo que es imperativo hallar a qué condiciones tales como la concentración de sacarosa, densidad óptica u otros, se obtiene una mayor eficiencia de remoción

de nitratos. El factor que más pudo haber afectado el rendimiento de la remoción de nitratos por parte del *Bacillus subtilis* fue la fuente externa de carbono, ya que se han reportado la utilización de varias fuentes externas tales como ácido acético, metanol, etanol, ácido benzoico, etc, donde incluso hay varios estudios que reportan la mezcla de las sustancias anteriores para ver con cual se logra tener un mejor rendimiento y una menor generación de biomasa. Esto microbiológicamente afecta en que si la bacteria no tiene mucha afinidad a la fuente que está siendo administrada, no podrá metabolizarla y utilizarla como fuente de energía.

Otra variable que pudo haber afectado es la alta presencia de nitritos en las muestras de aguas residuales, ya que teóricamente la muestra de aguas residuales que se utilizó tendría que haber estado libres de nitritos, sin embargo, como se mencionó anteriormente, estos nitritos actúan como intermediarios en la reacción de nitrificación, y al haber esterilizado dicha muestra, se interrumpió dicho proceso, por lo que nunca se convirtieron a nitratos. En los artículos mencionados, utilizan una muestra artificial de aguas residuales donde la única fuente de nitrógeno eran los nitratos, no estaban presentes los nitritos. O utilizaban los nitritos como fuente de nitrógeno o nitratos, nunca los dos al mismo tiempo. También se mencionaba que estaba cepa demostró capacidades para hacer frente a la toxicidad de los nitritos flotantes. Sin embargo, para este experimento, la concentración de nitritos era bastante alta, por lo que sí pudo haber ejercido una influencia negativa sobre el comportamiento desnitrificador del *Bacillus subtilis*. Estos microbiológicamente afectan ya que actúan como compuestos tóxicos y tampoco no pueden ser removidos del ambiente, ya que esta bacteria no tiene la capacidad de usar a los nitritos como aceptor de electrones como si puede con los nitratos.

Añadiendo al factor explicado previamente de la toxicidad de los nitritos, esta toxicidad se vio magnificada ya que el experimento se llevó a cabo como un proceso batch, esto afecta ya que no hay una salida constante de flujo, por lo que hay una acumulación de células muertas y de nitritos. Lo ideal sería un proceso continuo donde esto ayudaría a que se dé una liberación continua de nitritos, provocando un ambiente más sano para la remoción de nitratos así también como una alimentación continua de nutrientes en forma de fuentes de carbono y un flujo entrante constante con nitratos.

Finalmente, uno de los factores más influyentes en la desnitrificación es el nivel de oxígeno disuelto en la muestra. Se reportó en la tabla 3 que el nivel de OD era de 3.1 ppm. Esto nos dice que había un pequeño porcentaje de oxígeno que iba a afectar la ruta metabólica del microorganismo. Esto afecta ya que por una jerarquía energética, donde los microorganismos se agotarán primeramente el oxígeno por el simple hecho que este les provee mucha más energía de todos los presentes en el medio, después ya son usados los nitrógenos como sustrato. Por lo que la eficiencia de reducción de nitrato se pudo haber visto afectada, ya que las bacterias empezaron a utilizar el oxígeno disuelto disponible hasta agotarlo y después usaron los nitratos, provocando una baja en eficiencia.

Ahora discutiendo el proceso de los nitritos, se puede observar en la Figura 9 que estos disminuyen también a lo largo del tiempo, donde posee una inclinación bastante pronunciada, infiriendo que ocurre una disminución abrupta de los nitritos presentes, esto ocurre

aproximadamente entre el minuto 0 y el minuto 1500 (25 horas), después ya se logra observar un comportamiento más constante. La tasa de remoción general mostrada en la tabla 4 se puede observar que es baja respecto a la de remoción de nitratos. Hay una diferencia de tasas de 0.060 ppm/h. Esto se puede deber a diversos factores. El primero es la presencia de nitratos en el ambiente, esto debido a que las bacterias necesitan llevar a cabo un proceso de respiración, y en este caso, los microorganismos se inclinan por la capacidad de aceptar electrones por parte de los nitratos no nitritos. Estos no microorganismos no pueden comenzar su ciclo de respiración cediendo electrones a nitritos, debido a que a un nivel genético el *Bacillus subtilis* no posee las enzimas necesarias para comenzar dicho proceso de respiración a partir de nitritos, mientras que si a partir de nitratos, donde esa enzima se le conoce como nitrato reductasa. Existen otros microorganismos que no posee la enzima nitrato reductasa y sí la nitrito reductasa, por lo que ellos se pueden llevar a cabo la conversión a nitrógeno molecular a partir de nitritos, a este proceso es conocido como la nitrificación-desnitrificación.

Se obtuvo la dispersión para la media de la tasa de remoción de nitritos, por lo que, estadísticamente bajo las condiciones utilizadas en este trabajo, se puede obtener una tasa máxima de remoción de 0.041 ppm/h y una mínima de 0.027 ppm/h, donde el coeficiente de variación fue del 21% donde la dispersión de datos se encuentra en condiciones aceptables.

Ahora con el balance de concentración de nitritos, se puede observar a través de la Tabla 5 que hay una eficiencia en la reducción de nitritos de un 12%, sin embargo, al calcular la desviación, se puede obtener una eficiencia máxima de remoción de nitritos de 14.49% mientras que una mínima sería de 9.51%. Esta eficiencia de remoción de nitritos se podría aumentar si se eliminará la presencia de nitratos dentro del medio de interés. Puesto que la bacteria utilizada si posee la enzima nitrito reductasa, entonces con la eliminación del oxígeno disuelto y los nitratos, las bacterias pueden ser inducidas también bajo ciertas temperatura y presión para que utilicen a los nitritos como fuente de energía y por lo tanto, lleven a cabo la desnitrificación.

Ahora, con el *Bacillus cereus*, se puede ver en la Figura 10 una disminución con el tiempo de los nitratos presentes en las aguas residuales. El *cereus* se comporta de forma lineal en todo el proceso, ya que se realizó una regresión lineal del grupo completo de datos promedios y se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.93. Esto nos permite observar que si se desea replicar este experimento a las condiciones especificadas, es posible que con este análisis de regresión podamos tener un pronóstico preciso. A partir de la gráfica se logró determinar la tasa general de remoción de nitratos, siendo esta de 0.12 ppm  $\text{NO}_3^- \text{N/h}$  siendo esta la primera diferencia respecto al *Bacillus subtilis*, ya que tuvo una velocidad de remoción de diferencia de 0.03 ppm/h respecto al *Bacillus subtilis*. La tasa mínima de remoción que se puede obtener gracias a la dispersión bajo las condiciones utilizadas fue de 0.109 ppm  $\text{NO}_3^- \text{N/h}$  mientras que la máxima fue de 0.125 ppm  $\text{NO}_3^- \text{N/h}$ .

Se obtuvo una eficiencia de remoción del 49%, esto se ve reflejado en que cada corrida llevada a cabo tuvo un rendimiento de remoción de nitratos mucho más alto que las corridas por parte del *Bacillus subtilis*, cabe destacar que esto se realizó en el mismo periodo de tiempo que para el *Bacillus subtilis*, por lo que el tiempo se puede descartar como factor influyente. Este pudo haber

tenido un mejor rendimiento por varias causas. La literatura consultada mencionaba que una cepa del *Bacillus subtilis* tenía mejor rendimiento de remoción de nitratos que la del *Bacillus cereus*. Sin embargo, se sabe que cada bacteria puede tener diferentes variantes y para este caso, para el *B. cereus* fue LMG 6923 y para el *B. subtilis* fue JCM 1465, por lo que esto pudo haber sido algo por el cual el *B. cereus* tuvo un rendimiento fuera de lo esperado. También este se pudo haber adaptado mejor a la fuente de carbono ingresada al sistema, ya que cada bacteria tendrá un sustrato o fuente externa de energía que le proporcionará una mayor cantidad de energía. Otro factor específico que pudo haber afectado el rendimiento de esta bacteria en específico, fue que posiblemente haya tenido una mejor adaptación a las condiciones a las cuales fue sometida, más que el *Bacillus subtilis*, con condiciones, se puede entender tales como el pH, temperatura, etc.

Se puede observar en la Figura 11 que los nitritos si tienen un comportamiento descendente durante el tiempo de experimentación sin embargo, la remoción de nitritos que se tuvieron a lo largo de los 5 días fue muy despreciable, llegando a un valor del 7% de remoción de los nitritos totales. En este aspecto se puede observar que el *Bacillus subtilis* posee un mejor rendimiento de reducción de nitritos que el *Bacillus cereus*, esto concuerda con lo revisado en la teoría donde ampliamente describían que el *Bacillus subtilis* poseía una mejor tolerancia a la toxicidad de los nitritos y como en este caso, como se mencionó que se simulaba un proceso batch, todos los nitritos se quedaban estancados.

