



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR UNIDAD DURANGO**

**“INNOVACIÓN TECNOLÓGICA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES
DOMESTICAS CON BIOFILTROS ORGÁNICOS”.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

JUAN MANUEL VIGUERAS CORTÉS

DIRECTORES DE TESIS

DR. IGNACIO VILLANUEVA FIERRO

DR. MARCO ANTONIO GARZÓN ZÚÑIGA

Victoria de Durango, Dgo., Julio de 2012.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR UNIDAD DURANGO**

**“INNOVACIÓN TECNOLÓGICA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES
DOMESTICAS CON BIOFILTROS ORGÁNICOS”.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

JUAN MANUEL VIGUERAS CORTÉS

DIRECTORES DE TESIS

DR. IGNACIO VILLANUEVA FIERRO

DR. MARCO ANTONIO GARZÓN ZÚÑIGA

Victoria de Durango, Dgo., Julio de 2012.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 15:00 horas del día 26 del mes de Junio del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN DGO para examinar la tesis titulada:
Innovación tecnológica para tratamiento de aguas residuales domésticas con biofiltros orgánicos

Presentada por el alumno:

VIGUERAS

CORTÉS

JUAN MANUEL

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	2	3	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Ignacio Villanueva Fierro


Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga


Dr. José de Jesús Navar Chaidez


Dr. Isaías Chairez Hernández

Dr. César Hugo Hernández Rodríguez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. José Antonio Ávila Reyes



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 22 de Junio del 2012

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Durango en su sesión extraordinaria No. 5 celebrada el día 24 del mes de Septiembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

VIGUERAS

CORTÉS

JUAN MANUEL

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

B	0	8	1	2	3	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

"Innovación tecnológica para tratamiento de aguas residuales domésticas con biofiltros orgánicos"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Tratamiento de agua.

Uso de fibra de agave.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. Ignacio Villanueva Fierro, Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en: CIIDIR- IPN UNIDAD DURANGO

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Ignacio Villanueva Fierro
Dr. Ignacio Villanueva Fierro

Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga
Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga

Aspirante

Presidente del Colegio

M. en I. Juan Manuel Vigueras Cortés
M. en I. Juan Manuel Vigueras Cortés

Dr. José Antonio Ávila Reyes
Dr. José Antonio Ávila Reyes



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **22** del mes de **JUNIO** del año **2012**, la que suscribe **JUAN MANUEL VIGUERAS CORTÉS** alumno del Programa de **DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA** con número de registro **B081231**, adscrito a **CIIDIR-IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **DR. IGNACIO VILLANUEVA FIERRO** y del **DR. MARCO ANTONIO GARZÓN ZÚNIGA** y cede los derechos del trabajo intitulado **INNOVACIÓN TECNOLÓGICA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS CON BIOFILTROS ORGÁNICOS**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección jmvigueras@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


JUAN MANUEL VIGUERAS CORTÉS

Nombre y Firma

Este trabajo se realizó en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, CIIDIR IPN Unidad Durango y en el Laboratorio de Microbiología General de la ENCB-IPN, bajo la dirección del Dr. Ignacio Villanueva Fierro de Centro y el Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) y es parte suplementaria del proyecto “Evaluación de una tecnología innovadora para tratamiento de aguas residuales” con registro SIP 20080546.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ignacio Villanueva Fierro y Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga por su dirección en la realización de este estudio, compartir su experiencia para mejorar el logro de los objetivos y resultados planteados, pero en especial por brindarme su amistad que es la clave del éxito de esta investigación.

A los asesores técnicos del proyecto el Dr. José de Jesús Návar Cháidez, quien en momentos cruciales dirigió los rumbos de la fase experimental del estudio con una visión más acorde a los propósitos planteados, por el apoyo técnico de alta calidad en el análisis de resultados y por compartir su amistad y visión crítica del quehacer de la investigación.

Al Dr. César Hugo Hernández Rodríguez por tu apoyo incondicional en el trabajo microbiológico y compartir el uso de instalaciones, equipo, materiales y financiamiento en la secuenciación de las muestras, pero algo muy valioso que me ofreciste y que sin conocerme hasta antes de solicitar tu asesoría, es que me hayas favorecido con tu amistad amigable y desinteresada y por ese don de gente que hace que muchos de tus alumnos se aprovechen de ti.

Al Dr. Isafías Chaires Hernández por la asesoría ofrecida durante el estudio y en la fase final de este informe que sin en el análisis crítico los resultados no se hubieran validado estadísticamente y, particularmente por favorecerme con su amistad.

Un recuerdo y agradecimiento perenne para los académicos del CIIDIR IPN Unidad Durango que nos apoyaron con conocimiento y experiencia durante las disertaciones de sus asignaturas

A las profesionistas Ing. Monserrat Villanueva Castillo, Ing. Maritza Vázquez Reyes y en especial a la Ing. Sandra Janett Alvarado Reyes por el apoyo en la realización de técnicas del laboratorio durante la fase experimental.

Al personal de apoyo del CIIDIR IPN Unidad Durango por ser toral en el funcionamiento de las instalaciones y apoyo en el suministro de aguas residuales durante estudio, especialmente para José Ernesto Trujillo, Heriberto Gómez Figueroa y Raúl Ramírez Mendoza.

Al Ing. Miguel Calderón Arámbula e Ing. Jorge Luis Morales Ibáñez autoridades de Aguas del Municipio de Durango (AMD) y Director de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Durango por facilitarnos la toma de muestras del agua residual.

DEDICATORIAS ESPECIALES

Para mi esposa Dora María Clara que con su amor y calidad de mujer triunfadora puso el ejemplo para no claudicar en este trabajo y me impulsó y apoyó en los momentos difíciles que toda meta conlleva hasta su fin.

Para mis hijos Nhilma Nallely, Iliana y Juan Manuel que son el sostén del amor familiar y que siempre, con sus maneras especiales, fueron el bastión para no quedarme en el camino y me impulsaron hasta llegar a la meta trazada.

Para Víctor Daniel Ríos García y Jorge Alberto Sevilla por sus apoyos y motivaciones recibidas.

Para mis nietas Tabata e Lía Thais que con sus miradas y travesuras vinieron como catalizador a dar luz y felicidad en estos días de intenso trabajo.

A mis padres Don Juan Vigueras Reyna y Ma. Guadalupe Cortés Pérez que con su ejemplo de templanza y paciencia me inculcaron el espíritu de perseverancia y de triunfo en toda empresa que uno se proponga realizar.

Para mis hermanos Sol, Gre, Lupita, Coco, Vero, Toño y José Luis con sus respectivas parejas Aarón, Mayolo, Alfredo, Adrian, Vicky y Malena por el cariño y apoyo que siempre me han mostrado y en especial para alentarme en este proceso de formación.

También para los sobrinos, que son muchos, por su aprecio y cariño que me brindan.

Al G.:A.:D.:U.: por darme salud, fortaleza y trabajo.

A los amigos por su fraternal aprecio y muestras de ánimo que siempre me mostraron.

INDICE

Resumen	1
Abstract	1
I. Introducción	2
II. Antecedentes	4
2.1 Tratamiento de aguas residuales.....	4
2.2 Estudios de diversidad microbiana.....	8
2.3 Justificación	15
2.4 Primera hipótesis	17
2.5 Segunda hipótesis.....	17
2.6 Objetivo general	17
2.7 Objetivos específicos	17
III. Materiales y métodos.....	18
3.1 Construcción e instalación de biofiltros.....	18
3.2 Material de empaque.	19
3.3 Agua residual municipal.....	20
3.4 Caracterización fisicoquímica y biológica del agua residual municipal y los efluentes de los BFs.	20
3.5 Proceso de identificación de los microorganismos.	21
3.5.1 Muestreo del material soporte de la biopelícula y conservación de muestras.....	21
3.5.2 Crecimiento de la población microbiana en medios de cultivo específicos.....	21

3. 5.3	Extracción y comprobación del ADN con electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.....	23
3. 5.4	Amplificación y purificación del ADN con la PCR.....	23
3.6	Extracción de ADN metagenómico para la prueba de DGGE.....	25
3.7	Reacción en cadena de la polimerasa y los fragmentos del gen 16S RNA para DGGE.....	25
3.8	Desarrollo de la prueba de la DGGE.	27
3.9	Identificación de las cepas de microorganismos secuenciadas y análisis filogenético.....	28
3.10	Diseño experimental.	28
IV.	Resultados y Discusión	31
4.1	Composición del agua residual municipal.	31
4.2	Remoción de materia orgánica.....	32
4.2.1.	Remoción de la DBO5.	32
4.2.2.	Remoción de DQO.....	34
4.2.3.	Resultados del análisis de covarianza.	36
4.3	Efecto aire.	36
4.3.1.	Efecto aire sobre la remoción de materia orgánica.	36
4.3.2.	Efecto aire sobre la remoción de coliformes fecales.	40
4.3.3.	Remoción de huevos de helminto.	43
4.3.4.	Efecto aire en la remoción de SST.....	43
4.4	Efecto empaque.	47
4.5	Factor carga hidráulica superficial.....	49

4.6	Efecto de la temperatura como covariable.	55
4.7	pH y conductividad eléctrica.....	57
4.8	Cuantificación de microorganismos en medios de cultivo específicos. 58	
4.9	Identificación de componentes de la población bacteriológica a través de la DGGE-PCR con ampliación del gen 16S rRNA en muestras de los biofiltros orgánicos.	79
V.	Sugerencias y recomendaciones.....	87
VI.	Conclusiones	88
VII.	Bibliografía.....	91
VIII.	Anexos.....	104
X.	Artículo enviado a la revista Water Science and Technology.	110

Relación de Tablas

Tabla 1 Composición de la mezcla de reacción para amplificar el ácido desoxirribonucleico en la reacción en cadena de la polimerasa en muestras de morfotipos.....	23
Tabla 2 Condiciones operacionales del termociclador durante la reacción en cadena de la polimerasa.	24
Tabla 3 Composición de la mezcla de reacción de la reacción en cadena de la polimerasa en la prueba de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizado.	26
Tabla 4 Condiciones de operación de la reacción en cadena de la polimerasa en la prueba de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizado.	26
Tabla 5 Resultados de análisis de covarianza de cada uno de los parámetros de evaluación de los biofiltros empacados con fibra de agave	36
Tabla 6 Análisis de medias del efecto aire sobre la DBO5 en las series de biofiltros.	39
Tabla 7 Prueba de medias del efecto aire sobre la remoción de coliformes fecales en las dos series de biofiltros	43
Tabla 8 Prueba de medias del efecto aire sobre la remoción de sólidos suspendidos totales.....	46
Tabla 9 Efecto de la interacción empaque*carga hidráulica en la remoción de la demanda química de oxígeno en las dos series de biofiltros.	49

Tabla 10 Efecto Carga hidráulica sobre los parámetros de evaluación del proceso de biofiltración	50
Tabla 11 Resultados de la ANCOVA de la relación demanda química de oxígeno/demanda bioquímica de oxígeno.....	52
Tabla 12 Prueba de medias para el efecto de la interacción aire*CHS en la relación demanda química de oxígeno/demanda bioquímica de oxígeno.	53
Tabla 13 Efecto de la interacción aire*CHS sobre la remoción de coliformes fecales en los biofiltros orgánicos.....	55
Tabla 14 Concentración de los diferentes microorganismos que conforman la biopelícula.....	59
Tabla 15 Concentración de diferentes microorganismos que conforman la biopelícula.....	60
Tabla 16 Concentración de microorganismos presentes en el efluente de los biofiltros.....	64
Tabla 17 Lista de microorganismos presuntivos amplificados con el 16S rRNA que pertenecen al <i>Pyilum Bacterioidates</i> y <i>Firmicutes</i> aislados de los biofiltros orgánicos.....	67
Tabla 18 Lista de microorganismos presuntivos de las amplificaciones del gen 16S rRNA aislados en la biopelícula de los biofiltros y cultivados en diferentes medios de cultivo.....	69
Tabla 19 Lista de microorganismos presuntivos en la fracción cultivable y amplificados con el gen 16S rRNA encontrados en la biopelícula de los biofiltros empacados con fibra de agave y que pertenecen al <i>phylum Protobacteria</i>	77

Tabla 20 Microorganismos clasificados según la posición en la columna del biofiltro con aire.	78
Tabla 21 Microorganismos clasificados según la posición en la columna del biofiltro sin aire.....	79
Tabla 22 Listado de microorganismos presentes en las ampliaciones del gen 16S rRNA aisladas de la biopelícula de los biofiltros orgánicos con aire con la técnica de la DGGE.....	83
Tabla 23 Listado de microorganismos presentes en las ampliaciones del gen 16S rRNA aisladas de la biopelícula de los biofiltros orgánicos con aire con la técnica de la DGGE.....	84
Tabla 24 Listado de microorganismos presentes en las ampliaciones del gen 16S rRNA aisladas de la biopelícula de los biofiltros orgánicos sin aire con la técnica de la DGGE.....	85

Relación de Figuras

Figura 1 Representación esquemática de un biofiltro con aire.....	19
Figura 2 Remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en los biofiltros con aire.	33
Figura 3 Remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en los biofiltros sin aire.	34
Figura 4 Remoción de la demanda química de oxígeno en los biofiltros con aire....	35
Figura 5 Remoción de la demanda química de oxígeno en los biofiltros sin aire.	35
Figura 6 Efecto aire sobre la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en las dos series de biofiltros.....	38
Figura 7 Efecto aire sobre la remoción de la demanda química de oxígeno en los biofiltros.....	39
Figura 8 Remoción de coliformes fecales durante el periodo de estudio de los biofiltros aireados.	41
Figura 9 Remoción de coliformes fecales durante el periodo de estudio de los biofiltros sin aire.	41
Figura 10 Efecto aire sobre la eficiencia de remoción de coliformes fecales en las dos series de biofiltros.	42
Figura 11 Remoción de sólidos suspendidos totales en los efluentes de los biofiltros con aire.	44
Figura 12 Remoción de sólidos suspendidos totales en biofiltros sin aire.....	45
Figura 13 Efecto aire sobre la remoción de sólidos suspendidos totales en las series de biofiltros.....	46
Figura 14 Efecto del empaque en la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en las dos series de biofiltros.	47
Figura 15 Efecto del empaque en la remoción de la demanda química de oxígeno en las dos series de biofiltros.	48
Figura 16 Efecto de la interacción carga hidráulica superficial*empaque en la remoción de demanda química de oxígeno.	49

Figura 17 Efecto de la interacción carga hidráulica superficial*aire en la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en las dos series de biofiltros. (Medias con las mismas letras no hay diferencias significativas).....	51
Figura 18 Efecto de la interacción en la relación demanda química de oxígeno/demanda bioquímica de oxígeno para los biofiltros con aire y sin aire. (Medias con las mismas letras no hay diferencias significativas).....	53
Figura 19 Efecto estadístico de la interacción carga hidráulica superficial*aire en la remoción de coliformes fecales (Medias con las mismas letras no hay diferencias significativas).....	54
Figura 20 Efecto temperatura en la eficiencia de remoción de demanda química de oxígeno en las series de biofiltros con aire y sin aire.	56
Figura 21 Efecto temperatura en la eficiencia de coliformes fecales en las series de biofiltros con aire y sin aire.....	57
Figura 23 Presencia de ADN puro de muestras de morfotipos antes de la amplificación del gen 16S rRNA.....	58
Figura 24 Concentración promedio de microorganismos en tres secciones de los biofiltros con aire.	61
Figura 25 Concentración promedio de microorganismos en tres secciones de los biofiltros sin aire.	63
Figura 26 Árbol filogenético de los amplificados con el gen 16S rRNA aislados de la biopelícula de los biofiltros con y sin aire en los diferentes medios de cultivo con 1000 replicas (prueba de Bootstrap) correspondientes al <i>Phylum bacteroidetes</i> y <i>Firmicutes</i>	65
Figura 27 Árbol filogenético de la amplificación del gen 16S rRNA aislados de la biopelícula de los biofiltros con y sin aire en los diferentes medios de cultivo, con 1000 replicas (prueba de Bootstrap) correspondientes al <i>Phylum Actinobacterias</i> . La barra representa el 1% de cambios entre las frecuencias.....	68
Figura 28 Árbol filogenético, fraccionado en cuatro secciones, de la amplificación del gen 16S rRNA aislados de la biopelícula de los biofiltros con y sin aire en los diferentes medios de cultivo, con 1000 replicas (prueba de Bootstrap)	

correspondientes al <i>Phylum Protobacteria</i> . La barra representa el 2% de cambios entre las secuencias.....	75
Figura 29 Presencia de ADN puro en las muestras extraídas de la biopelícula para la DGGE.....	80
Figura 30 Imagen de las bandas obtenidas 21 muestras con la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizado.	81
Figura 31 Recorte de bandas del gel desnaturalizado en la técnica de la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizado.	82

Resumen

La fibra de agave es un material de desecho de la industria mezcalera aún no reportada en la literatura como material soporte en el proceso de biofiltración. Se estableció como hipótesis que los factores aire (2), platos de separación (3) y carga hidráulica superficial (CHS) producen efluentes que no cumplen los estándares nacionales e internacionales en la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), coliformes fecales (CF), huevo de helmintos (HH) y sólidos suspendidos totales (SST). Dos series con tres biofiltros (BF) fueron evaluados, la primera serie se probó a una velocidad de aireación de $0.62 \text{ m}^3 \text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$ y la segunda sin aire; cada serie se empacó con diferente número de platos de separación (4, 8 ó 12) a lo largo de la columna: Los BFs se probaron con cinco CHS 0.27, 0.54, 0.80, 1.07 y $1.34 \text{ m}^3 \text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$, estableciendo la temperatura del agua de entrada como covariable, durante 17 meses. Con técnicas de biología molecular se determinaron las especies microbianas más sobresalientes en cada serie de BFs predominando *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Yersinia*, *Pandorea*, *Aeromonas*, *Stenothrophomonas*; *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Sphingobacterium*; *Chryseobacterium*, *Cellulomonas* and *Arthrobacter* pertenecientes al phylum *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Actinobacterias*. Resultados estadísticos muestran que los factores temperatura (T), aire (A), CHS y las interacciones A*CHS y empaque*aire (FA*A) son estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Se concluye que los biofiltros empacados con fibra de agave producen efluentes que cumplen con los estándares internacionales de la USA-EPA y las normas oficiales mexicanas por lo que los efluentes pueden reusarse en riego agrícola y áreas verdes, previa desinfección.

Abstract

Agave fiber is a byproduct of the mescal industry that has not been reported as material support in biofiltration processes. This study set as hypothesis that air (2), separation plates (3), and hydraulic loading rates (HL) (5) would produce effluents that do not meet set standards for 5 d biochemical oxygen demand (BOD_5); helminth eggs (HE), fecal coliforms (FC), and total suspended solids (TSS). Two series of three biofilters (BF) each were tested; the first one had an aeration rate of $0.62 \text{ m}^3 \text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$; and no air was fed into the second set. Each of two sets of biofilters was divided with 4, 8 or 12 acrylic plates installed along the column to reduce compaction of the material support. All biofilters were run at 0.27, 0.54, 0.80, 1.07, and $1.34 \text{ m}^3 \text{m}^{-2} \text{d}^{-1}$ HL using inlet wastewater temperature as a covariable since the experiment lasted 17 continuous months. Polymerase chain reaction, denaturing gradient gel electrophoresis and ribosomal gene library analyses revealed that species diversity in biofilm of two series of biofilters was dominated by members of *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Yersinia*, *Pandorea*, *Aeromonas*, *Stenothrophomonas*; *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Sphingobacterium*; *Chryseobacterium*, *Cellulomonas* and *Arthrobacter* of *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Actinobacteria* phylum. Statistics results show that factors temperature, air, HL and interactions air*HL and packing*air are statistically significant ($p < 0.05$). It is concluded that BF's packed with agave fiber produce effluents that fulfill the national and USA-EPA standard criteria,

except in fecal coliforms, and then the effluents can be used to irrigate agricultural soil and green areas, after disinfection.

I. Introducción

El tratamiento de aguas residuales en las localidades alejadas de los grandes centros de población requiere ser atendido con tecnología disponible que pueda adaptarse a las condiciones técnicas, económicas y sociales de estos sitios. Ante la falta de recursos lo más común del manejo de las aguas residuales es alejarlas del sitio de generación y descargarlas a cuerpos receptores sin recibir tratamiento alguno. Si bien es cierto que existen procesos biotecnológicos con alta eficiencia de remoción de contaminantes presentes en las aguas residuales (Wagner et al., 2002), estos procesos exigen una inversión considerable para su construcción y personal calificado para operación y mantenimiento.

El proceso de biofiltración con materiales orgánicos es una tecnología que produce efluentes que cumplen con los estándares, desde el punto de vista tecnológico, con la gran ventaja de ser flexibles en su operación (Garzón et al., 2005). El sistema puede ser modular, lo que permite adaptarlo en función de la complejidad del efluente a tratar, de los objetivos de descarga y del incremento del gasto de la descarga, esto permite hacer adaptaciones para acondicionar al crecimiento de los generadores de aguas residuales como es el caso de las comunidades rurales, agroindustrias y de los propios centros de educación e investigación. Se ha demostrado que no requieren grandes inversiones, son sencillos en su operación y que las dimensiones se reducen a una quinta parte de una planta convencional (Garzón Zúñiga et al., 2008).

El proceso de biofiltración en materiales orgánicos se caracteriza por ser un proceso de crecimiento adherido, esto es, los microorganismos, crecen en superficies rugosas, formando ahí la biopelícula a diferencias de los cultivos suspendidos como el caso de lodos activados. Debido a que los materiales orgánicos son porosos, con alto contenido de huecos o vacíos, propicia que a través de cuatro mecanismos simultáneos actúen sobre los componentes de las aguas residuales a remover. Estos son 1) filtración lenta y pasiva, 2) absorción, adsorción e intercambio iónico, 3)

biodegradación y 4) desinfección (Buelna et al., 2011). El control de la carga aplicada permite un equilibrio entre el crecimiento y el decrecimiento de la biomasa, lo que conduce a una biodegradación pasiva de los contaminantes, sin producción de lodos biológicos.

Los materiales filtrantes más utilizados han sido la turba, cascara de madera, virutas y astillas de madera de diferente tipo de árboles y fibras naturales como fibra de coco y fibra de palma datilera (Lens et al., 1994; Buelna y Bélanger, 1991; Garzón.Zúñiga y Buelna, 2011)

La aportación de este estudio es la innovación de la fibra de agave como material soporte de la biopelícula, que aún no ha sido reportado como material de empaque en el proceso de biofiltración en la literatura científica revisada. Los biofiltros orgánicos empacados con este material se evalúan con aire y sin adición de aire, e innovando un sistema de platos de separación a lo largo de la columna con la finalidad de evitar problemas de funcionamiento como son el taponamiento o azolvamiento del material de empaque sí como la pérdida de carga o presión del aire que limite el tiempo de uso de los biofiltros. Debido a que en la literatura no se ha reportado cual es el desconocimiento técnico de saber cuál era el flujo o carga hidráulica de operación óptima se propuso evaluar los biofiltros con cinco cargas hidráulicas aplicando un diseño de bloques subdivididos en un experimento factorial con una covariable en la temperatura del agua a la entrada de cada BF, a fin de poder explicar las respuestas estadísticas del proceso de biofiltración. Así, bajo estas condiciones se obtuvieron efluentes que cumplen con estándares nacionales e internacionales que pueden ser reutilizados en proyectos de irrigación agrícola y de áreas verdes, previa desinfección.

Como contribución adicional al término del estudio, mediante técnicas de biología molecular se identificó la comunidad microbiana más sobresaliente que se encuentra en mayor proporción responsables de la remoción de contaminantes en el agua residual bajo las condiciones particulares del proceso de biofiltración, ya que en la

literatura no se reporta comúnmente qué consorcios son los que degradan la materia orgánica.

II. Antecedentes

2.1 Tratamiento de aguas residuales.

Los procesos de tratamiento para remover contaminantes específicos, de acuerdo a las necesidades de reuso de los efluentes de aguas residuales domésticas e industriales son procesos biotecnológicos que han sido aplicados ampliamente (Wagner et al; 2002). Los procesos de lodos activados en sus diferentes modalidades, filtros percoladores y reactores anaerobios han sido empleados para tratamiento de aguas residuales de grandes centros de población (Metcalf y Eddy, 1991; Crites y Tchobanoglous, 1998). Sin embargo, la complejidad de operación, los altos costos de inversión y de mantenimiento han limitado su aplicación a comunidades rurales y a la pequeña y mediana industria (Buelna, 1994). La aplicación de sistemas de infiltración rápida en suelo así como el uso de humedales y lagunas de oxidación en comunidades rurales han obtenido excelentes resultados en remoción de la DBO_5 , nitrógeno total (NT), SST y fosforo total (P) (Yi et al.; 2007). La infiltración en suelo y percolación ha sido uno de los métodos más sencillos y económicos (Bomo et al., 2004). La desventaja de estos sistemas es que requieren bastante terreno, por lo que encarecen su aplicación (Wilderer et al.; 2000).

El proceso de biofiltración se ha aplicado desde 1893, a través de los filtros percoladores, empleando originalmente materiales inertes soporte de la masa bacteriana como rocas, porcelana y escoria (Metcalf y Eddy, 1991; Ramalho, 1996; Wilderer et al., 2000; Kennes y Viega, 2002; Hu y Gagnon, 2006; Dorado et al., 2010). Actualmente, varios tipos y formas de plástico se han venido empleando en la degradación aeróbica de la materia orgánica principalmente por bacterias heterotróficas (Wick, 2003). Yoon et al. (2008) obtuvo eficiencias de remoción de

88.5 % de DBO₅ y 82.9% de SS en biofiltros aerobios con melanina flexible como material filtrante.

Sin embargo, en las dos últimas décadas la biofiltración con material orgánico ha cobrado importancia en Canadá, Bélgica y Estados Unidos (Garzón y Buelna, 2011); ya que es un proceso muy versátil para remover contaminantes del aire, agua para consumo y aguas residuales domésticas e industriales (Buelna, 1994). Powelson et al. (2006) evaluaron el uso de biofiltros en la remoción de metano en las emisiones de un relleno sanitario disminuyendo el flujo de emisión de gases de efecto invernadero, empleando biofiltros con una mezcla de materiales de composta de hojas y ramas y “pellets” de poliestireno expandido.

Los microorganismos que crecen sobre la superficie de los material filtrante que actúa como soporte se denomina biopelícula (Chaudary et al.; 2003). Estos soportes pueden ser orgánicos e inertes (

En los biofiltros el agua residual se alimenta por la parte superior, se infiltra y fluye hacia la parte baja, al igual que en un sistema de filtro percolador (Metcalf y Eddy, 1991). Es un proceso de filtración lenta y pasiva debido a que la velocidad de filtración es muy baja (≤ 0.5 m/d), y al paso por el medio filtrante los contaminantes quedan retenidos por mecanismos de adsorción, absorción e Intercambio iónico, que aprovechan los microorganismos para degradar la materia orgánica (Garzón Zúñiga et al., 2007; Buelna et al., 2011). La materia orgánica es transformada a compuestos como dióxido de carbón, agua y algunos nutrientes como fosfatos y compuestos nitrogenados como NO_3^- , NH_4^+ y N_2 , principalmente (Gaudy y Gaudy, 1988).

La aplicación de biofiltros aerobios se debe a que son sistemas económicos, sencillos y eficiente en la purificación del agua (Makarevich et al., 2000; Garzón Zúñiga et al., 2005). Estos se han aplicado para el tratamiento de agua residual en gastos bajos de unidades habitacionales y hoteles (Chaudhary et al., 2003); para remover compuestos recalcitrantes en aire (Das Neves et al., 2006; Krishnakumar et

al., 2007); remoción de herbicidas y antibióticos en biofiltros desnitrificantes empacados con astillas de madera (Ilhan et al., 2011).

Con astillas de madera, Lens et al. (1994) obtuvieron una remoción de 72% de SS; 63% de DQO; 97% de DBO₅ y 64% de N-NH₄⁺. Buelna y Bélanger (1991) empleando turba obtuvieron 98% SS, 96% de DBO₅, 87% de DQO y 99% de coliformes fecales. Garzón Zúñiga y Moeller (2007) en biofiltros aerobios emplearon como soporte residuos de madera de diferentes especies y obtuvieron una remoción 98.5% de DBO₅. Garzón-Zúñiga et al. (2008) evaluaron la remoción de patógenos con biofiltros aerobios empleando astillas de madera y fibras naturales removiendo 98% de DBO₅; 99.99% de CF y 96.9% HH. Corley et al. (2006) utilizaron cuatro diferentes fibras de turba en el tratamiento de agua residual sintética removiendo 96% de DBO₅, 86% de DQO y 94% de SST.

Riahi, (2009) con biofiltros empacados con fibra de palma datilera, obtuvo remoción de 80.6% de DQO, 57.7% de fosforo y 98% de HH en un tratamiento terciario de aguas residuales. Buelna et al. (2011) tratando aguas residuales sanitarias obtuvieron eficiencias promedio de 96% de DBO₅, 99% de SS y 90% de N-NTK.

Esta tecnología ha sido utilizada para remover materia orgánica y nitrógeno de las aguas residuales urbanas a través de procesos biológicos de nitrificación-desnitrificación (Galvez et al., 2003).

En cuanto a la fibra de agave es un subproducto de la industria del mezcal, considerado un residuo sólido sin uso específico actual. En México en 2007, existían más de 64 millones de plantas cultivadas de *Agave durangensis* destinadas a la producción de mezcal (SEDECO, 2008), lo que asegura la materia prima para la operación de plantas de tratamiento de aguas residuales. Este proceso produce de 20 a 30% de fibra en base húmeda. Esta fibra orgánica tiene alta área de contacto lo cual resulta adecuado para el desarrollo de la biopelícula para degradar materia orgánica contenida en aguas residuales; está disponible y no tiene costo ni necesita de pretratamiento como fresado de corteza y astillas de madera.

En la literatura investigada no se encontraron estudios efectuados con platos de separación, solo Chandravathanam y Murthy, (1999) los aplicaron en empaques no orgánicos, donde el uso solo es para redistribución del flujo de agua residual. Garzón Zúñiga et al. (2007) tuvieron problemas de taponamiento después de los primeros 50 días cuando aplicaron una carga de sólidos suspendidos superficial de $68 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$. En los biofiltros empacados con material orgánico el peso del empaque mojado o húmedo contribuye a que se compacte y se supuso que usando placas de separación este efecto podría disminuirse o eliminarse.

Por otro lado, la carga hidráulica es una variable crítica para el proceso de biofiltración ya que está influenciada por el porcentaje de espacio vacío o huecos del material filtrante y el tiempo de residencia hidráulico y se caracteriza por una muy baja velocidad de infiltración conocida como velocidad pasiva (Garzón Zúñiga et al., 2003). Con el manejo adecuado de la CHS, ha sido posible mantener una capa consistente de la biomasa, mejorando en el funcionamiento y evitando el abatimiento de los biofiltros (Metcalf y Eddy, 1991). Se usó una CHS de 0.025 y $0.10 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ para una mezcla de cascara, turba y astillas de madera como material de empaque para tratar aguas residuales domésticas (Lens et al., 1994); quienes probaron CHSs de 0.3 , 0.6 y $1.3 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ usando turba como material de empaque para tratar aguas residuales domesticas; con arena, *sílica*, vidrio, turba y material geotextíl en aguas residuales domesticas a una CHS de $0.16 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Hu y Gagnon, 2006). Esto propició que en el trabajo de investigación se decidiera probar cinco cargas hidráulicas de 0.27 , 0.54 , 0.80 , 1.07 y $1.34 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ lo cual incluye nivel bajos, medio y altos en comparación con la literatura, así mismo decidir cuál de las cargas hidráulicas es más económica y técnicamente la más adecuada para el proceso y encontrar la máxima CHS que cumple con los estándares normativos.

La función de la velocidad de aireación es proporcionar oxígeno a las bacterias aeróbicas para la degradación de la materia orgánica y completar el proceso de nitrificación y la presencia de zonas anoxicas facilita se lleve a cabo el proceso de desnitrificación en forma conjunta (Garzón-Zúñiga et al., 2007). Para probar la

hipótesis de que el aire juega un papel importante en el proceso de biofiltración, fue bombeado aire a una serie de tres biofiltros y otros tantos se probaron sin bombear aire, siendo alimentados los seis al mismo tiempo a un flujo constante de aguas residuales municipales. Los constituyentes fisicoquímicos y biológicos evaluados en aguas residuales municipales y en los efluentes de cada biofiltro fueron DBO₅, DQO, SST, CF Y HH. La hipótesis principal de este estudio fue que los biofiltros orgánicos empacados con fibra de agave producirán efluentes que cumplan con los estándares para la irrigación agrícola y de áreas verdes.