Algo que cabe la pena mencionar es la reacción completa de desnitrificación, ya que como se observó la reacción teórica constante en la transformación de nitratos hacia nitrógeno gaseoso, pasando como intermediarios a los nitritos. Esto se apoya en el hecho que durante el monitoreo de los nitritos, estos nunca aumentaron concentración, es decir la reacción de desnitrificación no paró en los intermediarios, los cuales eran los nitritos. Por lo que ambas bacterias cumplieron con la función de la eliminación del nitrógeno soluble dentro de las aguas residuales.

Se realizó un análisis de varianza de 1 factor, siendo el factor para cambiar los microorganismos, con el fin de determinar si realizaban una influencia estadísticamente significativa sobre la remoción de nitratos y también de nitritos. El análisis de varianza se realizó a partir de Excel, lo cual arrojó como resultado un valor F de prueba de 9.81, mientras que el valor F crítico era de 7.71. También el valor-p obtenido fue de 0.03 mientras que la insignificancia utilizada para el experimento fue de 0.05. Utilizando el método de valor-p o el valor f de prueba, cualesquiera de los dos, se llegaba a la conclusión estadística que la hipótesis nula, la cual establecía que las medias de ambos tratamientos eran iguales, se rechazaba en favor de la alterna, la cual dictaba que la medias de cada tratamiento diferían o en otras palabras, los microorganismos si establecen un efecto directo sobre la remoción de nitratos. Se realizó la prueba LSD de Fisher para tener evidencia estadísticamente significativa. Se tuvo un valor de LSD de 0.09 mientras que la diferencia absoluta de medias fue de 0.11. Esto significa que  $0.11 > 0.09$ , por lo que las medias difieren estadísticamente entre sí, y por lo tanto los microorganismos utilizados sí influyen en la remoción de nitratos.

Se procedió a analizar los residuos del modelo de análisis de varianza, ya que estos tienen que cumplir con varias suposiciones como tener una media de 0, varianza constante e independiente. Entonces de acuerdo con la Tabla 14 se puede observar que la media de los residuos es 0, mientras que a través de la ilustración 24 se puede observar que los residuos están desplegados de una manera donde la distribución se da a lo largo de todo el eje x así también que se puede observar una tendencia de un bloque horizontal, lo cual afirma la suposición de una independencia del factor utilizado así como el orden de las corridas. Por otro lado, en la misma figura se puede observar que la varianza es constante ya el ancho de cómo están distribuidos los datos menciona, que la varianza se mantiene, y no hay datos atípicos, por lo que el modelo de análisis de varianza de 1 factor para la remoción de nitratos se considera acertado y preciso.

Se realizó el mismo análisis para la remoción de nitritos, donde el análisis de Excel arrojó un valor F de prueba de 5.45, mientras que el valor F crítico fue de 7.70. Por otro lado, el valor-p obtenido fue de 0.08, mientras que la insignificancia fue la misma de 0.05. Utilizando cualquiera de los dos métodos, se llegó a la misma conclusión el cual era que no se rechazaba la hipótesis nula, es decir no se tenía suficiente evidencia estadísticamente significativa para aceptar que las medias de los tratamientos sean iguales entre ellas, es decir que el microorganismo no ejerció una influencia sobre la remoción de nitritos. Se realizó la prueba de LSD de Fisher para tener un soporte más fuerte estadísticamente a lo establecido anteriormente. Se tuvo un valor LSD de 0.06, mientras que la diferencia absoluta entre medias de ambos tratamientos fue de 0.05, por lo que  $0.05 < 0.06$ , según el criterio establecido por Fisher, esto significa que no difieren estadísticamente las medias entre sí y por lo tanto los microorganismos no tuvieron una influencia sobre la remoción de nitratos.

Se analizaron los residuos del modelo de análisis de varianza, ya que estos tienen que cumplir con varias suposiciones como tener una media de 0, varianza constante e independiente. De acuerdo con la tabla 16 se puede observar que los residuos tienen una media de 0, mientras que por medio de la Figura 25 se puede observar una independencia de los residuos frente al factor y los órdenes de corrida, ya que poseen una tendencia a estar puestos en el eje x, así como también están distribuidos de forma horizontal, por otro lado, la varianza constante se puede ver ya que el ancho de los datos o los residuos se mantienen en un valor constante, por lo que si se cumplen estos supuestos para el modelo de análisis de varianza, indicando que los resultados que este tuvo, fueron precisos y exactos.

## IX. Conclusiones

1. Se logró determinar los parámetros iniciales de las aguas residuales, donde destacó un contenido de nitratos de 18 ppm así como de nitritos de 21 ppm, siendo estos aceptables según la teoría para comenzar la desnitrificación.
2. Se tuvo una tasa de remoción de nitratos por parte del *Bacillus subtilis* de 0.0941 ppm/h, mientras que del *Bacillus cereus* fue de 0.1171 ppm/h. Por otro lado, el *Bacillus subtilis* tuvo una tasa de remoción de nitritos de 0.0339 ppm/h, mientras que la tasa del *Bacillus cereus* fue de 0.0185 ppm/h, por lo que el *Bacillus subtilis* evidencia una mayor inclinación por los nitritos mientras que el *Bacillus cereus* a los nitratos.
3. Se tuvo un eficiencia de remoción de nitratos por parte del *Bacillus subtilis* de un 38%, mientras que del lado del *Bacillus cereus* fue de un 49%, por otro lado, el *Bacillus subtilis* tuvo una eficiencia de remoción de nitritos del 12%, mientras que el *Bacillus cereus* tuvo una remoción del 7%, por lo que el *Bacillus subtilis* demostró tener una mayor afinidad a los nitritos y el *Bacillus cereus* a los nitratos.

## X. Recomendaciones

1. Darle seguimiento al experimento realizada con otros microorganismos diferentes para ampliar el campo de la desnitrificación y así contribuir a tener aguas residuales mejor tratadas para generar una mejor calidad de vida humana a través del uso de bacterias autótrofas desnitrificadoras para evitar el uso de una fuente externa de carbono y así poder reducir costos operaciones para una PTAR
2. Si en dado caso se utilizan bacterias heterótrofas, utilizar una fuente de carbono externa diferente a la sacarosa para evaluar rendimientos a diferentes fuentes de energía así también como evaluar el rendimiento de una misma fuente de carbono a concentraciones distintas.
3. Ejecutar la desnitrificación a diferentes densidades ópticas de bacterias para hallar la tasa máxima de remoción de nitratos sin que esté presente la competición de microorganismos
4. Llevar a cabo este experimento en modo continuo para permitir una constante flujo de entrada de nutrientes así también como una salida de compuestos tóxicos o células muertas para mejorar las condiciones de los microorganismos

## XI. Literatura citada

Cole Parmer. (2021, 3 mayo). *The Wastewater Treatment Process*. Recuperado 17 de noviembre de 2021, de <https://www.coleparmer.com/tech-article/eight-stages-of-wastewater-treatment-process>

Ecomar. (2020, 22 julio). *¿Qué son las aguas residuales?* Fundación Ecomar. <https://fundacionecomar.org/que-son-las-aguas-residuales/>

EPA. (s. f.). *How Wastewater treatment works*. Recuperado 17 de noviembre de 2021, de <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/bastre.pdf>

EPA. (2002). *Nitrification*. Recuperado 7 de junio de 2022, de [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/nitrification\\_1.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/nitrification_1.pdf)

Frontiers. (2019). *What Is the Nitrogen Cycle and Why Is It Key to Life? Frontiers for Young Minds*. Recuperado 26 de enero de 2022, de <https://kids.frontiersin.org/articles/10.3389/frym.2019.00041>

Gerardi, M. H. (2006). *Wastewater Bacteria: 5* (Illustrated ed.). Wiley-Interscience.

Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., & Brdjanovic, D. (2020). *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design* (2.a ed., Vol. 1). IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781789060362>

INFOM. (2006). *Acuerdo Gubernativo 236 - 2006*. Recuperado 16 de noviembre de 2021, de [http://www.infom.gob.gt/archivos/Docs-Pdf/Anexo-Legal/ANEXO\\_1\\_Reglamento-descargas-de-aguas-residuales-AG236-2006.pdf](http://www.infom.gob.gt/archivos/Docs-Pdf/Anexo-Legal/ANEXO_1_Reglamento-descargas-de-aguas-residuales-AG236-2006.pdf)

Mara, E. H. N. D. &. (2022, 7 septiembre). *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, 1 Edición. Bio-Green Books.