2.2 Estudios de diversidad microbiana.

Es importante mencionar que el conocimiento de la composición microbiológica de la biopelícula en los procesos de biofiltración con materiales orgánicos como soporte y de cualquier proceso biológico de tratamiento de aguas residuales es una de las claves importantes para determinar los factores que influyen en la eficiencia y la estabilidad de plantas de tratamiento de aguas residuales y desarrollar estrategias para una actuación de mejora del proceso (Vanysacker et al., 2010).

Los efluentes de aguas residuales desempeñan un papel importante como fuentes de contaminación en ambientes de agua dulce. Estas fuentes no puntuales de contaminación se distribuyen ampliamente en las zonas urbanas y agrícolas. Así la evaluación de la calidad de agua basado en el estándar es un componente esencial de programas de vigilancia para la protección de la salud humana (Marcheggiani, 2008). Asimismo, las heces del ganado y aguas residuales domésticas son uno de los principales factores que inducen a la contaminación de cuerpos receptores, mientras que la identificación de la fuente de contaminación es particularmente importante en la gestión y control de la contaminación (Feng et al., 2010).

El conocimiento de la composición de la comunidad microbiológica de los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales es una de las claves importantes para determinar los factores que influyen en la eficiencia y la estabilidad de plantas de tratamiento de aguas residuales. El conocimiento en el entorno físico de biopelículas puede utilizarse para biomejorar los procesos catabólicos por introducción de elementos genéticos móviles en una comunidad microbiana existente (Wuertz et al., 2004).

Esto permite desarrollar estrategias para mejorar el proceso y manejar los parámetros de diseño y operación, como el caso de los procesos de nitrificación-desnitrificación (Vanysacker et al., 2010).

Con el aumento del desarrollo tecnológico y la aplicación rutinaria de técnicas moleculares ha hecho posible llevar a cabo evaluaciones detalladas de la biodiversidad de las comunidades microbianas acuáticas. Estas ofrecen grandes oportunidades para investigar cómo éste parámetro responde a diversas tensiones ambientales (Dorigo et al., 2005).

Con la introducción de la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizado (DGGE) y electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) en Microbiología ambiental como herramientas moleculares permite comparar la diversidad de comunidades microbianas y evaluar la dinámica de la población. Los recientes avances en estas técnicas han demostrado su importancia en la ecología microbiana (Muyzer, 1999). La utilización de estas técnicas moleculares ha permitido conocer la formación de diversas poblaciones microbianas considerando diferentes parámetros de proceso de tratamiento de aguas residuales. Una estimación de la variabilidad de la comunidad microbiana en el proceso de lodos activados permitió observar la correlación entre determinados grupos bacterianos y la eficacia de la eliminación de sustancias químicas (Ziembinska et al., 2007).

Para el análisis de la comunidad no-espacial, en el sentido de evaluar cambios en las poblaciones microbianas en función del tiempo o las condiciones ambientales, se

basa en métodos generales de huellas, como DGGE y polimorfismo de la longitud de fragmento de restricción terminal T-RFLP, realizado sobre ácidos nucleicos extraídos de la biopelícula. Estos enfoques han sido más útiles cuando se combina con la amplificación del gen, clonación y secuenciación para montar un inventario filogenético de la especie microbiana (Wuertz et al., 2004 y Su et al., 2012).

La técnica de la DGGE es un método robusto para detección de mutación puntual que se basa en la reacción en cadena de polimerasa (PCR), siendo el principio la alteración de la temperatura de desnaturalización de un producto de la PCR con una mutación en comparación el producto nativo. La PCR realizada sobre el ADN de un individuo con una mutación puntual en uno de dos genes dará lugar a una mezcla de diferentes productos. Se formarán los productos PCR de los genes de tipo original y el gen mutado (Roelfsema et al., 2009). Estas técnicas son muy útiles en el estudio de diversidad microbiana ya que se pueden investigar organismos incultivables (Welsh y McLean, 2007).

Entre los genes que han modificado la microbiología esta el uso del gen 16S rRNA, que una molécula relativamente grande, que contiene una información considerable y su tamaño es óptimo respecto a otras moléculas. Puede aislarse en cantidades relativamente grandes, puede secuenciarse directamente y no está sujeto a la transferencia lateral de genes. Para construir árboles filogenéticos se puede partir del estudio de secuencias alineadas y se puede estudiar el número de posiciones que difieren entre sí las secuencias de pares de bases; las diferencias entre estos pares permiten confeccionar una distancia. Así mismo, se pueden establecer diferencias entre la cualidad de las secuencias, por ejemplo en qué lugares hay distintas composiciones y cual es la naturaleza de estas diferencias (<http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/2394/2.INTRODUCCION.pdf?sequence=2>). Por lo tanto, este procedimiento basado en el estudio de la secuencia genética del RNA ribosómico puede emplearse como huella digital para el estudio de microorganismos. Es la clave para el conocimiento histórico de una bacteria que permite el acceso a otros datos. Uno de los editores del Manual Bergey afirma que el

conocimiento del gen 16S rRNA actualmente es un ensayo que posee la misma profundidad taxonómica de la coloración de Gram.

Okabe et al. (2002) estudiaron la diversidad filogenética de una comunidad de bacterias nitrificantes en biopelículas de un proceso de aguas residuales domésticas y otra de nitrificantes autótrofos crecidos en un reactor de biodiscos (rotating disk reactors, RDR), donde se caracterizó, por el análisis de la clonación del 16S rRNA, para relacionar la actividad nitrificante *in situ* directamente a la aparición de poblaciones de bacterias nitrificantes (

Estudios realizados en procesos de lodos activados variando concentraciones de ácido 2,4-dicloropenoxiacético (2,4, D) a través la DGGE con fragmentos amplificados del gen 16S rRNA por la PCR, demostró ser una herramienta que permite comparar la diferencia drástica de los componentes de la comunidad microbiológica cuando estos se modifican (Lee et al., 2005).

Kundu et al. (2012) evaluaron la diversidad de la comunidad microbiana en un reactor anaerobio a diferentes temperaturas mostrando el mejor comportamiento por análisis con la PCR- DGGE utilizando amplicones del gen 16S rRNA. Mota et al. (2012) compararon los fragmentos diferenciados de dos subgrupos de bacterias reductoras de nitratos en muestras de lodos activados. Fernández et al. (2008) determinó la formación, estructura y biodiversidad de multiespecies de una biopelícula anaerobia crecida dentro de un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) alimentado con aguas residuales de una cervecería usando métodos hibridación *in situ*, la DGGE y clonación.

Shen et al. (2011) estudiaron la formación de biopelículas desarrolladas en tres reactores airlift para tratar aguas residuales con ampicilina (AMP). La DGGE y secuenciación del gen 16S rRNA se utilizaron para caracterizar la comunidad bacteriana de las biopelículas. En reactores de membrana sumergida tratando aguas residuales municipales fueron operados bajo diferentes condiciones de tiempo de retención y flujo. A través del análisis de la DGGE y secuenciación comparativa del

rRNA reveló que diversas y distintas comunidades bacterianas difieren significativamente de aquella que desarrolló en la biomasa planctónica sobre la superficie de membrana de microfiltración con filotipos de *Proteobacteria* (particularmente las subdivisiones alfa y beta) y dominando *Bacteroidetes* del gen 16S rRNA (Huang et al., 2008).

En otras aplicaciones ambientales de la PCR-DGGE, se ha aplicado para identificar la composición bacteriana y arqueas mesofílicas en un biodigestor tratando el estiércol de cerdo y comparando la consistencia de dos métodos basados en el gen 16S rRNA para investigar la estructura microbiana (Liu et al., 2009). En evaluación microbiana en biofiltros que degradan metil etil cetona (Li y Moe, 2004). En la determinación de la comunidad bacteriana de un biofiltro empacado con composta tratando aire contaminado con benceno (Borin, 2006). En análisis de la comunidad bacteriana en agua de una granja de peces (Peng, 2007). En la identificación de bacterias oxidantes del amonio en tratamiento de aguas residuales domesticas (Ebie et al., 2004). También se ha investigado en la determinación de la comunidad autóctona metanotrófica del suelo en campos arroceros (Henckel et al., 2000). En muestras de suelos y sedimentos, investigaron la estructura de la comunidad y la diversidad en estos entornos, dio información sobre los cambios en las poblaciones bacterianas numéricamente dominantes (Torsvik et al., 1998).

Para el análisis filogenético de las bacterias aisladas se han empleado varios genes (GómezVillaba et al., 2006). Estos investigadores determinaron los perfiles de la comunidad microbiana de bacterias amoníooxidantes y desnitrificantes con los genes amoníaco-monooxigenasa (*amoA*) y óxido nitroso reductasa (*nosZ*) y demostraron que estas bacterias coexistieron tanto en condiciones aireadas como en condiciones anoxicas. Ziemińska et al. (2009) utilizaron la DGGE combinada con la clonación y secuenciación de 16S rRNA y fragmentos de genes de *AmoA* para estimar la biodiversidad y cambios temporales de la comunidad de un proceso de lodos activados. Lydmark et al. (2007) examinaron el efecto de las condiciones ambientales, especialmente la concentración de amonio, sobre la composición de la

comunidad y actividad nitrificante de las bacterias en la biopelícula en una planta piloto de tratamiento de aguas residuales. La composición de la comunidad se analizó mediante sondas de hibridación *in situ* con fluorescencia de (FISH) así como el análisis parcial de genes 16S rRNA y *amoA* mediante PCR-DGGE y la secuenciación. Song et al. (2006) determinaron estructura de la comunidad microbiana en lodos anaerobios alternando las condiciones mesofílicas y termofílicas con perfiles de la PCR-DGGE.

Otro estudio evaluó el desempeño de la nitrificación y ecología microbiana de los lodos nitrificantes de dos plantas de tratamiento de aguas residuales a gran escala, una tratando aguas municipales y la segunda de efluentes de granja porcina (Whang et al., 2009). Ito et al. (2007) mediante el empleo de técnicas moleculares, incluyendo polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción terminales, evaluaron los análisis filogenéticos y las secuencias de clonación marcados con el 16S rRNA y grupo específico funcional del gen amoníaco-monooxigenasa (*amoA*) las estructuras de la comunidad microbiana del lodo nitrificante y su importancia para el rendimiento de nitrificación.

Las herramientas moleculares también se aplican en el tratamiento de aire. Yin et al. (2004) evaluaron en tres biofiltros tratando aire contaminado con amoníaco la diversidad microbiana mediante la DGGE. Una combinación de análisis de hibridación *in situ* con fluorescencia, microperfiles, DGGE de fragmentos amplificadas del gen 16S rDNA por PCR y clonación del gen 16S rRNA se aplicó para investigar el desarrollo sucesional de la estructura de la comunidad de bacterias reductoras de sulfato y la actividad de producción de sulfuro *in situ* dentro de la biopelícula creciendo bajo condiciones microaerofílicas y en presencia de nitrato (Ito et al., 2004).

Para el caso de estudios con *primers* o iniciadores en la PCR ha sido aplicado ampliamente el empleo del gen 16S RNA en la identificación de microorganismos en diferentes ámbitos de la ecología microbiana (Garveba et al., 2001; Ebie et al., 2004; Goreques et al., 2005; Liu et al., 2008; Morales-Jiménez et al., 2009). Este gen se ha

empleado para identificación de bacterias ácido lácticas contaminantes de vinos (Giusto et al., 2007); para selección específica de clones (Middleton et al., 2004), identificaciones microbiológicas de bacterias bucales (Li et al., 2006); en determinaciones bacterianas de heridas crónicas (Dowd et al., 2008); en estudios de mutaciones causadas por β -Thalassemia (Gorakshakar et al., 1999).

Estos estudios ponen de manifiesto que la DGGE es una herramienta útil para cumplir con el objetivo específico en esta sección del estudio para determinar la comunidad bacteriana de la biopelícula en tres secciones de los biofiltros empacados con fibra de agave respecto a la altura.

En cuanto a las pruebas más utilizadas de la fiabilidad de un árbol filogenético inferido es la prueba Bootstrap de Felsensteins (1985), que es evaluada usando la técnica de remuestreo de Bootstrap de Efrons (1982). Si hay m secuencias, cada una con n nucleótidos (o codones o aminoácidos), un árbol filogenético entonces se puede reconstruir mediante el método de construcción de árbol. De cada secuencia, n nucleótidos son elegidos al azar con reemplazos, dando lugar a m filas de n columnas cada una, constituyendo un nuevo conjunto de secuencias. Un árbol es reconstruido luego con estas nuevas secuencias mediante el mismo método de construcción. A continuación la topología de este árbol es comparada con la del árbol original. Cada rama interior del árbol original es diferente del árbol Bootstrap de la secuencia de particiones que da un puntaje de 0. Todas las otras ramas interiores reciben el valor 1. Se repite este procedimiento de remuestreo de los sitios y la reconstrucción posterior del árbol a varios cientos de veces, y se observa el porcentaje de veces que cada rama interior y se da un valor de 1. Esto se conoce como el valor de Bootstrap. Como regla general, si el valor de arranque para una determinada rama interior es 95 o superior, entonces la topología de dicha sucursal se considera correcta. La más reciente incorporación en MEGA5 es una colección de análisis de máxima verosimilitud (ML) para inferir árboles evolutivos, seleccionando modelos de sustitución de ajuste perfecto (nucleótidos o aminoácidos), estados de

inferencia ancestrales y secuencias (junto con probabilidades) y tasas de estimación evolutiva sitio por sitio.

2.3 Justificación

Considerando la normatividad en materia de aguas residuales (NOM-001-SEMARNAT-1996) (DOF, 1997), se menciona que a partir del 1 de enero del 2010 las comunidades mayores de 2500 habitantes deben contar con un sistema de tratamiento de aguas residuales. A nivel nacional prácticamente no se ha cumplido con estos compromisos, quizá por falta de opciones tecnológicas o visión de los encargados de resolver el problema.

En relación a esta problemática el proceso de biofiltración es una alternativa técnica, económica y sustentable que puede ser aplicada para disminuir los efectos de las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores y una forma de hacer uso eficiente del agua que puede ser aprovechada en actividades productivas para aquellos sitios donde no se cuenta con sistemas de tratamiento y que son sitios, de por sí, son insuficientes en cantidad y calidad de agua. Con la realización de este experimento se pretende contribuir al conocimiento de la aplicación de biofiltros orgánicos en la remoción de contaminantes presentes en aguas residuales municipales, en parámetros que marcan la calidad sanitaria de los efluentes y la remoción de materia suspendida que afecta el funcionamiento y eficiencia de los biofiltros, así como la tipificación de la comunidad microbiana empleando técnicas de biología molecular como parte la conformación de la biopelícula en los biofiltros orgánicos empacados con fibra de agave.

Ambientalmente se contribuirá a la reducción de la contaminación de cuerpos receptores por vertimiento de aguas residuales sin tratar y recuperar el agua tratada para otros usos productivos.

Finalmente, se desarrolló una tecnología sencilla, eficiente y de bajo costo en el tratamiento de aguas residuales municipales que compite con otras tecnologías, innovando el uso de un nuevo material no utilizado con anterioridad para el proceso de biofiltración como es la fibra de agave el cual podrá ser utilizado por el sector social bajo condiciones económicas, ya que comparado con las tecnologías mecanizadas estas son muy redituables.

El propósito inicial de conocer la presencia de los principales y/o más abundantes tipos de bacterias responsables del funcionamiento del biofiltro relacionado con la eficiencia de remoción de los parámetros ya descritos le dan soporte técnico al desarrollo del proceso de biofiltración con biofiltros empacados con fibra de agave, que dependiendo de los resultados obtenidos se puede transformar en valor agregado a este desecho industrial.

Sin embargo, ya con los resultados obtenidos resulta muy interesante describir con otro ángulo la disertación o el enfoque de dichos resultados. Así que en primer término tenemos la siguiente justificación.

El conocimiento de la comunidad microbiana en este tipo de procesos de biofiltración con biofiltros orgánicos es relevante debido a que, por un lado, no se han encontrado resultados reportados en la literatura de amplicones secuenciados con el gen 16S RNA en biopelículas adheridos en biofiltros empacados con materiales orgánicos y menos en la fibra de agave, por lo que cabe la posibilidad de ser pioneros en esta aportación científica.

Otra y posiblemente más relevante es que desde el punto de vista económico, ambiental y/o biotecnológico cabe la posibilidad de obtener cepas o material genético de alta relevancia como es el caso de los organismos celulolíticos, nitrificantes o desnitrificantes ya que tienen alta demanda en los procesos de producción de biocombustibles, en los sistemas de tratamiento de aguas residuales a escala real de grandes volúmenes, en procesos de biorremediación y/o producir material genético para degradar alguna sustancia tóxica específica o que pudiera ser susceptible al

ataque de algún organismo promotor de enfermedades que ponen en riesgo la salud de la población.

2.4 Primera hipótesis

La aplicación de biofiltros orgánicos empacados con residuos de fibra de agave de la industria mezcalera, no mejora sustancialmente la calidad del agua tratada para riego de áreas verdes y no cumple con los criterios que marca la normatividad ambiental.

2.5 Segunda hipótesis

La composición de la comunidad microbiana presente en la biopelícula desarrollada en fibra de agave que sirve de empaque de los biofiltros orgánicos y responsable de la degradación de la materia orgánica presente en aguas residuales es homogénea.

2.6 Objetivo general

Innovar una tecnología para tratamiento de aguas residuales domésticas a base de biofiltros empacados con residuos de fibras de agave proveniente de la industria del mezcal a fin producir efluentes que cumplan los estándares nacionales e internacionales para riego agrícola y de áreas verdes.

2.7 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la eficiencia de remoción de materia orgánica en biofiltros con y sin aire, entre diferentes niveles de empaque en cinco diferentes cargas hidráulicas superficiales.

- ✓ Evaluar la calidad sanitaria del efluente de los biofiltros con y sin aire, entre diferentes niveles de empaque en cinco diferentes cargas hidráulicas superficiales que cumpla con los criterios que marca la normatividad ambiental.
- ✓ Determinar y comparar la flora microbiana en tres niveles respecto de la altura del biofiltro orgánico.
- ✓

III. Materiales y métodos

3.1 Construcción e instalación de biofiltros.

Dos series de tres biofiltros (BF) cada una, a nivel laboratorio, fueron construidos con tubería de PVC hidráulico de 2.0 m de altura y 0.185 m de diámetro interno y 0.54 m³ de volumen . Fueron cerrados en los extremos con tapas del mismo material. Se dejó un vacío de 0.10 m en cada uno de los extremos para dar una columna de 1.80 m de material orgánico empleando la fibra de agave (*Agave durangensis*) como empaque. La primera serie se probó con una tasa de aireación de 0.62 m³m⁻²h⁻¹ y la segunda no recibió bombeo de aire. Esta serie la constituyen los biofiltros BF1, BF2 y BF3 con 12, 8 y 4 placas de separación. La segunda serie corresponde a los biofiltros BF4, BF5 y BF6 con 4, 8 y 12 subdivisiones cada uno. Las subdivisiones fueron placas inertes de acrílico con perforaciones de ¼ de pulgada colocadas con el objetivo de evitar la compactación del material soporte cuando se adicione el agua residual. El procedimiento de relleno de los BF se realizó de acuerdo a Garzón Zúñiga et al. (2003) con peso promedio aproximada de 10.1 kg de fibra de agave al 65% de humedad. Cada serie de biofiltros fue evaluada en un periodo de 410 días.

El aire fue suministrado a contracorriente del flujo de agua, en la parte inferior de los BFs con salida en la parte superior. El flujo del aire fue controlado diariamente con un flujómetro Dwyer™ de 0-1 SCFH. La caída de presión de cada BF aireado se midió con manómetro formado por una columna de agua con tubería de silicón en forma de “U” registrándose el desplazamiento de la columna y midiéndose en mm diariamente. En la Figura 1 se muestra un diagrama de un biofiltro aireado que es similar a los BFs sin aire, pero con la omisión de la entrada y salida de aire.

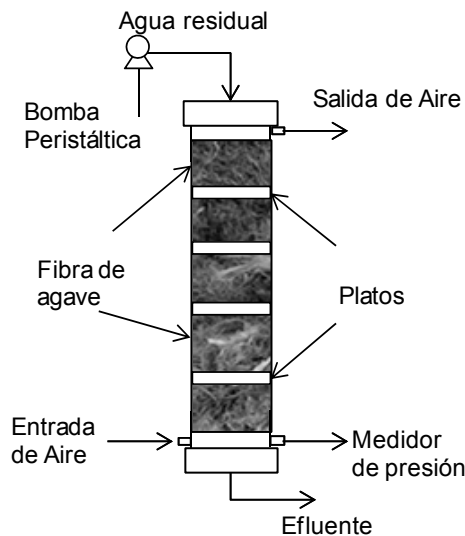


Figura 1 Representación esquemática de un biofiltro con aire.

3.2 Material de empaque.

La fibra de agave fue proporcionada por la Unión Ejidal Productora de Mezcal de Nombre de Dios, Dgo. Es un residuo sólido que se produce después del proceso de desgarrado y compresión de las piñas cocidas de agave con un contenido de humedad de 80% aproximadamente. Este material es secado al sol, tamizado en malla 100 para eliminar los polvos finos y suelo que se arrastra durante el manejo del

material hasta su uso final. El llenado de los biofiltros y tratamiento de la fibra se hizo de acuerdo a Garzón Zúñiga et al. (2003).

3.3 Agua residual municipal.

El origen del agua residual municipal fue de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Durango, México (PTAR), ubicada a 9 km del Laboratorio, cuyas muestras fueron tomadas en garrafones de 40 L después del tratamiento primario (cribado, desarenado, sedimentación y homogenización). El agua residual se alimentó a cada biofiltro con bombas peristálticas MasterFlex con tubería de silicón. Se registro diariamente el flujo y haciendo las correcciones en su momento para mantenerlo constante. Se probaron los BFs con cinco cargas hidráulicas superficiales (CHS) de 0.27, 0.54, 0.80, 1.07 y 1.34 m³ de agua residual m⁻²d⁻¹ con flujo de agua residual constante de 5, 10, 15, 20 y 25 mL min⁻¹. Un periodo de adaptación de los microorganismos de tres meses fue corrido con un flujo de 3 mL min⁻¹ de agua residual en todos los BFs. El objetivo de probar las cinco CHS fue determinar cuál era la más eficiente en la remoción de contaminantes con la innovación de la fibra de agave como material de empaque. El agua residual cruda fue almacenada en un tanque de 400 L el cual se mantuvo aislado de la temperatura ambiental, herméticamente tapado para evitar una oxigenación pasiva.

3.4 Caracterización fisicoquímica y biológica del agua residual municipal y los efluentes de los BFs.

El agua residual municipal y los efluentes de los BFs fueron caracterizadas midiendo el contenido de materia orgánica con las técnicas de demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) a través del método modificado de Winkler y la demanda química de oxígeno (DQO) por el método de digestión de reflujo cerrado. La calidad sanitaria se midió a través de la concentración de coliformes fecales (CF) por el método del

NMP/100 mL y la determinación de huevos de helminto (HH) por flotación con Sulfato de Zinc. Se complementó con el análisis de sólidos suspendidos totales (SST) por método gravimétrico de peso seco, ambos de acuerdo a la APHA et al. (1995); a excepción de los HH que se realizó de acuerdo a la NOM-003-SEMARNAT-1997 (DOF 1998). El pH y la conductividad eléctrica (CE) se midieron diariamente por método electrométrico. La temperatura (T) del agua de entrada a los biofiltros se midió diariamente con termómetro de vidrio Brannan con rango de -5 a 120°C. En el efluente de cada BF se determinaron estas técnicas cada semana a excepción de HH que se analizaron cada 15 días.

3.5 Proceso de identificación de los microorganismos.

3. 5.1 Muestreo del material soporte de la biopelícula y conservación de muestras.

Las muestras de la fibra de agave, donde se desarrollo la biopelícula, fueron tomadas por duplicado en tres secciones del biofiltro a 0.35, 0.85 y 1.35 m a lo largo de la columna midiendo del fondo hacia arriba de los Bfs. El muestreo se realizó en condiciones asépticas con el apoyo de mecheros Bunsen. El material retirado con pinzas largas flameadas, fueron colocadas en tubos Eppendorf Falcon estériles de 50 mL, se mantuvieron en refrigeración y fueron transportadas en hielera hasta el laboratorio donde fueron almacenados en refrigeración. El muestreo se realizó a una carga hidráulica superficial de $1.34 \text{ m}^3 \text{ agua residual m}^{-2}\text{d}^{-1}$.

3. 5.2 Crecimiento de la población microbiana en medios de cultivo específicos.

Para la identificación de componentes de la comunidad bacteriana en los BFs se determinó por dos métodos: el primero a través de técnicas microbiológicas tradicionales que consiste en crecimiento, aislamiento y purificación de colonias obtenidas a través de la cuenta total y cuenta de morfotipos que se desarrollaron en cinco medios de cultivo diferenciales (Figura 4) tomando en cuenta las diluciones se sembraron por duplicado en 1) agar con tioglicolato para aislamiento de microorganismos anaerobios, 2) rojo Congo con celulosa para cuantificación de microorganismos celulolíticos, 3) medio mínimo basal con NH_4^+ como fuente de nitrógeno para aislamiento de microorganismos desnitrificantes, 4) medio mínimo con NO_3^- como fuente de nitrógeno para identificación de organismos nitrificantes y con 5) agar nutritivo para cuenta total de colonias aerobias.

Se tomó una muestra de aproximadamente 250 mg de la fibra de agave y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionó 250 μL de agua estéril, se agitó vigorosamente en un disgregador tipo Vortex durante 10 min. Se centrifugó (Centrifuga Sorval fresco, Thermo Electron Co, con refrigeración) 5 min a 13 000 rpm y finalmente se transfirió el sobrenadante a un tubo de 0.5 mL. Se hicieron las diluciones para cada experimento, para realizar la siembra en cajas de Petri de cada dilución seleccionada por duplicado. Se incubaron a la temperatura y tiempo establecido para cada método.

El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se contaron los morfotipos coloniales que crecieron, en cada uno de los medios seleccionados y se describieron de acuerdo al tamaño, color, elevación, forma, elevación, superficie, aspecto, borde, luz transmitida, luz reflejada, consistencia y pigmento difusible. Finalmente se tiñeron de Gram para describir la morfología microscópica (forma tamaño relativo o aproximado, Gram y presencia, posición relativa y forma de esporas). Tres ejemplares de cada morfotipo se seleccionaron, resembraron para verificar la pureza y se conservaron en glicerol al 20% a -70°C

3. 5.3 Extracción y comprobación del ADN con electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Con las cepas puras se realizó la extracción del ADN (anexo 1) con la técnica descrita por Hoffman y Winston (1987) que se basa en extracciones con solventes orgánicos, en este caso con la mezcla fenol/cloroformo. Se comprobó la extracción de ADN con electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se reveló el gel con bromuro de etidio y se observa en un transiluminador con luz ultravioleta (Transiluminador UV, Eagle Eye, Stratagene) obteniendo imágenes que se guardaron en la computadora para su análisis y resguardo de la información.

3. 5.4 Amplificación y purificación del ADN con la PCR

Con las muestras positivas de ADN se llevó a cabo la amplificación del gen 16S rRNA por PCR y se realizó utilizando dos iniciadores universales (primers): Adelante 8 (NVZ-1) (5'-GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') y reverso 1,492 (5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Relman, 1993) que amplifican un fragmento aproximado de 1484 pb del gen. Este proceso se llevó a cabo en un termociclador. Las condiciones de reacción se muestran en la Tabla 1 y las condiciones operativas de la PCR se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1 Composición de la mezcla de reacción para amplificar el ácido desoxirribonucleico en la reacción en cadena de la polimerasa en muestras de morfotipos.

Componente	Concentración (µL)
Agua estéril de alta pureza	Variable*
Regulador	2.5

MgCl ₂	2
DNTPs	2
Nvz-1	1
Nvz-2	1
Taq	0.15
Muestra de ADN	2

* Sirve para aforar a 25 µL y depende de la cantidad de muestra y/o del MgCl₂.

Tabla 2 Condiciones operacionales del termociclador durante la reacción en cadena de la polimerasa.

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	7	1
Desnaturalización	94	1	35
Alineamiento	60	1	35
Extensión	72	2.5	35
Extensión final	72	1	1

Después de la amplificación en la PCR, se verificó nuevamente por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se purificó el kit comercial QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA). Finalmente se realizó la secuenciación. Las muestras de cada amplicon se resguardaron en glicerol al 25% a -70°C.

La identificación de los microorganismos se realizó por similitud y aproximación filogenética y se construyeron árboles filogenéticos que permiten apreciar la ubicación de las cepas problema en el contexto de las especies actualmente reconocidas. Estas filogenias se determinaron en primera instancia con ayuda del programa BLAST para reconocer las especies emparentadas, accediendo a la base de datos de secuencias de GeneBank y seleccionando las especies en la base de

datos de TaxBrowser del NCBI. Los alineamientos se realizaron en el programa SeaView (Gouy et al., 2010) utilizando el algoritmo CLUSTAL X o Muscle. Las reconstrucciones filogenéticas basadas en el método de distancia se realizaron con ayuda del programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA 5.05) y el soporte estadístico de las ramas se ensayó con la técnica de remuestreo tipo Bootstrap (Felsenstein, 1985; Efrons, 1982).

3.6 Extracción de ADN metagenómico para la prueba de DGGE.

El segundo método de identificación de la comunidad microbiana a través de la secuenciación del ADN fue a través de la técnica de la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizado (DGGE), que tiene la capacidad de diferenciar fragmentos de ADN amplificado con al menos un nucleótido diferente (Roelfsema y Peters, 2008) y que en ecología microbiana se utiliza para reconocer tanto a bacterias cultivables como no cultivables..

Se hicieron extracciones de ADN de 21 muestras que corresponden a 18 sitios de muestreo de los biofiltros con aire y sin aire, incluyendo una muestra del agua residual municipal y dos muestras del efluente de cada serie de BFs. El ADN metagenómico fue extraído directamente de las muestras presentes en la fibra de agave con la técnica de extracción de ADN descrita por Hoffman y Winston (1987). Después de la extracción se confirma la presencia del ADN con una prueba de electroforesis en gel con agarosa al 1.5%.

3.7 Reacción en cadena de la polimerasa y los fragmentos del gen 16S RNA para DGGE.

Los iniciadores (primers) P3 (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG GGC AGCAG-3') y P2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') fueron usados para amplificar la región 3V del 16S rRNA bacteriano (Muyzer et al., 1993) y el tamaño aproximado esperado es de 230 pb. La mezcla de reacción de la PCR se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Composición de la mezcla de reacción de la reacción en cadena de la polimerasa en la prueba de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizado.

Componente	Concentración (μL)
Agua estéril de alta pureza	Variable*
Regulador para PCR	2.5
MgCl ₂	2
DNTPs	2
Primer P3	1
Primer P2	1
Taq	0.15
Muestra de ADN	2

* Sirve para aforar a 25 μL y depende de la cantidad de la muestra y/o del MgCl₂

La *Taq* DNA polimerasa fue de la compañía Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brazil.

La reacción de PCR se llevó a cabo con las condiciones que se muestran en la Tabla 4. El tamaño esperado del amplificado es de 240 pb.

Tabla 4 Condiciones de operación de la reacción en cadena de la polimerasa en la prueba de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizado.

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	7	1
Desnaturalización	94	1	35
Alineamiento	55	1	35
Extensión	72	2.5	35
Extensión final	72	10	1

3.8 Desarrollo de la prueba de la DGGE.

Las 21 muestras de ADN purificado se corrieron con protocolo de la técnica de DGGE descrito por Muyzer et al. (1993), en un —DCode Mutation Detection SystemII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La prueba se realizó en el Laboratorio de Ecológica Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Xochimilco, en la ciudad de México D.F.

Los geles de acrilamida al 8% (37:1 acrilamida–bisacrilamida) se formaron con un gradiente desnaturizante lineal del 20% al 80%; una solución 100% desnaturizante a una concentración 7 M de urea y 40% (v/v) de formamida.

Los geles se corrieron a 85 V durante 16 h a 60°C en amortiguador TAE 1× (40 mM Tris, 20 mM de acetato, 1 mM EDTA).

Las bandas de ADN se visualizaron empleando una técnica de tinción con plata descrita por Sanguinetti et al. (1994).

Las bandas se recortaron del DGGE y se colocaron en tubos Eppendorf de 500 µL y se solubilizaron en 30 µL de agua de calidad molecular. Del sobrenadante se reamplificaron los ADNs como se describió anteriormente.