Microchem Lab. (s. f.). *Bacillus subtilis | Microchem Laboratory*. Recuperado 21 de noviembre de 2021, de <https://microchemlab.com/microorganisms/bacillus-subtilis>

Nitrate Contamination. (2020, 22 junio). Water Education Foundation. <https://www.watereducation.org/aquapedia/nitrate-contamination#:~:text=Nitrate%20Contamination%20Overview,plants%2C%20dairies%20and%20atural%20conditions.>

Riffat, R., & Husnain, T. (2020). *Fundamentals of Wastewater Treatment and Engineering* (2nd ed.). CRC Press.

Science Direct. (s. f.-a). *Bacillus Subtilis - an overview | ScienceDirect Topics*. -. Recuperado 21 de noviembre de 2021, de <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/bacillus-subtilis#:~:text=Bacillus%20subtilis%20is%20one%20of,conditions%20including%20heat%20and%20desiccation.>

Science Direct. (s. f.). *Denitrification - an overview | ScienceDirect Topics*. Recuperado 5 de noviembre de 2021, de <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological->

sciences/denitrification

Skiba, U. (2008). *Denitrification. Encyclopedia of Ecology*, 866-871.  
<https://doi.org/10.1016/b978-008045405-4.00>

Skoog, D. A., Donald (San Jose State University) West, F. (University of Kentucky) Holler, Stanley (Michigan State University) Crouch, West, D. M., Crouch, S. R. & Holler, F. J. (2014). *Fundamentos de Quimica Analitica*. Cengage Learning Editores S.A. de C.V.

Sobieszuk, P., & Szewczyk, K. W. (2010). *Estimation of (C/N) Ratio for Microbial Denitrification. Environmental Technology*, 27(1), 103–108.  
<https://doi.org/10.1080/09593332708618624>

Sperling, V. M. (2007). *Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal: Biological Wastewater Treatment Series Volume 1 (1.a ed., Vol. 1)*. IWA Publishing (Intl Water Assoc).  
<https://library.oapen.org/handle/20.500.12657/31053>

Sperling, V. M. (2007a). *Basic Principles of Wastewater Treatment: Biological Wastewater Treatment Volume 2 (1.a ed., Vol. 2)*. IWA Publishing (Intl Water Assoc).  
<https://doi.org/10.2166/9781780402093>

Yang, T., Xin, Y., Zhang, L., Gu, Z., Li, Y., Ding, Z., & Shi, G. (2020). *Characterization on the aerobic denitrification process of Bacillus strains. Biomass and Bioenergy*, 140, 105677.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105677>

Yang, T., Yang, Q., Shi, Y., Xin, Y., Zhang, L., Gu, Z., & Shi, G. (2021). *Insight into the denitrification mechanism of Bacillus subtilis JD-014 and its application potential in bioremediation of nitrogen wastewater. Process Biochemistry*, 103, 78–86.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.02.007>

Zarrella, I. (2019). *Optimization of the anaerobic denitrification process mediated by Bacillus cereus in a batch reactor. Environmental Technology & Innovation*, 16, 100456.  
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100456>

## XII. Anexos

### A. Datos originales

**Tabla 7.** Datos de la corrida 1 del *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas

Tiempo (min)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N±0.1	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N±0.1
0	18	21
310	17.5	21
1305	17.1	20.5
1583	15.8	20.3
2649	14.8	20.1
3200	12.4	19.7
4284	10.1	19.1

**Tabla 8.** Datos de la corrida 2 del *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas

Tiempo (min)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N±0.1	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N±0.1
0	18	21
333	18	21
1342	17.6	19
1620	17.1	18.5
2684	15.4	18
3255	13.7	17.9
4397	11.9	17.8

**Tabla 9.** Datos de la corrida 3 del *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas

Tiempo (min)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N±0.1	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N±0.1
0	18	21
353	18	21
1390	17.1	20
1665	16.7	19.7
2730	15.6	19.3
3295	13.4	18.9
4411	11.5	18.7

**Tabla 10.** Datos de la corrida 1 del *Bacillus cereus*

@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas

Tiempo (min)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N±0.1	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N±0.1
0	18	21
300	17.7	20.6
1420	17.2	20
1780	16.6	20
2860	13.5	20
3220	12.3	20
4230	9.1	19.9

**Tabla 11.** Datos de la corrida 2 del *Bacillus cereus*

@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas

Tiempo (min)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N±0.1	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N±0.1
0	18	21
366	17.4	20.2
1492	16.9	20.1
1852	16.1	19.9
2927	14.2	19.8
3292	13	19.8
4657	9.8	19.7

**Tabla 12.** Datos de la corrida 3 del *Bacillus cereus*

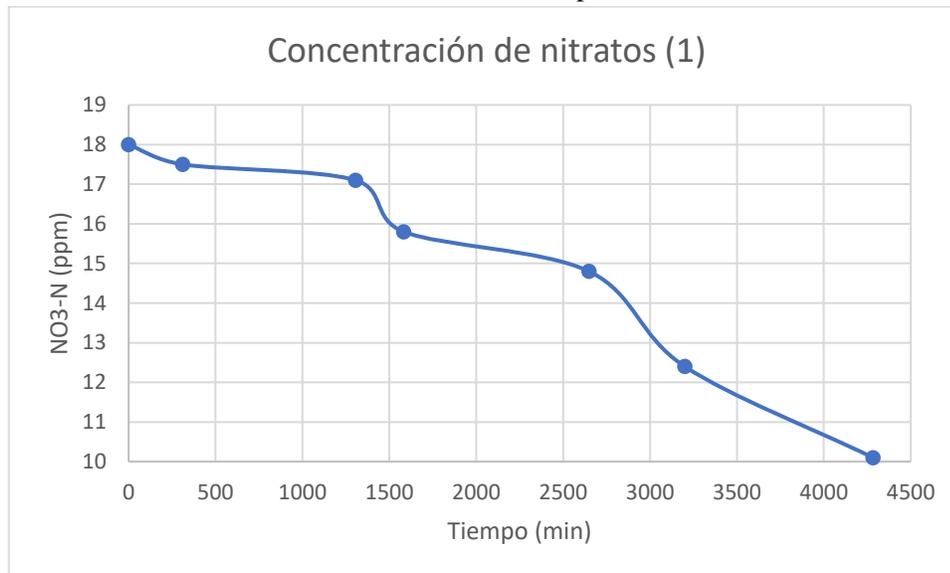
@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas

Tiempo (min)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N±0.1	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N±0.1
0	18	21
385	17.5	20.3
1500	16.9	20
1860	15.9	20
2945	13	19.2
3310	12.1	19.2
4670	8.7	19.2

B. Figuras originales

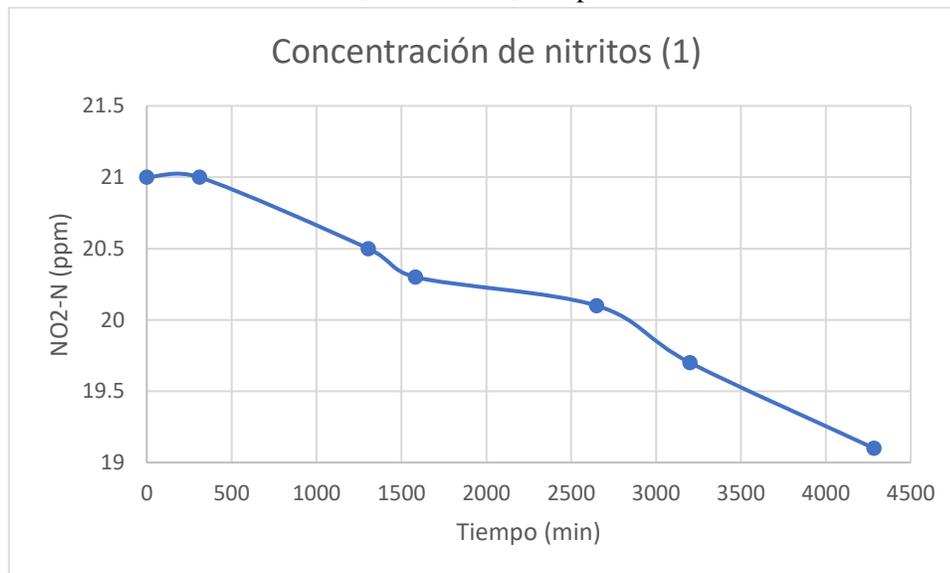
**Figura 13.** Concentración de  $\text{NO}_3\text{-N}$  de la corrida 1 del *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas



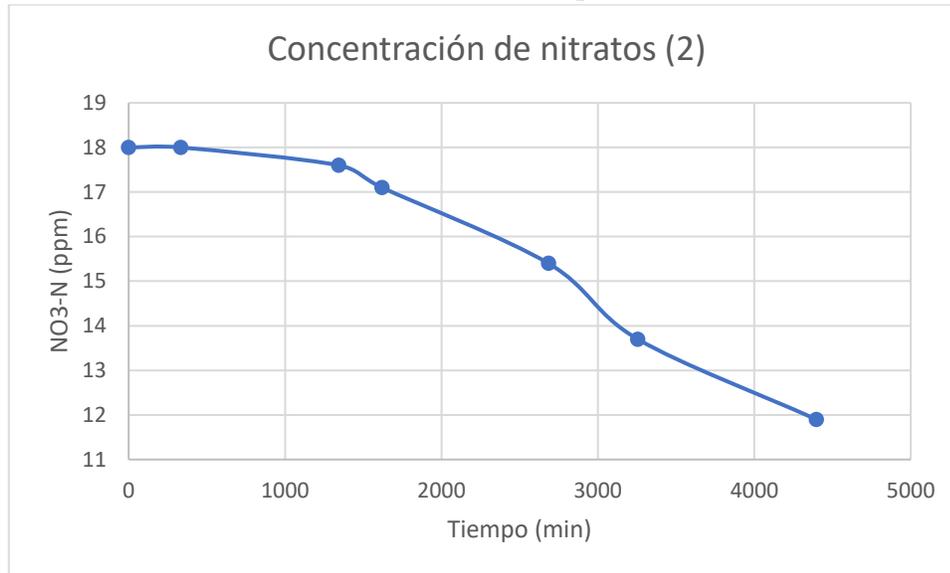
**Figura 14.** Concentración de  $\text{NO}_2\text{-N}$  de la corrida 1 del *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas



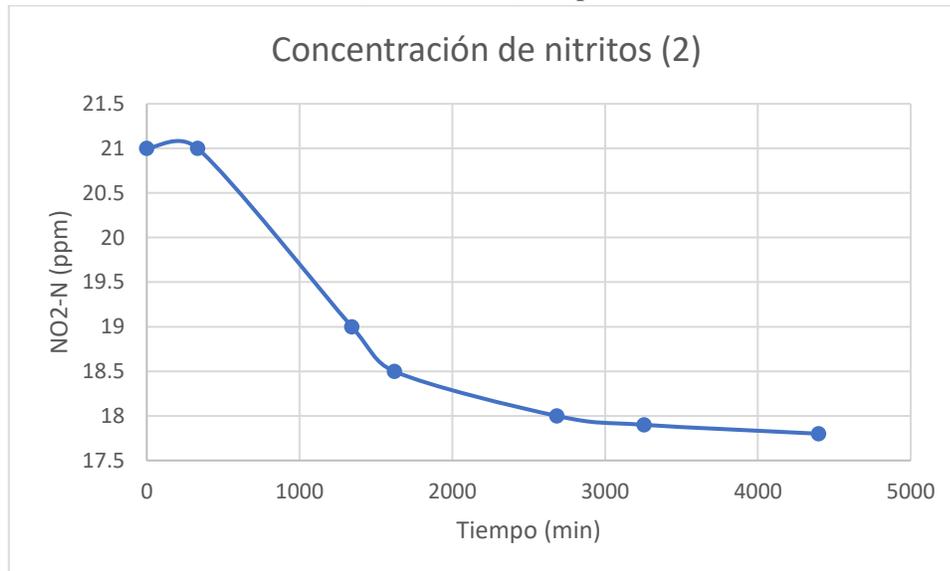
**Figura 15.** Concentración de  $\text{NO}_3\text{-N}$  de la corrida 2 del *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas



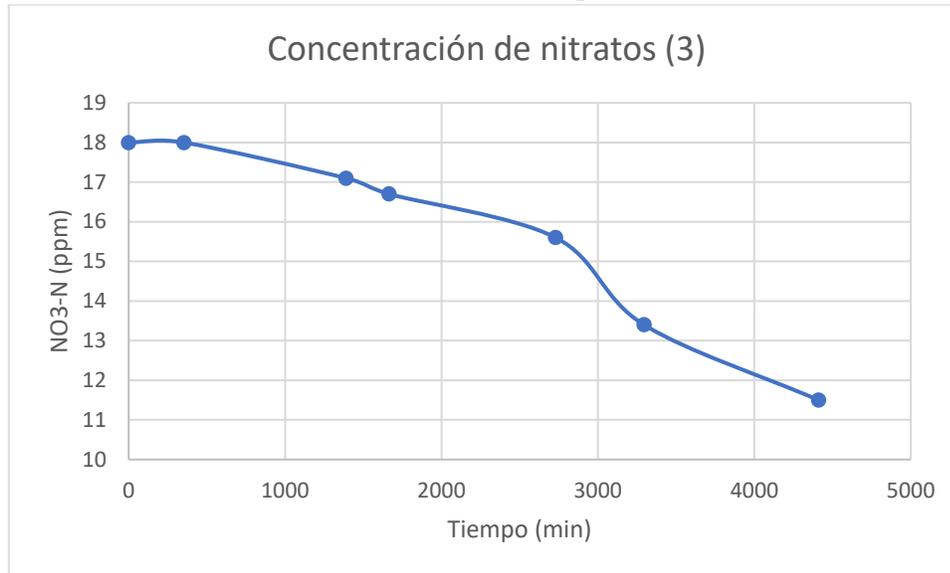
**Figura 16.** Concentración de  $\text{NO}_2\text{-N}$  de la corrida 2 del *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas



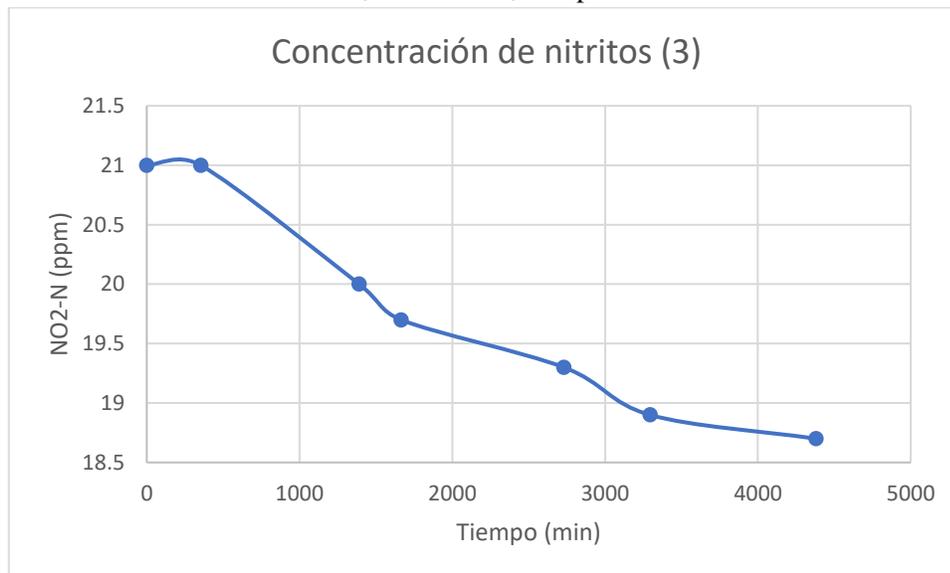
**Figura 17.** Concentración de  $\text{NO}_3\text{-N}$  de la corrida 3 del *Bacillus subtilis*

@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas

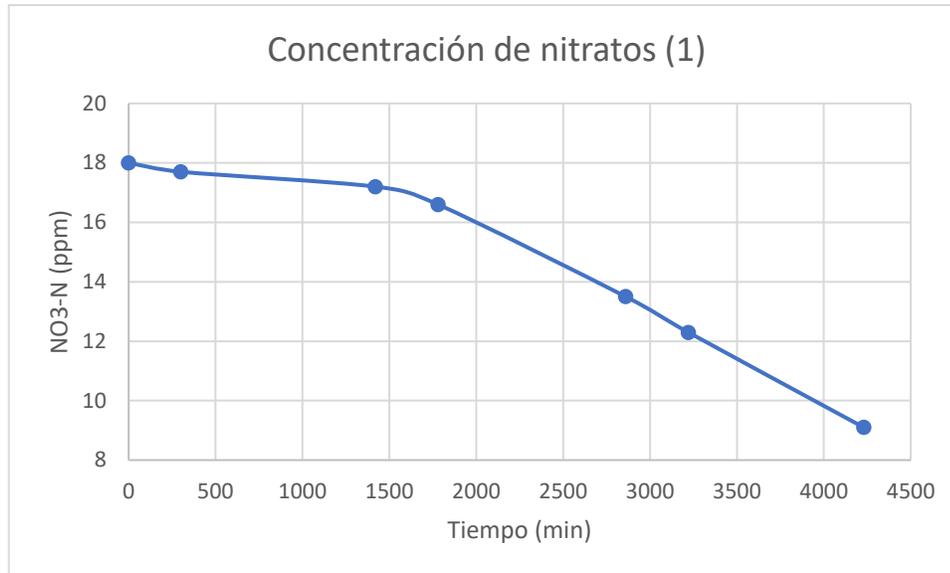


**Figura 18.** Concentración de  $\text{NO}_2\text{-N}$  de la corrida 3 del *Bacillus subtilis*

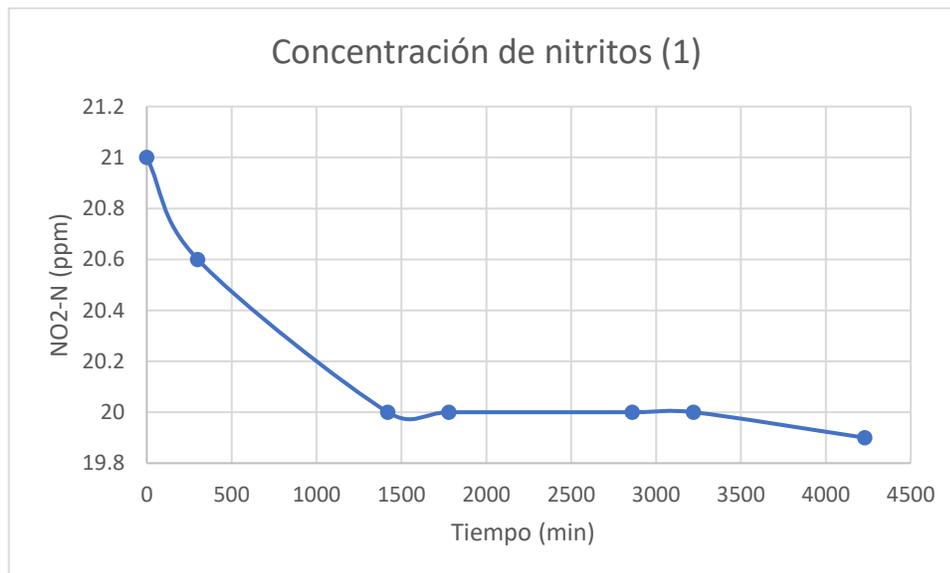
@ T 25° C, P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas



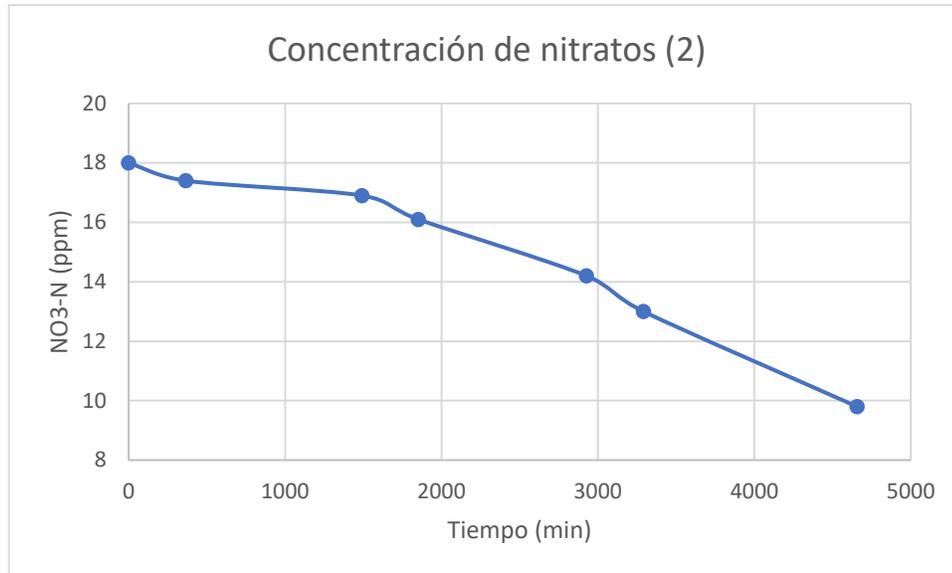
**Figura 19.** Concentración de  $\text{NO}_3\text{-N}$  de la corrida 1 del *Bacillus cereus*  
@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas



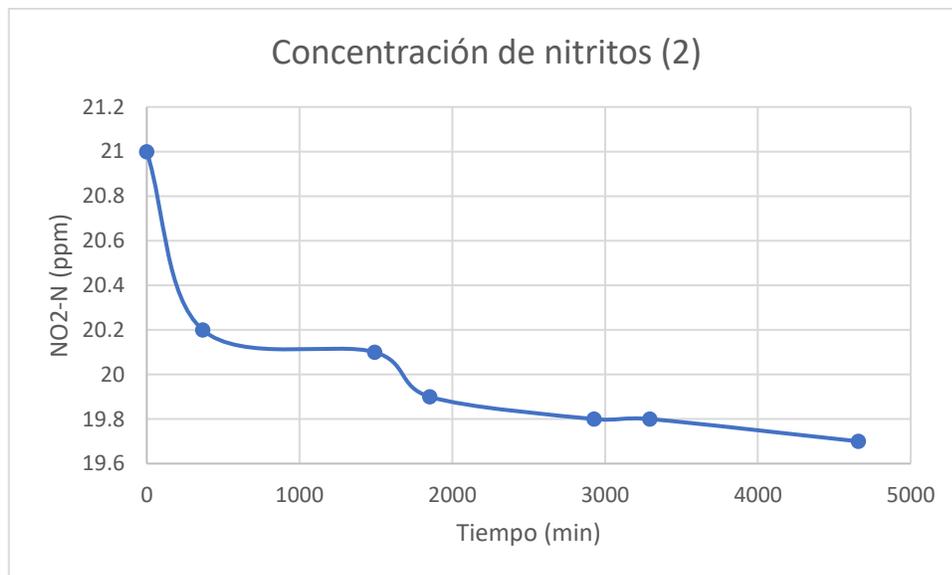
**Figura 20.** Concentración de  $\text{NO}_2\text{-N}$  de la corrida 1 del *Bacillus cereus*  
@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas



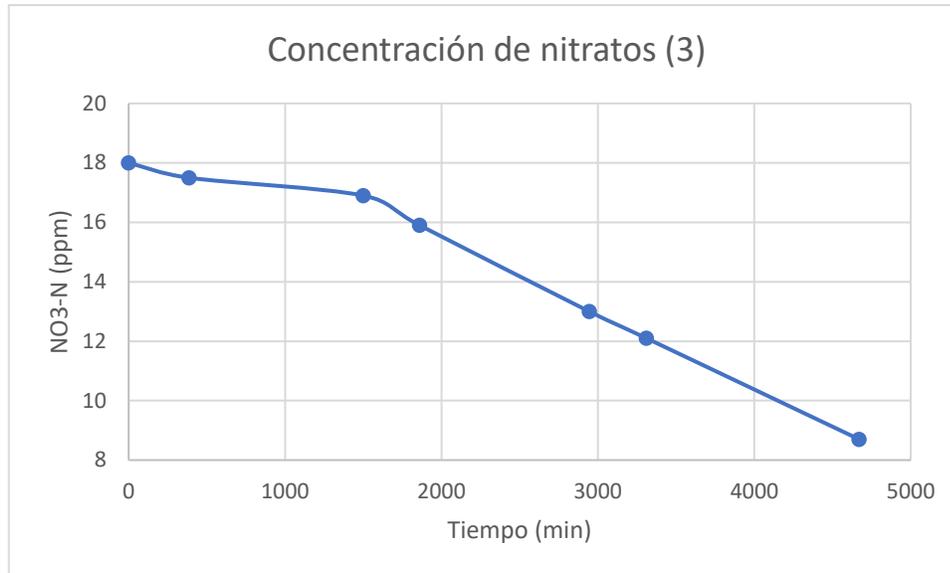
**Figura 21.** Concentración de  $\text{NO}_3\text{-N}$  de la corrida 2 del *Bacillus cereus*  
@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas



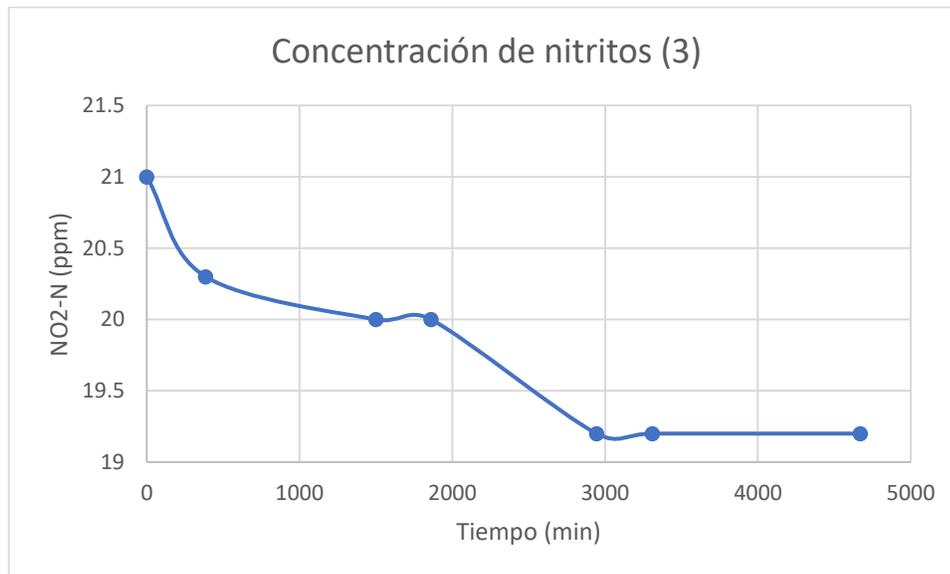
**Figura 22.** Concentración de  $\text{NO}_2\text{-N}$  de la corrida 2 del *Bacillus cereus*  
@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas



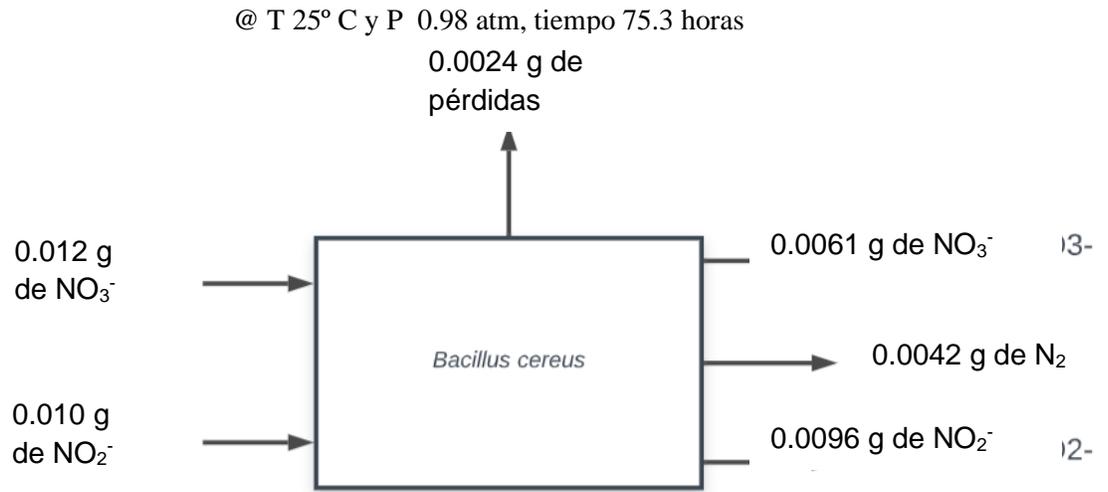
**Figura 23.** Concentración de  $\text{NO}_3^- \text{N}$  de la corrida 3 del *Bacillus cereus*  
@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas



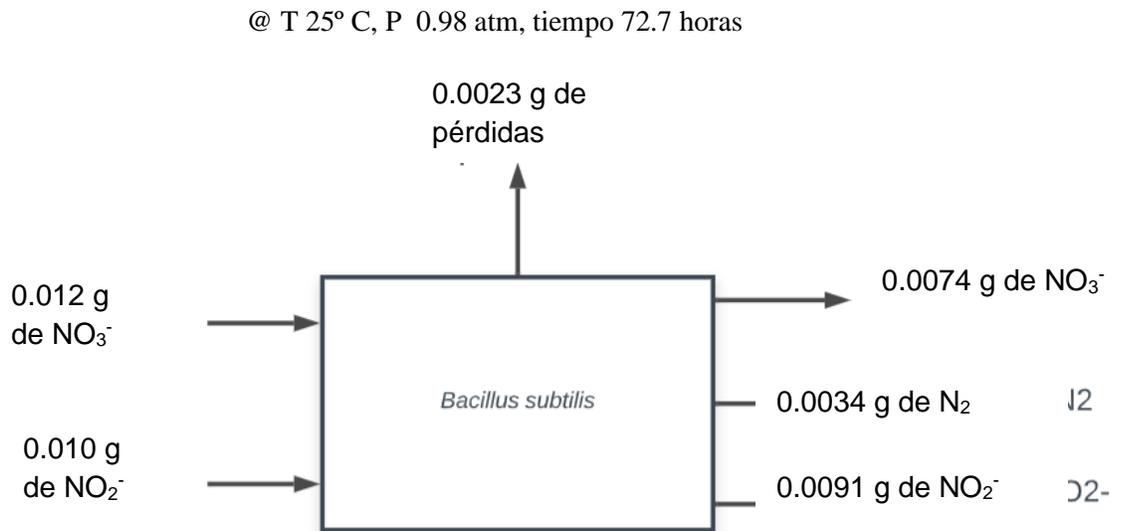
**Figura 24.** Concentración de  $\text{NO}_2^- \text{N}$  de la corrida 3 del *Bacillus cereus*  
@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas



**Figura 25.** Balance de masa de compuestos nitrogenados utilizando *Bacillus cereus*

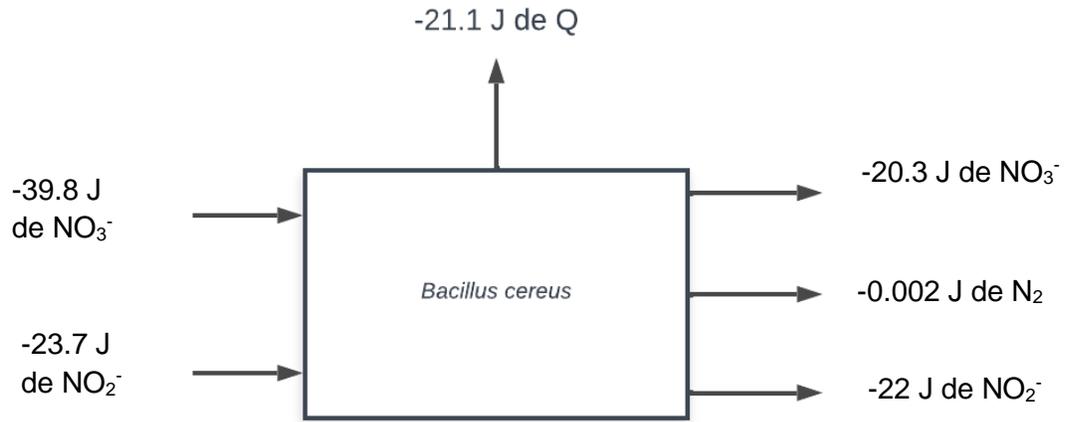


**Figura 26.** Balance de masa de compuestos nitrogenados utilizando *Bacillus subtilis*



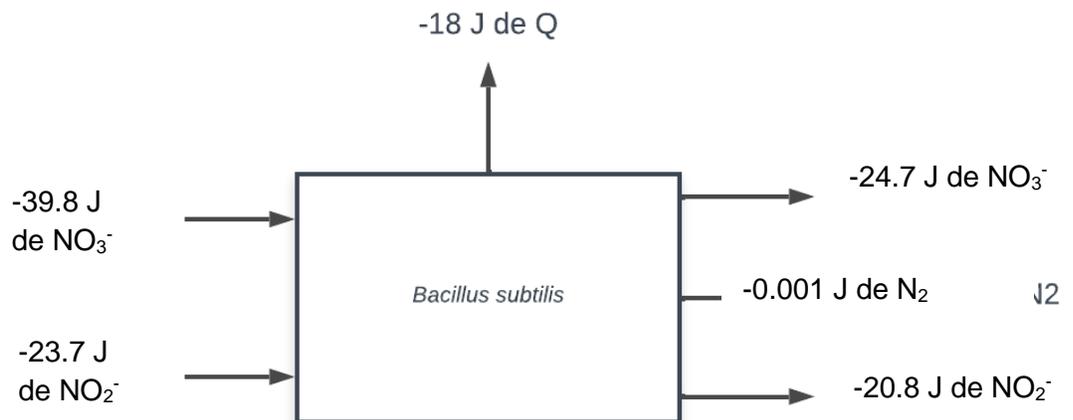
**Figura 27.** Balance de energía de compuestos nitrogenados utilizando *Bacillus cereus*

@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 75.3 horas



**Figura 28.** Balance de energía de compuestos nitrogenados utilizando *Bacillus subtilis*

@ T 25° C y P 0.98 atm, tiempo 72.7 horas



### C. Cálculos

#### Cálculo 1. Tasa de remoción

$$T = \left( \frac{Co - Cf}{tf} \right) * \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ hora}}$$

Donde:

T es la tasa de remoción en ppm/h

Co es la concentración inicial en ppm

Cf es la concentración final en ppm

Tf es el tiempo a la cual se tomó la concentración final en min

$$T = \left( \frac{18 \text{ ppm} - 9.1 \text{ ppm}}{4230 \text{ min}} \right) * \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ hora}}$$

$$T = 0.125 \text{ ppm/h}$$

Dicho ejemplo de cálculo fue realizado con los datos de la corrida 1 por parte del *Bacillus cereus*, y se utilizó la misma fórmula para todas las tasas de remoción calculadas para ambos nitritos y nitratos. Esto responde al objetivo número 2