3.9 Identificación de las cepas de microorganismos secuenciadas y análisis filogenético.

Las muestras purificadas de ADN de las bandas de la DGGE fueron secuenciadas en el Instituto de Biología de la UNAM. Su procesamiento de alineamiento fue analizado a través de herramientas de bioinformática

Las secuencias del gen 16S rRNA de los aislados bacterianos se compararon con bibliotecas taxonómicas del GenBank mediante una búsqueda en Basic Local Alignment Search Tool tipo BLAST (Altschul et al., 1997). Una colección de secuencias taxonómicas se obtuvieron de la página del Taxonomy Browser de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el software CLUSTAL X 2.0.12 (Thompson et al., 1997) y se editaron manualmente con el software BIOEDIT (Bio Edit Secuences Alignment Editor) (Hall, 1999).

La clave de la cepa que se diseñó para identificar a los microorganismos resultantes de la prueba de la DGGE es de la siguiente forma: como ejemplo pondremos dos clave de igual número de muestras (1S2 y 4M7). El primer número corresponde al biofiltro, en este caso el 1 corresponde al biofiltro número 1 que funciona con aire (BF1) y el siguiente sería el biofiltro 4 (BF4) que funcionó sin aire. La letra inmediata corresponde a la posición de la muestra respecto a la altura de la columna, en este caso S será para la parte superior de la columna, M medio y B bajo, respectivamente. El último número será para la posición de la banda que fue recortada de arriba hacia abajo del gel de acrilamida, en este caso 1 será la banda del BF1 y 7 la banda del BF4, respectivamente.

3.10 Diseño experimental.

Los efectos a probar fueron Aireación (2: con aire y sin aire); número de platos de separación 3: 4, 8 y 12 platos y cinco CHSs (5: 0.27, 0.54, 0.80, 1.07 and 1.34 m³ m⁻² d⁻¹) aplicando un diseño de bloques subdivididos en un experimento factorial con una covariable en la temperatura del agua a la entrada de cada BF. Las observaciones se describen por el modelo estadístico lineal

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha_i * \beta_j + \alpha_i * \gamma_k + \beta_j * \gamma_k + \alpha_i * \beta_j * \gamma_k + \delta T_{ijk} \pm \varepsilon_{ijkl}$$

donde Y_{ijkl} es la i ésima observación en la variable de respuesta tomada bajo ijk ésimo tratamiento de los factores α_i , γ_j , y β_k ; μ es el efecto de la media tota; α_i es el efecto del i ésimo nivel del factor aire; β_j es el efecto de la j ésimo nivel del factor places de separación; γ_k es el efecto de la k ésimo nivel del factor CHS; $\alpha_i * \beta_j$, $\alpha_i * \gamma_k$, y $\beta_j * \gamma_k$ son la doble interacción entre los factores; $\alpha_i * \beta_k * \gamma_j$ es el efecto de la triple interacción entre factores; T es el valor de la covariable (temperatura) obtenido en el k -ésimo tratamiento ubicado i -ésimo bloque; δ es un coeficiente de la covarianza en la regresión lineal que indica la dependencia de Y_{ijkl} en T_{ijk} . y ε_{ijkl} es el error aleatorio. El método estadístico y sus fuentes de variación fueron evaluados con el software Statistica V. 7.0.

Las hipótesis a probar son:

1. $H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \dots \alpha_i$ contra la H_a : al menos un nivel del Factor α produce un efecto diferente al de los demás.
2. $H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots \beta_t$ contra H_a : al menos un nivel del Factor β produce un efecto diferente al de los demás.

3. $H_0: \gamma_1 = \gamma_2 = \dots \gamma_t$ contra H_a : al menos un nivel del Factor γ produce un efecto diferente al de los demás.
4. $H_0: \alpha\beta = 0$. $H_a: \alpha\beta \neq 0$
5. $H_0: \alpha\gamma = 0$ $H_a: \alpha\gamma \neq 0$
6. $H_0: \beta\alpha = 0$ $H_a: \beta\alpha \neq 0$
7. $H_0: \alpha\beta\gamma = 0$ $H_a: \alpha\beta\gamma \neq 0$
8. $H_0: \delta = 0$ la covariable no influye en la variable de respuesta.

IV. Resultados y Discusión

4.1 Composición del agua residual municipal.

La composición promedio de los constituyentes fisicoquímicos y biológicos del agua residual municipal empleada para la investigación se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5 Composición del agua residual.

Parámetro	Unidades	Concentración $\pm$ IC	Número de muestras
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	269 ± 7.08	100
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	643 ± 33	106
Coliformes fecales	NMP/100 mL	$7.57e06 \pm 1.71e06$	88
Huevo de helmintos	No. HH/L	9 ± 1	26
Sólidos suspendidos totales	mg/L	250 ± 20.7	84
pH		7.12 ± 0.05	109
Conductividad eléctrica	μ S/cm	792 ± 29	54

IC = Intervalo de confianza ($\alpha=0.05$)

Los constituyentes de la materia orgánica expresada como DBO₅ y DQO; CF y SST, son similares a las sugeridas por Metcalf y Eddy (1991) y estas características pertenecen a un agua residual clasificada como de concentración media. Las muestras de agua fueron tomadas durante el periodo del primer pico de concentración másica en la PTAR, de ahí la concentración alta de materia orgánica.

La relación DQO/DBO₅ tiene un valor de 2.3 y de igual manera es la reportada por Metcalf y Eddy (1991). Sin embargo el contenido de SST es ligeramente más bajo y esto probablemente se deba a que el tratamiento primario la remoción de arenas y material sedimentable sea bien manejado en la PTAR.

En la Tabla 6, se muestran el resultado de las CHS, carga orgánica superficial (COS) y la carga superficial de sólidos suspendidos (CSS) en relación al flujo agua que permitió el cálculo de cada uno de estos componentes. Estos parámetros son muy importantes en el control de los biofiltros empacados con material orgánico, ya que afectan la hidrodinámica del sistema (Garzón et al. 2005) y sirven para proyectar el diseño de instalaciones a niveles mayores dirigidas directamente a campo.

Tabla 6 Parámetros de control de biofiltros.

Parámetro	Caudal (mL min ⁻¹)				
	5	10	15	20	25
Carga Orgánica Superficial (kg DBO ₅ m ⁻² d ⁻¹)	0,07	0,16	0,26	0,30	0,46
Carga Orgánica Superficial (kg DQO m ⁻² d ⁻¹)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,09
Carga de Sólidos Suspendidos (kg SST m ⁻² d ⁻¹)	0,05	0,09	0,20	0,21	0,25
Carga Hidráulica Superficial (m ³ agua residual m ⁻² d ⁻¹)	0,27	0,54	0,80	1,07	1,34

4.2 Remoción de materia orgánica.

4.2.1. Remoción de la DBO₅.

El comportamiento de la remoción de la DBO₅ durante el periodo del estudio se muestra en las Figuras 2 para los BFs con aire. Durante el periodo de estudio del proceso, se pudo establecer la carga hidráulica superficial máxima que cumple con

los estándares nacionales (DOF, 1998) e internacionales que establece la USA-EPA, (2004) para algunos estados de la unión americana. En esta Figura 5 se observa que a $0.80 \text{ m}^3 \text{ agua residual m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ cumplen con los 30 mg L^{-1} de DBO_5 que establece la NOM.

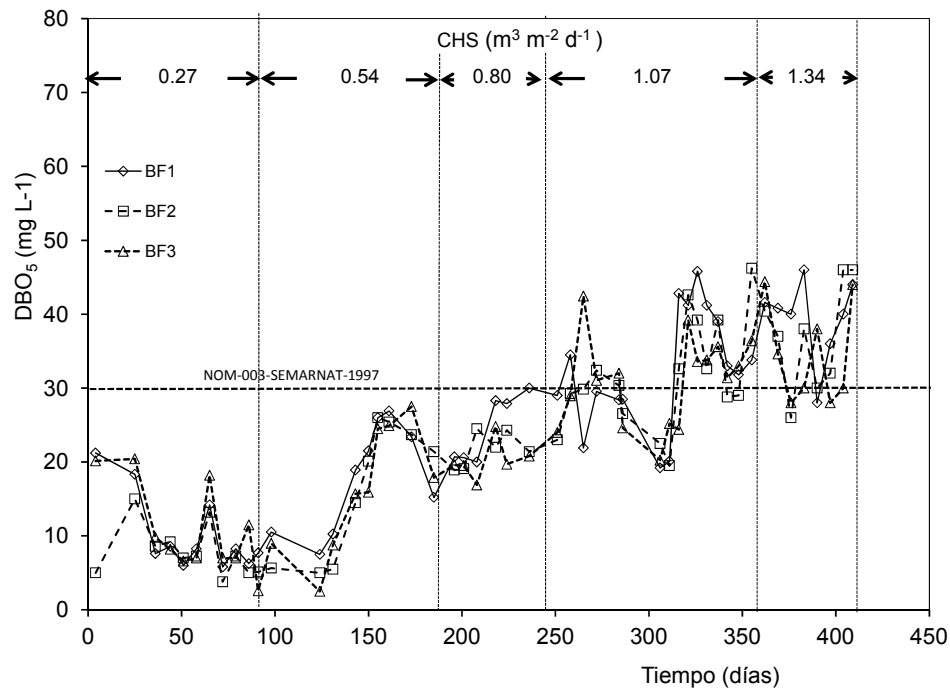


Figura 2 Remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en los biofiltros con aire.

En la Figura 3 se muestra el comportamiento de los biofiltros que funcionaron sin aire en la remoción de la DBO_5 . En este caso, la eficiencia de remoción para cumplir con los estándares nacionales e internacionales solo se logró para las CHS de 0.54 y $0.80 \text{ m}^3 \text{ agua residual m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ respectivamente. Existe la posibilidad de que la diferencia de eficiencia de los biofiltros sin con respecto a los BFs con aire con respecto a la remoción de la DBO_5 , sea que requiera mayor tiempo de acondicionamiento ya que después de tres meses de acondicionamiento se inició el registro de los datos para hacer las evaluaciones del proceso, como es el caso que reportaron Garzón-Zúñiga et al. (2008), que requirió 90 días de acondicionamiento

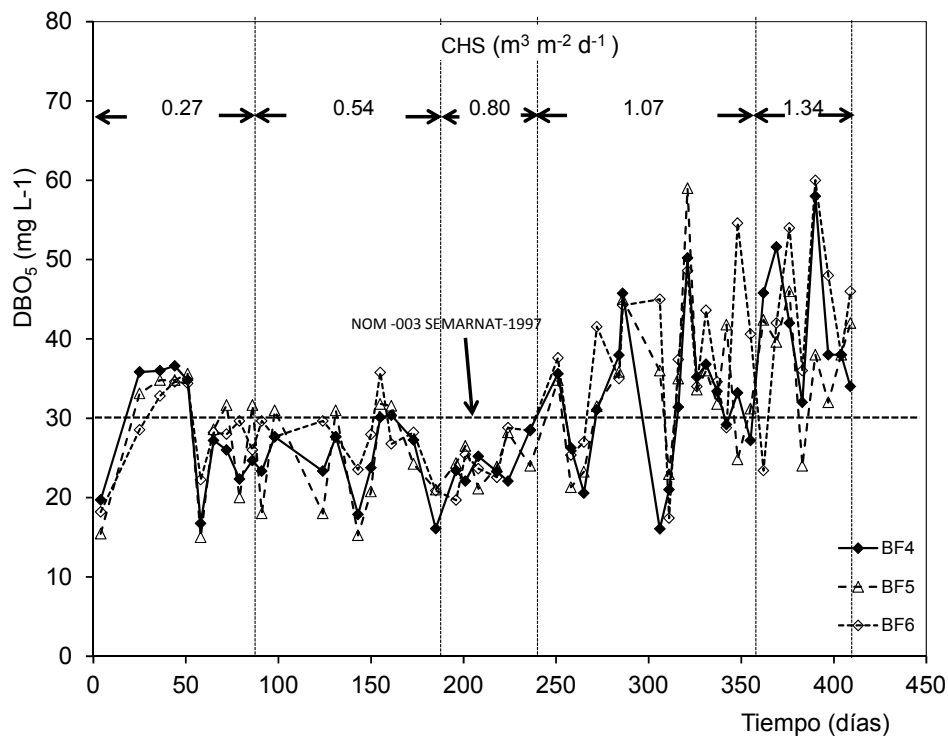


Figura 3 Remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en los biofiltros sin aire.

4.2.2. Remoción de DQO.

El comportamiento de la remoción de la DQO en los biofiltros con aire se muestra en la Figura 4. Este parámetro no está normado por ninguna agencia, sin embargo es muy importante identificarlo ya que cuando se encuentra en altas concentraciones es un indicio que el sistema de recolección de aguas residuales está recibiendo aguas de origen industrial, y los operadores y/o supervisores de la operación de la planta tomarán la decisión de hacer inspección sobre las descargas industriales.

Aún y cuando no está normado el parámetro de la DQO, existe literatura lo reporta, como medida de comparación en cuanto eficiencia de remoción de materia orgánica en el tratamiento de aguas residuales, sobre todo en proceso fisicoquímicos (Yunusov, 2011)

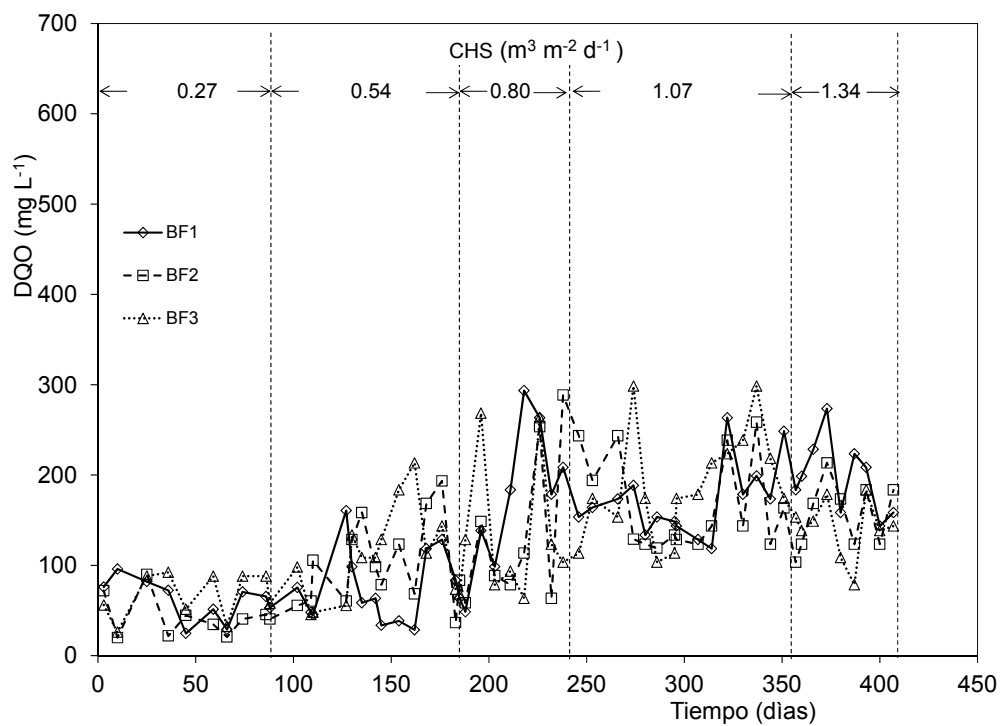


Figura 4 Remoción de la demanda química de oxígeno en los biofiltros con aire.

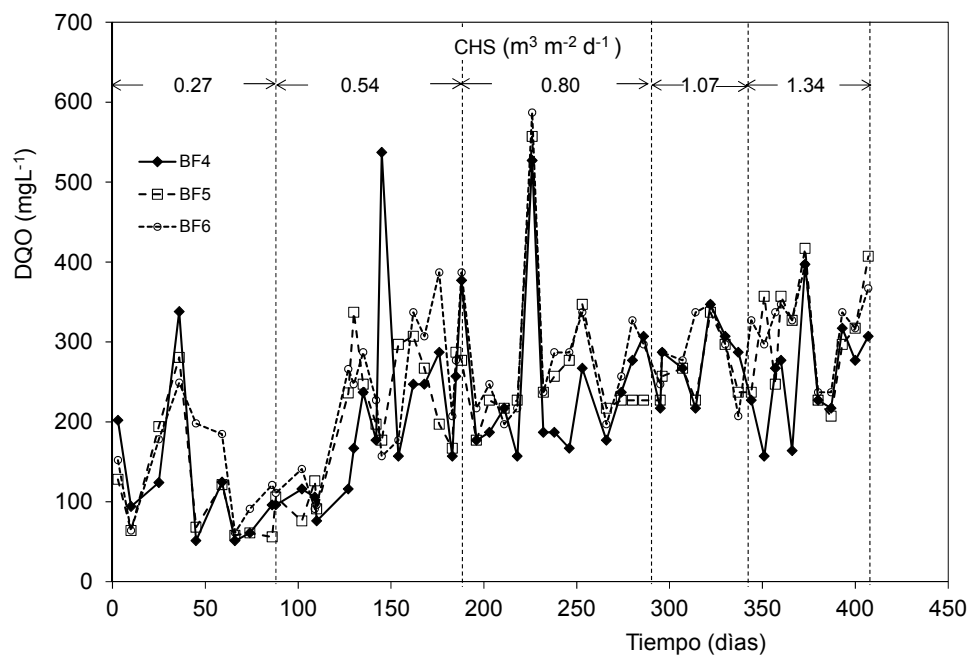


Figura 5 Remoción de la demanda química de oxígeno en los biofiltros sin aire.

4.2.3. Resultados del análisis de covarianza.

Para hacer la evaluación estadística del estudio sobre las variables dependientes DBO₅, DQO, CF y SST se utilizó el análisis de covarianza (ANCOVA) donde los efectos a evaluar fueron aire, empaque y carga hidráulica superficial estableciendo la temperatura del agua de entrada a los biofiltros como covariable, haciendo el análisis con el software Statistica V 7. En la Tabla 5 se resumieron todos los efectos y las tres interacciones dobles y la interacción triple.

Tabla 5 Resultados de análisis de covarianza de cada uno de los parámetros de evaluación de los biofiltros empacados con fibra de agave

EFECTOS	p			
	DBO ₅	DQO	CF	SST
Intercepto	0.000000	0.000000	0.940533	0.026419
Temperatura	0.606378	0.005208	0.049154	0.182976
Aire	0.000000	0.000000	0.000000	0.768951
Empaque	0.029426	0.000027	0.398867	0.849359
Carga Hidráulica (CH)	0.000000	0.000000	0.000000	0.035388
Aire*Empaque	0.482549	0.361467	0.716268	0.082669
Aire*CH	0.000000	0.000059	0.000221	0.289097
Empaque*CH	0.859457	0.048228	0.406499	0.601669
Aire*Empaque*CH	0.569055	0.552125	0.887584	0.819095

4.3 Efecto aire.

4.3.1. Efecto aire sobre la remoción de materia orgánica.

El factor aire fue estadísticamente significativo en DBO₅, DQO y CF con una p=0.001 para cada uno de los parámetros, excepto para SST.

Los BFs con aire removieron mejor la DBO_5 ya que producen efluentes con una concentración promedio de $22.0 \pm 2.3 \text{ mg L}^{-1}$ ($\alpha=0.05$) y los BFs sin aire produjeron efluentes con $24.0 \pm 1.9 \text{ mg L}^{-1}$, ambos para una CHS de $0.8 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ cumpliendo con los criterios de descarga establecidos por la USA-EPA, 2004 y la norma NOM-003-SEMARNAT-1997 (DOF, 1998), donde el valor máximo permitido es de 30 mg L^{-1} de DBO_5 y el reuso de los efluentes satisface los criterios para riego agrícola y áreas verdes. Para CHS por encima de 0.80 m^3 agua residual $\text{m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ produce efluentes que exceden el límite establecido que requiere los objetivo de este trabajo

La eficiencia de remoción promedio de DBO_5 a esa CHS fue de 92.0% para los biofiltros aireados y 90.9% de eficiencia para los biofiltros no aireados.

Para la DQO no hay estándares normados y las concentraciones promedio y eficiencia de remoción para una CHS de $0.8 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ L}^{-1}$ fueron $128 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$ (79.7%) y $240 \pm 34 \text{ mg L}^{-1}$ (62%) para BFs con aire y BFs sin aire, respectivamente.

Las eficiencias registradas de la DBO_5 y DQO son más bajas que las encontradas por Buelna y Bélanger (1991) quienes emplearon cuatro fibras de turba obteniendo 96 y 87% de DBO_5 y DQO, respectivamente. La diferencia de eficiencia está influida por que las concentraciones de su agua residual partieron de 77 mg L^{-1} de DBO_5 y en este estudio la concentración fue 3.5 veces mayor. Lens et al. (1994) emplearon corteza y turba y obtuvieron 97% de DBO_5 y 63% de DQO de remoción partiendo de una concentración de 168 y 252 mg L^{-1} de DBO_5 y DQO, aquí la diferencia de concentración de estos parámetros fue 1.6 veces para la DBO_5 y 2.6 veces para DQO. Garzón Zuñiga et al., (2008) emplearon mezclas de astillas de maderas de árboles tropicales y fibras naturales y obtuvieron 98.5% de DBO_5 en una zona tropical. Los resultados son superiores a los encontrados por Yoon, et al. (2008) quienes obtuvieron 88.5% de DBO_5 empleando material no orgánico, en este caso la melamína como soporte de biopelícula.

En las Figura 6 se observa el comportamiento del efecto aire sobre la eficiencia de remoción de la DBO_5 para las dos series de biofiltros.

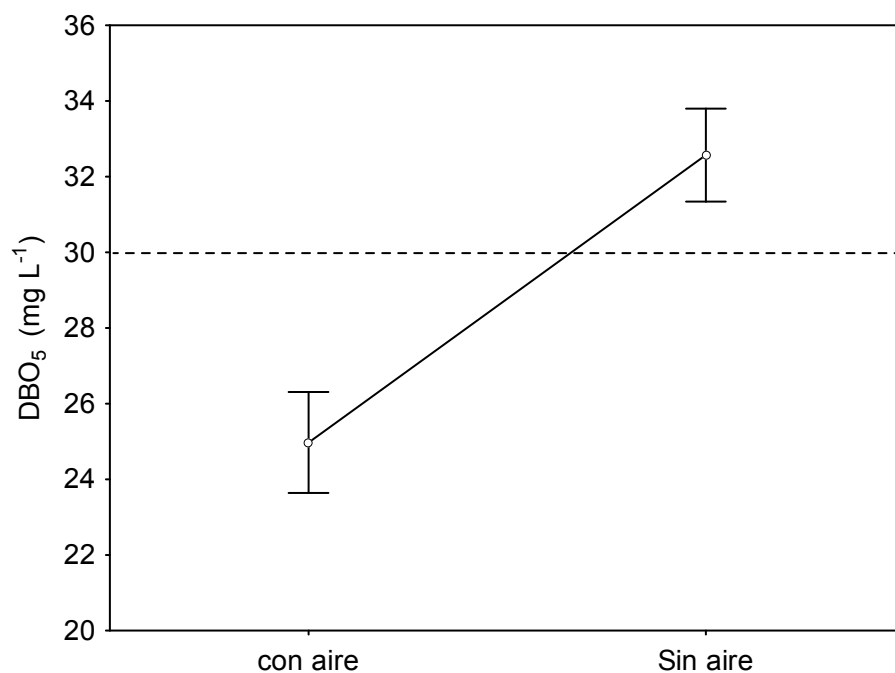


Figura 6 Efecto aire sobre la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en las dos series de biofiltros.

Esta Figura muestra claramente las diferencias que existe entre las dos series de biofiltros resaltando los biofiltros aireados que cumplen con los estándares nacionales (DOF, 1998) e internacionales (USA-EPA, 2004).

En la Figura 7 se muestra el efecto aire sobre remoción de la DQO en las dos series de biofiltros. Al igual que la anterior los biofiltros con aire son más eficientes en la remoción de la materia orgánica expresada como DQO y como ya se mencionó la normatividad ambiental en México no está normada.

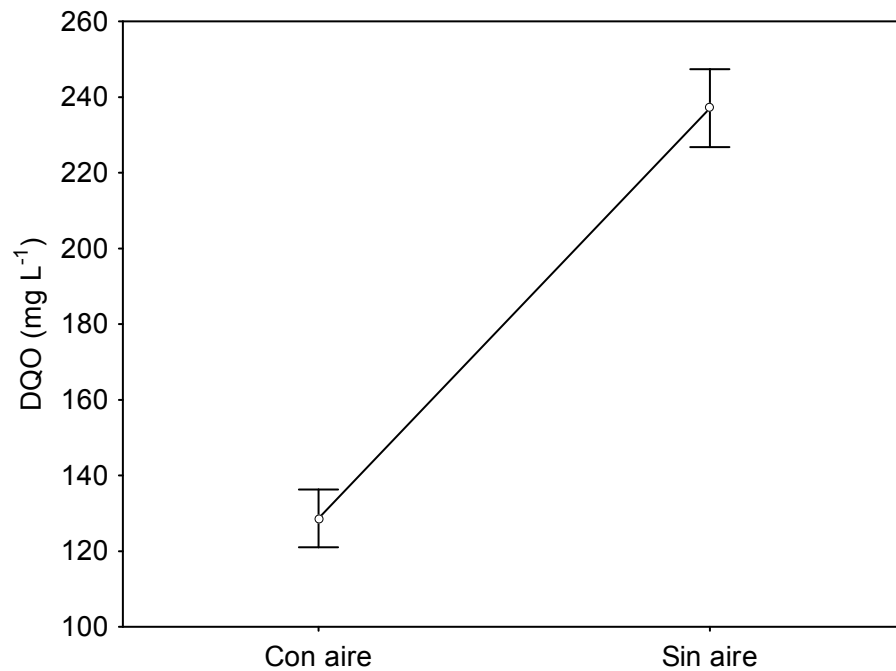


Figura 7 Efecto aire sobre la remoción de la demanda química de oxígeno en los biofiltros.

En la Tabla 6 se muestran el análisis de medias donde se demuestra que existen diferencias significativas entre los biofiltros con aire y sin aire, donde el **1** significa los biofiltros con aire y **2** los biofiltros sin aire

Tabla 6 Análisis de medias del efecto aire sobre la DBO5 en las series de biofiltros.

Prueba LSD ; variable DBO ₅ (DATOS DBO) Grupos Homogéneos, $\alpha = .05000$ Error: entre medias MS = 48.276, gl = 569.00				
	Aire	DBO ₅	1	2
1	1	23.92201	****	
2	2	32.00347		****

En cuanto a la interacción aire*CHS tuvo efecto significativa sobre la DBO₅, DQO y CF (P=0.001)

4.3.2. Efecto aire sobre la remoción de coliformes fecales.

En la Figura 8 se observa el comportamiento de los biofiltros con aire durante el estudio, donde se muestra que este parámetro alcanza una eficiencia de 99.99% que equivale a 4 unidades logarítmicas y que son suficientes para alcanzar los estándares nacionales (DOF, 1998) e internacionales (USA-EPA, 2004, para algunos estados de la unión americana, a la carga hidráulica más baja probada que fue de $0.27 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Esta eficiencia esta por arriba de la reportada por Buelna y Bélanger, 1991, quienes obtuvieron dos unidades logarítmicas menos (99%) a una carga hidráulica superficial de $0.30 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en biofiltros empacados con turba.

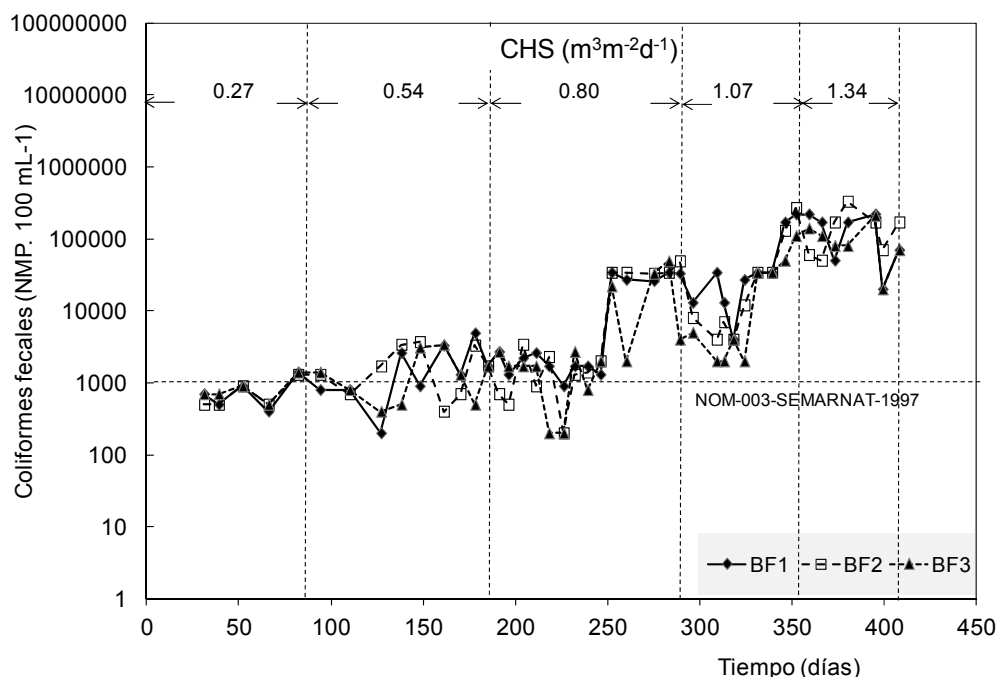


Figura 8 Remoción de coliformes fecales durante el periodo de estudio de los biofiltros aireados.

En la Figura 9 se muestra la remoción de los coliformes fecales de los biofiltros sin aire durante el periodo de estudio.

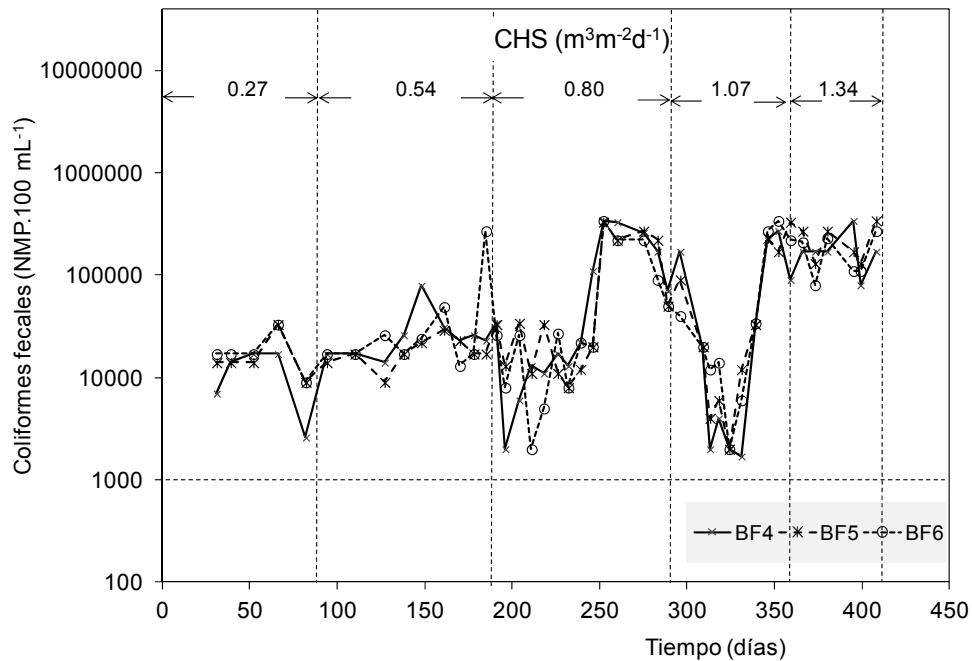


Figura 9 Remoción de coliformes fecales durante el periodo de estudio de los biofiltros sin aire.

En esta serie de biofiltros sin aire no fue efectiva la remoción de coliformes fecales para alcanzar los 1000 NMP.100 mL⁻¹ que marca la NOM-003-SEMARNAT-1997, ya que obtuvieron una eficiencia de remoción de 99.9% con la CHD más baja de 0.27 m³ m⁻² d⁻¹.

Sin embargo con 0.80 m³ m⁻² d⁻¹ de CHS se obtuvo una eficiencia de 99.95% (3 unidades log) en los BF con aire y 99.56% (2 unidades log) con los BF sin aire, respectivamente.

La eficiencia encontrada es similar a la obtenida por Garzón Zúñiga et al. (2008) con 99.9% de remoción de CF a una CHS de $0.3 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ empleando astillas de madera y fibras naturales.

En la Figura 10 se observa el efecto aire sobre la remoción de los coliformes fecales durante la fase experimental.