#### Cálculo 2. Eficiencia de remoción

$$E = \left( 1 - \left( \frac{Cf}{Co} \right) \right) * 100$$

Donde:

E es al eficiencia en porcentaje

Cf es la concentración final en ppm

Co es la concentración inicial en ppm

$$E = \left( 1 - \left( \frac{9.1}{18} \right) \right) * 100$$

$$E = 49\%$$

El ejemplo fue realizado con los datos de la corrida 1 de nitratos por parte del *Bacillus cereus*, y se ejecutó la misma ecuación y procedimientos para todas las eficiencias de remoción calculadas ya sea tanto para nitritos como para nitratos. Esto responde al objetivo número 3

#### Cálculo 3. Cantidad inicial de nitratos

$$X = \left( 0.150 \text{ L} * 18 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 4.427 \right) * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}$$

$$X = 0.012 \text{ g de } NO_3^-$$

#### Cálculo 4. Cantidad inicial de nitritos

$$X = \left( 0.150 \text{ L} * 21 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 3.29 \right) * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}$$

$$X = 0.010 \text{ g de } NO_2^-$$

**Cálculo 5.** Cantidad de nitrógeno molecular generado a partir de nitratos y nitritos

$$0.006 \text{ g } NO_3^- * \frac{1 \text{ mol } NO_3^-}{62 \text{ g } NO_3^-} * \frac{41.5 \text{ mol } N_2}{27.67 \text{ mol } NO_3^-} * \frac{28 \text{ g}}{1 \text{ mol } N_2} = 0.004$$

$$0.0007 \text{ g } NO_2^- * \frac{1 \text{ mol } NO_2^-}{46 \text{ g } NO_2^-} * \frac{17.5 \text{ mol } N_2}{35 \text{ mol } NO_2^-} * \frac{28 \text{ g}}{1 \text{ mol } N_2} = 0.0002$$

$$\text{gramos } N_2 \text{ totales} = 0.0042$$

**Cálculo 6.** Cálculo de entalpía inicial de nitratos

$$0.01195 \text{ g } NO_3^- * \frac{1 \text{ mol } NO_3^-}{62 \text{ g } NO_3^-} * \frac{-206.57 \text{ kJ}}{1 \text{ mol } NO_3^-} * \frac{1000 \text{ J}}{1 \text{ kJ}} = -39.8 \text{ J}$$

**Cálculo 7.** Cálculo de entalpía inicial de nitritos

$$0.010 \text{ g } NO_2^- * \frac{1 \text{ mol } NO_2^-}{46 \text{ g } NO_2^-} * \frac{-105 \text{ kJ}}{1 \text{ mol } NO_2^-} * \frac{1000 \text{ J}}{1 \text{ kJ}} = -23.7 \text{ J}$$

**Cálculo 8.** Cálculo de entalpía final de nitratos

$$0.0074 \text{ g } NO_3^- * \frac{1 \text{ mol } NO_3^-}{62 \text{ g } NO_3^-} * \frac{-206.57 \text{ kJ}}{1 \text{ mol } NO_3^-} * \frac{1000 \text{ J}}{1 \text{ kJ}} = -24.7 \text{ J}$$

**Cálculo 9.** Cálculo de entalpía final de nitritos

$$0.0091 \text{ g } NO_2^- * \frac{1 \text{ mol } NO_2^-}{46 \text{ g } NO_2^-} * \frac{-105 \text{ kJ}}{1 \text{ mol } NO_2^-} * \frac{1000 \text{ J}}{1 \text{ kJ}} = -20.8 \text{ J}$$

**Cálculo 10.** Cálculo de entalpía final de nitrógeno molecular

$$0.0035 \text{ g } N_2 * \frac{1 \text{ mol } N_2}{28 \text{ g } N_2} * \frac{-10.5 \text{ J}}{1 \text{ mol } N_2} = -0.001 \text{ J}$$

**Cálculo 11.** Energía liberada de la reacción

$$\sum \text{Entradas} - \sum \text{Salidas} = \text{Calor liberado}$$

Donde

Entradas es la sumatoria de entalpías iniciales

Salidas es la sumatoria de salidas

$$(-39.8 - 23.7) + (-24.7 - 0.001 - 20.8) = \text{Calor} = -18 \text{ J}$$

D. Análisis estadístico

**Cálculo 3.** Tamaño de muestra

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * p * q}{e^2}$$

Donde:

n es tamaño de muestra buscado

Z es el parámetro estadístico que depende del nivel de insignificancia

e es el error de aceptación máximo aceptado  
 p es la probabilidad que ocurra el evento  
 q es la probabilidad que no ocurra el evento

$$n = \frac{1.96^2 * 0.9 * 0.1}{0.33^2}$$

$$n = 3.1$$

**Tabla 13.** Análisis de varianza para los nitratos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.01815	1	0.01815	9.81081081	0.03510995	7.70864742
Dentro de los grupos	0.0074	4	0.00185			
Total	0.02555	5				

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

$F > F_{crit}$  por lo que se rechaza la hipótesis nula en favor de la hipótesis alterna

#### Análisis de Fisher

Se utiliza la ecuación 7 mencionada en la metodología

$$LSD = [t_{\frac{0.05}{2}, (4)}] * \sqrt{\frac{2 * 0.00185}{3}}$$

$$LSD = 0.0975$$

$$valor\ absoluto(\mu_1 - \mu_2) = 0.11$$

$$valor\ absoluto(\mu_1 - \mu_2) > LSD$$

Las medias difieren estadísticamente entre sí

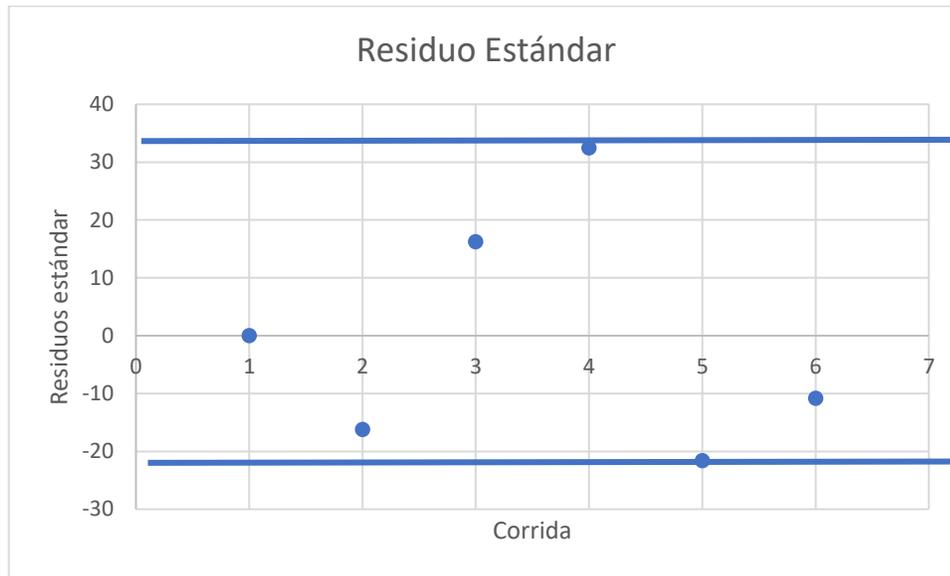
#### Residuos

Se utiliza la ecuación 8 y la ecuación 9 para llegar a obtener los residuos estándar.