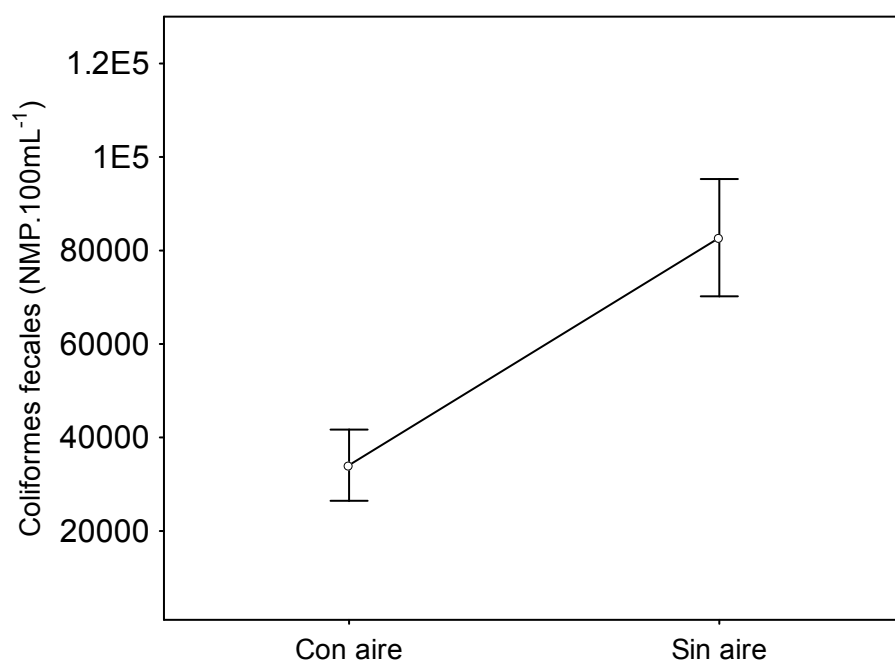


Figura 10 Efecto aire sobre la eficiencia de remoción de coliformes fecales en las dos series de biofiltros.

En ésta se aprecia la diferencia significativa en la remoción de los coliformes fecales por el efecto aire en las series de BF's, donde los biofiltros con aire son más eficientes que los BF's sin aire, pero ninguno alcanza el valor que marcan las estándares, por lo que los efluentes tendrán que tener un tratamiento de desinfección antes de reutilizarlos par riego agrícola.

En la Tabla 7 se muestran que el efecto aire en la remoción de los coliformes fecales es estadísticamente significativo ya hay diferencias entre los biofiltros con aire (1) y los biofiltros sin aire (2) y el mejor entre ellos son los biofiltro con aire.

Tabla 7 Prueba de medias del efecto aire sobre la remoción de coliformes fecales en las dos series de biofiltros

Prueba LSD; variable CF (DATOS CF), $\alpha = 0.05000$				
Error: entre medias MS = 4546E6, gl = 497.00				
	Aire	Coliformes fecales	1	2
1	1	34102.34	****	
2	2	82726.25		****
1 biofiltros con aire			2 biofiltros sin aire	

4.3.3. Remoción de huevos de helminto.

La eficiencia de remoción de huevos de helminto fue de 98% para los BFs con aire y 100% para los BFs sin aire. Con estos valores se cumple con los criterios de la NOM-003- SEMARNAT-1998. Las dos series de BFs son eficientes en hasta la más alta CHS de $1.34 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y $0.46 \text{ kg DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de carga orgánica superficial (COS). Estos resultados son bastante similares a los reportados por Riahi (2009), quien obtuvo una eficiencia de remoción de 98% para HH usando fibra de palma datilera en un tratamiento terciario de aguas tratadas con BFs de 0.55 m de alto y 0.10 m de diámetro. Garzón Zúñiga et al. (2008) obtuvieron 96.93% de HE con biofiltros aerobios de una agua residual doméstica. El límite máximo permitido es de <1 HH L-1 por la NOM-003-SEMARNAT-1997.

4.3.4. Efecto aire en la remoción de SST.

La remoción de los SST durante el estudio se muestra en la Figura 11 para los biofiltros aireados.

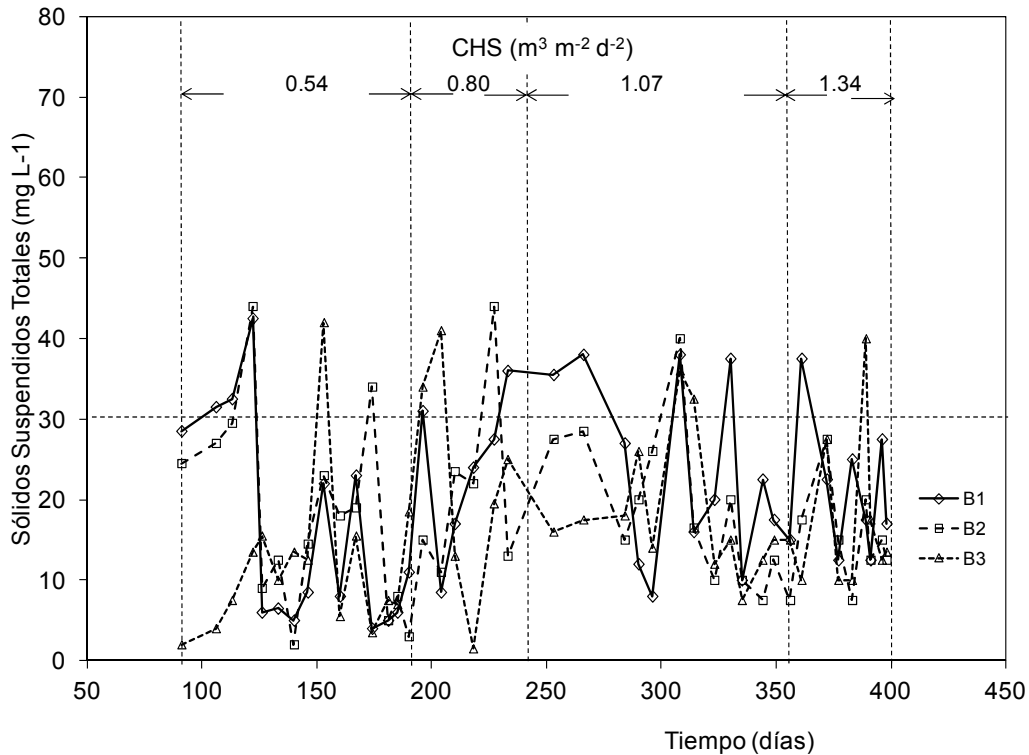


Figura 11 Remoción de sólidos suspendidos totales en los efluentes de los biofiltros con aire.

En la Figura 11 de los biofiltros con aire aparentemente no tuvieron un comportamiento de una cinética de remoción típica donde se observa casi siempre líneas continuas. Sin embargo la concentración promedio obtenida en los BFs con aire es de 91.9% y de 93.4% de eficiencia promedio de remoción de SST en los BFs sin aire (Figura 12). Este comportamiento obedece a que durante la etapa de estudio fue frecuente obtener en algunas ocasiones fracciones muy finas en la trampa hidráulica colocada a la salida de cada biofiltro que era básicamente fracción de fibra de agave degradada.

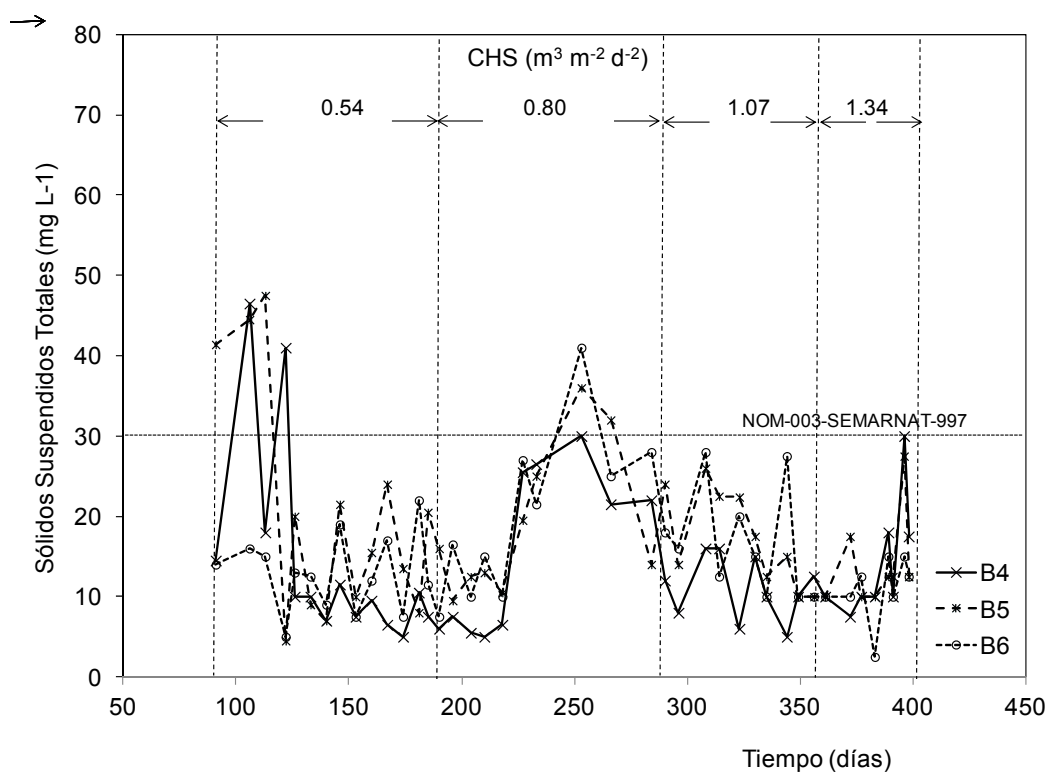


Figura 12 Remoción de sólidos suspendidos totales en biofiltros sin aire.

La concentración promedio de SST en BFs con aire fue de $19.7 \pm 3.3 \text{ mg L}^{-1}$ ($\alpha=0.05$), que se obtuvo a una CHS de $1.07 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y $0.30 \text{ kg DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de COS y para BFs sin aire se obtuvo $16.0 \pm 3.2 \text{ mg L}^{-1}$ con la máxima CHS en esta investigación de $1.34 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ y $0.46 \text{ kg DBO}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de COS. La NOM-003-SEMARNAT-1997 establece como límite máximo permisible 30 mg L^{-1} de SST. Las eficiencias son superiores a la obtenidas por Lens et al. (1994) quienes reportaron 72% de eficiencia usando astillas de madera; y más bajo que el reportado por Buelna et al. (2011) quienes alcanzaron 95% de SST y Buelna y Bélanger (1991) con 98% de SST. La fibra de agave al final del periodo de estudio presentó mayor degradación en los BFs con aire que los de sin aire.

En la Figura 13 se observa el efecto aire sobre la remoción de los SSt en las dos series de biofiltros.

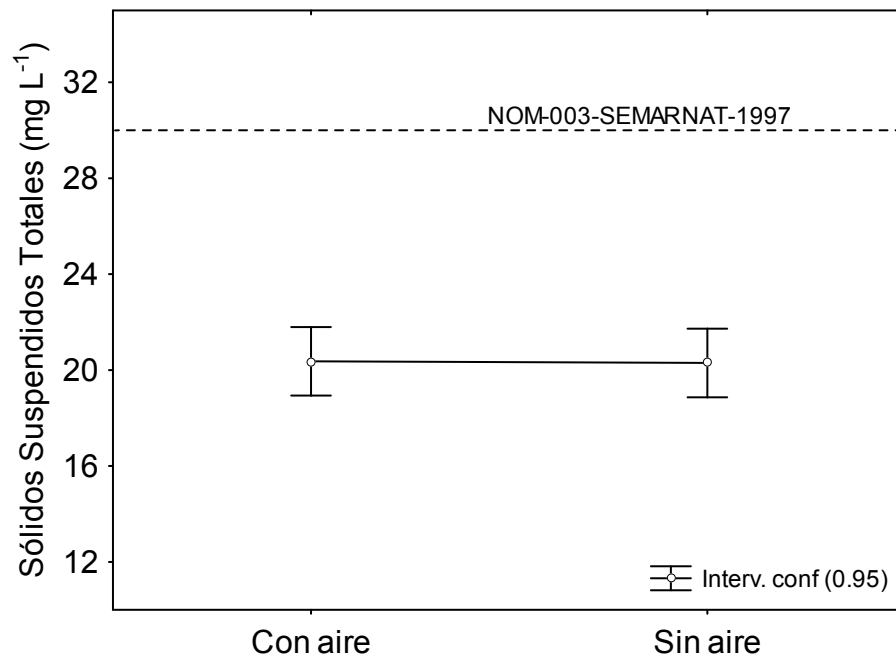


Figura 13 Efecto aire sobre la remoción de sólidos suspendidos totales en las series de biofiltros.

Tabla 8 Prueba de medias del efecto aire sobre la remoción de sólidos suspendidos totales.

LSD test; variable SST Homogenous Groups, $\alpha = .05000$			
Error: Between MS = 132.26, df = 479.00			
	Aire	SST	1
2	2	20.29881	****
1	1	20.36706	****

Tanto en la Figura 14 como en la Tabla 8 indican que no hay diferencias significativas por efecto aire sobre la remoción de sólidos suspendidos totales.

4.4 Efecto empaque.

El efecto empaque fue estadísticamente significativo en la remoción de DBO_5 ($p=0.029$) y DQO ($p=0.001$) ver Tabla 5, como se muestra en la Figuras 14 y 15, respectivamente. El efecto de la interacción $\text{CHS} \times \text{empaque}$ fue estadísticamente significativo en la remoción de DQO ($p=0.048$). Después de la aplicación de $0.80 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de carga hidráulica la eficiencia de remoción de la DQO ya no hay diferencias significativas (Figura 12).

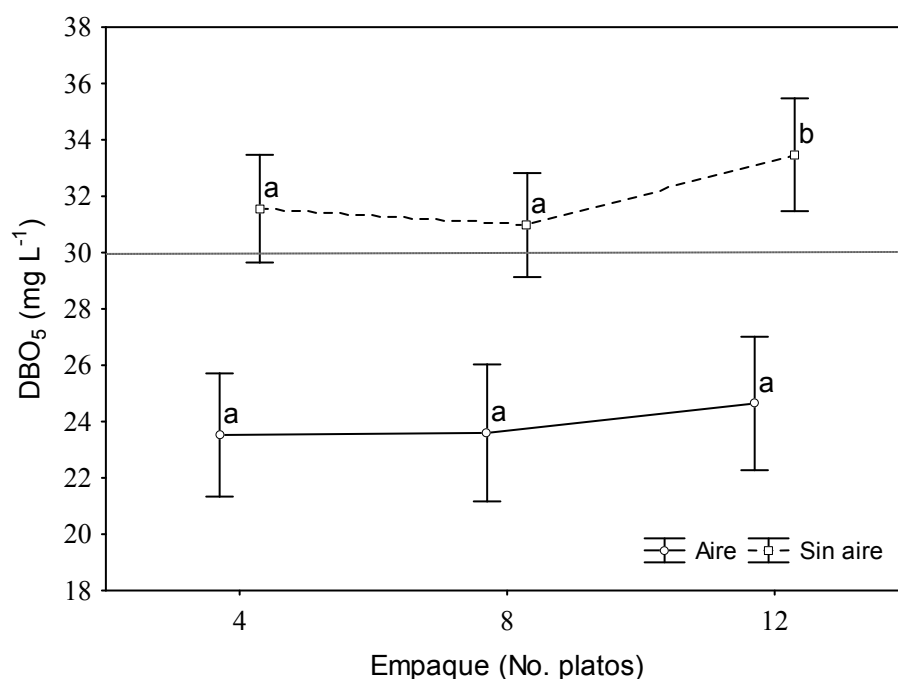


Figura 14 Efecto del empaque en la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en las dos series de biofiltros.