**Tabla 14.** Residuos estándar para el análisis de varianza de nitratos

Posición	Residuo estándar
E11	0
E12	-16.21621622
E13	16.21621622
E21	32.43243243
E22	-21.62162162
E23	-10.81081081

**Figura 29.** Residuos estándar del análisis de varianza de nitratos



**Tabla 15.** Análisis de varianza para nitritos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00375	1	0.00375	5.48780488	0.07915239	7.70864742
Dentro de los grupos	0.00273333	4	0.00068333			
Total	0.00648333	5				

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

$F < F_{crit}$  por lo que no existe suficiente evidencia estadística para rechazar  $H_0$

**Análisis de Fisher**

Se utiliza la ecuación 7 mencionada en la metodología

$$LSD = [t_{\frac{0.05}{2}, (4)}] * \sqrt{\frac{2 * 0.00068333}{3}}$$

$$LSD = 0.0059$$

$$valor\ absoluto(\mu_1 - \mu_2) = 0.005$$

$$valor\ absoluto(\mu_1 - \mu_2) < LSD$$

Las medias no difieren estadísticamente entre sí

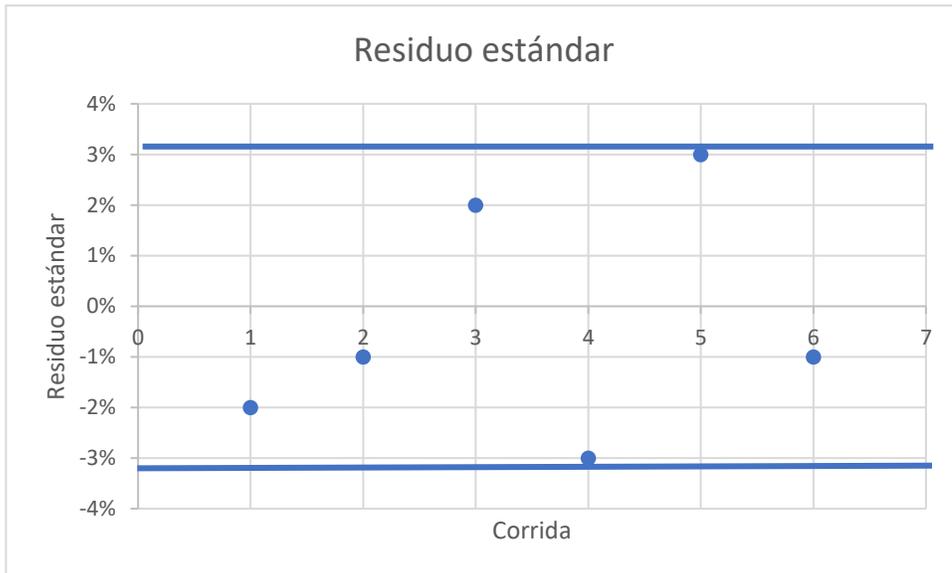
## Residuos

Se utiliza la ecuación 8 y la ecuación 9 para llegar a obtener los residuos estándar.

**Tabla 16.** Residuos estándar para el análisis de varianza de nitritos

Posición	Residuo estándar
E11	-29.26829268
E12	-14.63414634
E13	29.26829268
E21	-43.90243902
E22	43.90243902
E23	14.63414634

**Figura 30.** Residuos estándar del análisis de varianza de nitritos



### E. Análisis de error

**Cálculo 4.** Obtención de incertidumbre para resta

$$dz = \sqrt{0.1^2 + 0.1^2} = 0.14$$

**Cálculo 5.** Obtención de incertidumbre para división

$$dz = 49\% * \sqrt{\left(\frac{0.1}{9.1}\right)^2 + \left(\frac{0.1}{18}\right)^2} = 6.03 * 10^{-3}$$

## F. Datos calculados

**Tabla 17.** Tasas de remoción de *Bacillus subtilis*

	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N (ppm/h)	0.11±0.05	0.083±0.033	0.088±0.034
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N (ppm/h)	0.027±0.002	0.044±0.0023	0.031±0.004

**Tabla 18.** Tasas de remoción de *Bacillus cereus*

	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N (ppm/h)	0.13±0.03	0.11±0.04	0.12±0.07
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N (ppm/h)	0.016±0.006	0.017±0.004	0.023±0.0012

**Tabla 19.** Eficiencias de remoción del *Bacillus subtilis*

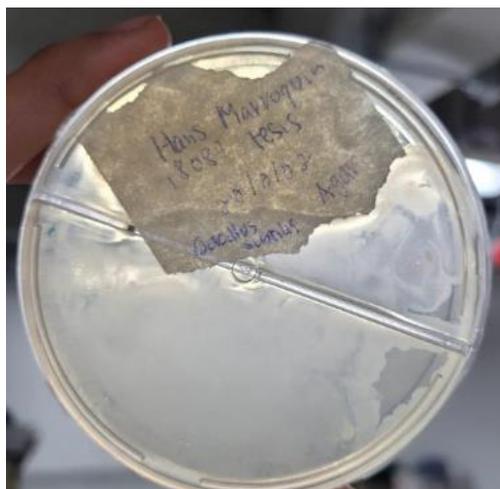
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N (%)	44±0.5	34±0.65	36±0.43
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N (%)	9±0.2	15±0.3	11±0.3

**Tabla 20.** Eficiencias de remoción del *Bacillus cereus*

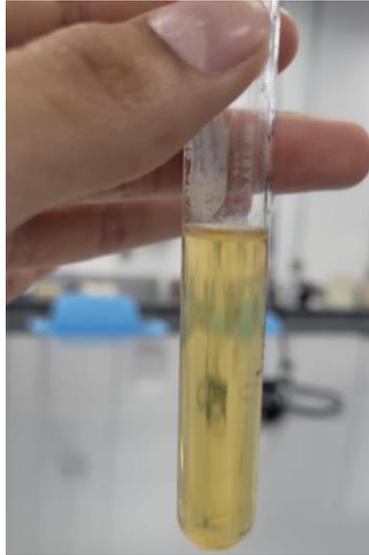
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N (%)	49±0.6	46±0.4	52±0.7
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> N (%)	5±0.1	6±0.09	9±0.2

## H. Fotografías

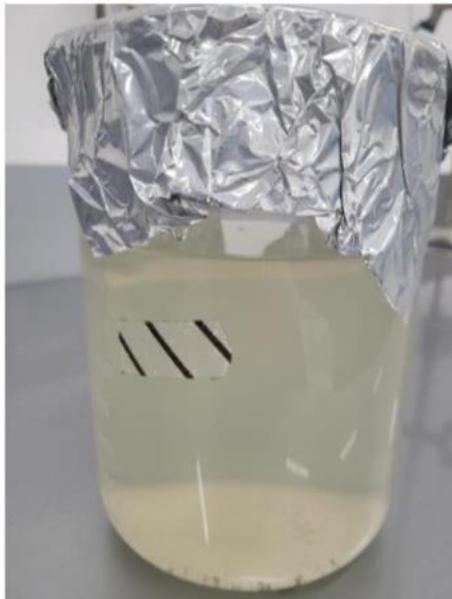
**Figura 31.** Siembra de microorganismo



**Figura 32.** Inoculación de microorganismos



**Figura 33.** Muestra de agua esterilizada



**Figura 34.** Procedimiento para medición de nitratos y nitritos



**Figura 35.** Fotómetro utilizado



### XIII. Glosario

**Acuoso:** Relacionado o que esté hecho de agua.

**Aeróbico:** Utiliza el oxígeno molecular para su ciclo de respiración celular.

**Afluente:** Caudal de agua que entra al sistema de proceso.

**Alcalinidad:** Tiene un pH mayor a 7.

**Amonificación:** Es la liberación de grupos amino o amoníaco a partir de compuestos orgánicos nitrogenados por microorganismos.

**Anaeróbico:** Un ambiente donde los microorganismos no utilizan el oxígeno molecular para la degradación de sustratos.

**Anóxico:** Un ambiente libre o bajo de oxígeno molecular donde los microorganismos utilizan los iones nitratos o nitritos para su ciclo de respiración celular.

**Bacillus:** Una bacteria en forma de varilla proveniente de la familia Bacillaceae.

**Biomasa:** La cantidad o peso de todos los organismos en el proceso de tratamiento de aguas residuales.

**Colorimetría:** Técnica de alta precisión para identificar concentraciones a partir del color que desprende una reacción química.

**Disimilatoria:** Reducción de iones nitratos o nitritos a nitrógeno molecular por la degradación de DBO.

**Electrón:** Una partícula fundamental con carga negativa, están agrupados en diferentes orbitales alrededor del núcleo del átomo.

**Endógeno:** Es la degradación de la reserva interna de sustrato.

**Enzima:** Una molécula de origen proteico encontrada dentro de la célula o liberada por esta, la cual aumenta la tasa con la que se lleva a cabo una reacción química sin la enzima ser consumida.

**Estado de oxidación:** El número de electrones que se tiene que añadir a un catión o remover de un anión para producir un átomo con carga neutra.

**Fermentación:** Un metabolismo que involucra la secuencia de óxido-reducción de reacciones de dos compuestos para generar un producto.

**Inhibición:** Es la acción de reprimir la actividad de una enzima.

**Inorgánico:** Compuestos que no contienen elementos tales como el carbono e hidrógeno.

**Metabolismo:** Es la actividad celular, como la degradación de DBO.

**Nitrogenasa:** Es la enzima específica para romper el triple enlace en el nitrógeno molecular.

**Nitrógeno total de Kjeldahl:** Es la cantidad de amoníaco y nitrógeno orgánico en una muestra de aguas residuales.

**Oxidación:** Es la adición biológica o química de oxígeno a un compuesto.

**Reducción:** Es la adición de electrones a un compuesto o en otras palabras, la remoción de oxígeno.

**Redox:** Es la medida de la cantidad de compuestos oxidados y reducidos en un ambiente.

**Respiración:** Es un tipo de metabolismo que requiere de un aceptor de electrones para la oxidación del sustrato.

**Soluble:** En solución.

**Sustrato:** Comida o DBO.