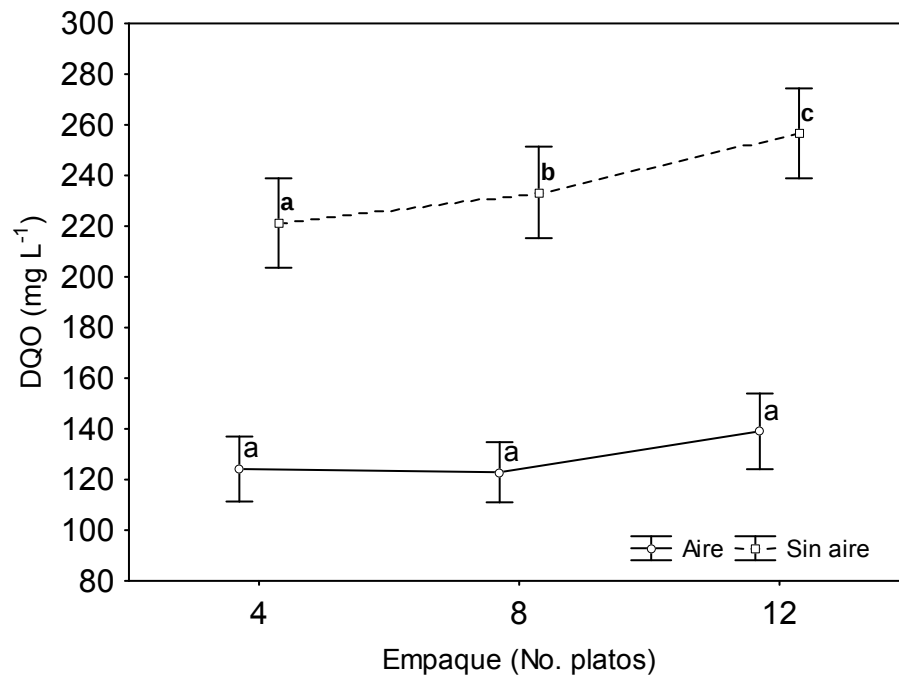


Figura 15 Efecto del empaque en la remoción de la demanda química de oxígeno en las dos series de biofiltros.

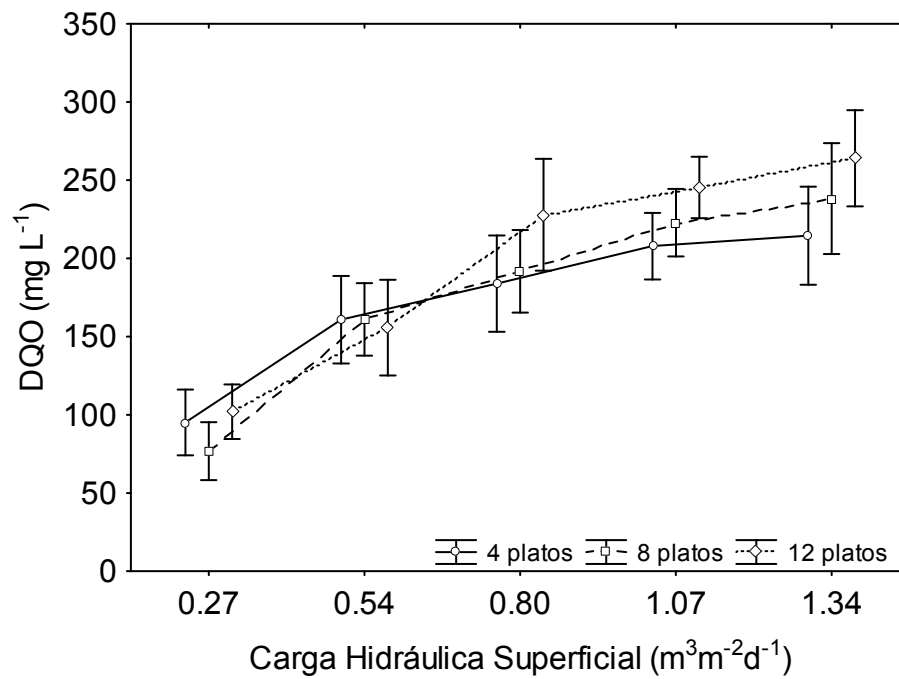


Figura 16 Efecto de la interacción carga hidráulica superficial*empaques en la remoción de demanda química de oxígeno.

En la Figura 16 se observa que para cada empaque hay diferencias estadísticamente significativas y que se muestra en la Tabla 9 con el análisis de medias del efecto de la interacción empaque*CHS en las dos series de biofiltros empacados con fibra de agave.

Tabla 9 Efecto de la interacción empaque*carga hidráulica en la remoción de la demanda química de oxígeno en las dos series de biofiltros.

LSD test; variable COD (DATOS COD SC) Homogenous Groups, alpha = .05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = 4042.5, df = 641.00												
	Empaque	CHS	COD	1	2	3	4	5	6	7	8	9
6	8	0.27	76.7273	****								
1	4	0.27	95.1061	****								
11	12	0.27	101.9697	****								
12	12	0.54	155.6667		****							
2	4	0.54	160.7917		****	****						
7	8	0.54	161.0312		****	****						
3	4	0.80	183.8611			****	****					
8	8	0.80	191.7778				****	****				
4	4	1.07	207.8438				****	****	****			
5	4	1.34	214.4844					****	****	****		
9	8	1.07	222.8438						****	****		
13	12	0.80	227.8889						****	****	****	
10	8	1.34	238.2187							****	****	****
14	12	1.08	245.3438								****	****
15	12	1.34	264.0000									****

4.5 Factor carga hidráulica superficial.

En la Tabla 10 se muestra la ANCOVA donde el efecto de la carga hidráulica superficial fue estadísticamente significativa en la remoción de DBO₅, DQO y CF (p=0.001) y SST (p=0.035), y la interacción aire* CHS para DBO₅, DQO y CF (p=0.001), respectivamente.

Tabla 10 Efecto Carga hidráulica sobre los parámetros de evaluación del proceso de biofiltración

EFECTOS	p			
	DBO ₅	DQO	CF	SST
Intercepto	0.000000	0.000000	0.940533	0.026419
Temperatura	0.606378	0.005208	0.049154	0.182976
Aire	0.000000	0.000000	0.000000	0.768951
Empaque	0.029426	0.000027	0.398867	0.849359
Carga Hidráulica (CH)	0.000000	0.000000	0.000000	0.035388
Aire*Empaque	0.482549	0.361467	0.716268	0.082669
Aire*CH	0.000000	0.000059	0.000221	0.289097
Empaque*CH	0.859457	0.048228	0.406499	0.601669
Aire*Empaque*CH	0.569055	0.552125	0.887584	0.819095

El efecto de la interacción CHS*aire en la remoción de DBO₅ se muestra en la Figura 17. El cambio abrupto en la dirección de la pendiente en biofiltros sin aire de DBO₅ después de 0.80 m³ m⁻² d⁻¹, se puede explicar como la máxima capacidad de los biofiltros para cumplir con la Norma, así también la reducción potencial en el grosor de la biopelícula debido a las fuerzas de tensión del esfuerzo cortante hidrodinámico al paso del agua residual, lo cual tiende a reducir la eficiencia de remoción de los biofiltros (Cohen 2001). La eficiencia de remoción de ambas series de biofiltros disminuye constantemente al incrementarse la CHS.

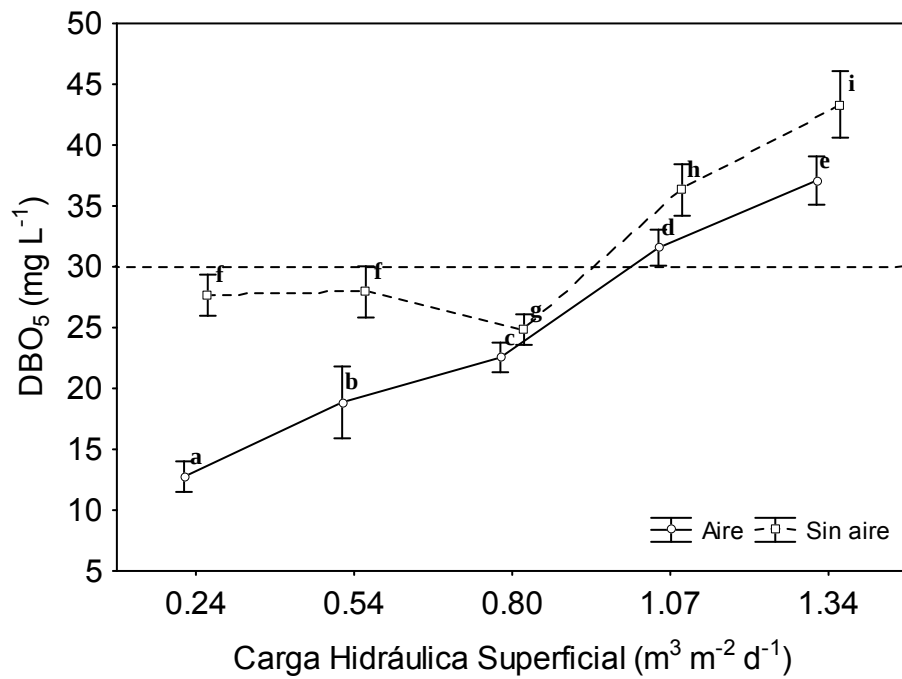


Figura 17 Efecto de la interacción carga hidráulica superficial*aire en la remoción de la demanda bioquímica de oxígeno en las dos series de biofiltros. (Medias con las mismas letras no hay diferencias significativas).

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la ANCOVA en la relación DQO/DBO donde el intercepto, aire, CHS y la interacción aire*CHS son estadísticamente significativos.

Tabla 11 Resultados de la ANCOVA de la relación demanda química de oxígeno/demanda bioquímica de oxígeno

Univariate Tests of Significance for DQO/DBO5 (Datos DQO_DBO) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercepto	242.208	1	242.2081	25.37987	0.000001
Temperatura	0.432	1	0.4315	0.04522	0.831698
Aire	398.979	1	398.9791	41.80717	0.000000
Empaque	28.869	2	14.4344	1.51252	0.221392
CHS	822.769	4	205.6921	21.55353	0.000000
Aire*Empaque	23.604	2	11.8020	1.23667	0.291263
Aire*CHS	262.639	4	65.6599	6.88019	0.000022
Empaque*CHS	134.592	8	16.8240	1.76291	0.082085
Aire*Empaque*CHS	101.315	8	12.6644	1.32705	0.227487
Error	4628.509	485	9.5433		

El efecto de la interacción CHS*aire en la relación DQO/DBO₅ se muestra en la Figura 18. Durante las primeras dos CHS, no existe diferencia estadística en la relación DQO/DBO₅ en ambas series de biofiltros, pero arriba de la CHS de 0.8 m³ m⁻² d⁻¹ hay una diferencia estadísticamente significativa entre biofiltros aireados y no aireados, siendo los primeros que obtienen una menor proporción de DQO/DBO₅. También se observa una tendencia de la relación DQO/DBO₅ a disminuir hacia el valor inicial de la DQO/DBO₅ de 2.3 debido a la pérdida de eficiencia de remoción del sistema.

En la Tabla 12 se muestra el análisis de medias donde se muestra el efecto de la interacción air*CHS en la relación DQO/DBO₅ siendo el mejor el BF aireado en la CHS de 1.34 m³m⁻²d⁻¹.

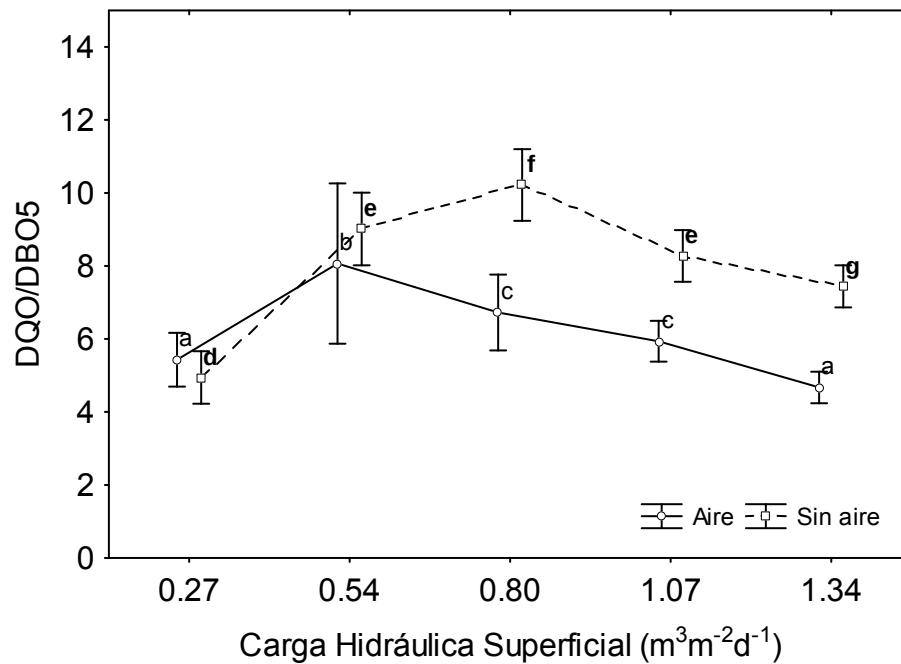


Figura 18 Efecto de la interacción en la relación demanda química de oxígeno/demanda bioquímica de oxígeno para los biofiltros con aire y sin aire. (Medias con las mismas letras no hay diferencias significativas).

Tabla 12 Prueba de medias para el efecto de la interacción aire*CHS en la relación demanda química de oxígeno/demanda bioquímica de oxígeno.

LSD test; variable DQO/DBO ₅ (Datos DQO_DBO ₅) Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = 9.5433, df = 485.00										
	Aire	CHS	DQO/DBO ₅	1	2	3	4	5	6	7
5	1	1.34	4.66987	****						
6	2	0.27	4.94370	****	****					
1	1	0.27	5.43135	****	****					
4	1	1.07	5.93688		****				****	
3	1	0.80	6.72309			****			****	
10	2	1.34	7.44051			****	****			
2	1	0.54	8.06507			****	****	****		
9	2	1.07	8.27443				****	****		
7	2	1.07	9.01218					****		****
8	2	0.80	10.21966							****

El efecto de la interacción CHS*aire en la remoción de CF se muestra en la Figura 19. Antes de la CHS de $0.80 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ la eficiencia de remoción de los CF fue constante con 4 y 3 unidades logarítmicas en los biofiltros aireados y no aireados, respectivamente. La eficiencia de remoción de CF disminuye cuando la CHS aumenta. Para el uso de irrigación agrícola y áreas de verdes, los efluentes requieren una desinfección previa para alcanzar los límites máximos permisibles de $1000 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ para irrigación ó $<200 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$ para riego de hortalizas.

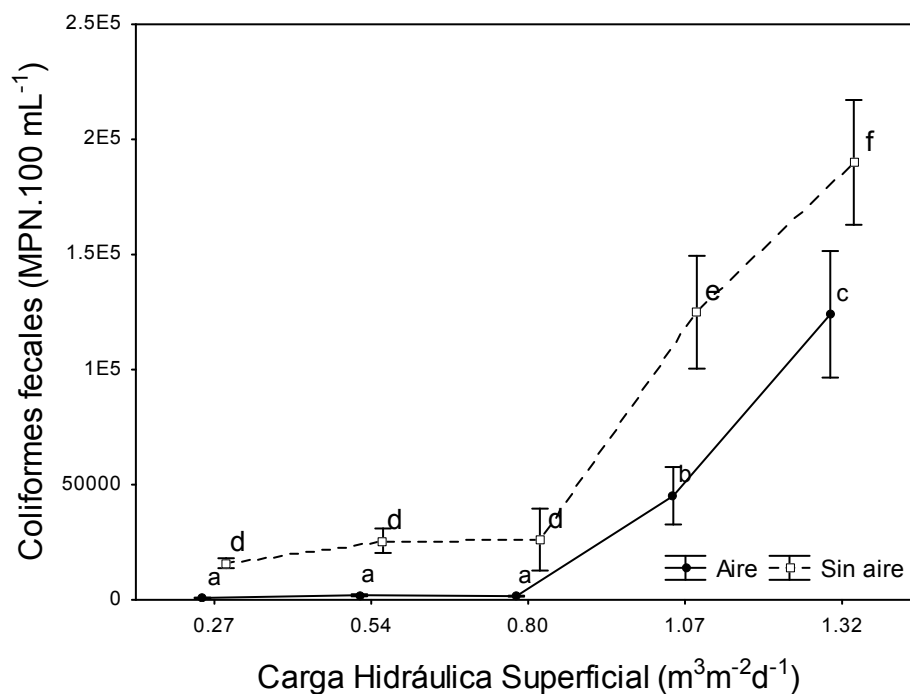


Figura 19 Efecto estadístico de la interacción carga hidráulica superficial*aire en la remoción de coliformes fecales (Medias con las mismas letras no hay diferencias significativas).

En la Tabla 13 se muestra el análisis de medias de la interacción aire*CHS donde el mejor efecto se tuvo en los filtros con aire en la carga hidráulica de $0.27 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$

Tabla 13 Efecto de la interacción aire*CHS sobre la remoción de coliformes fecales en los biofiltros orgánicos.

LSD test; variable FC (DATES FC) Homogenous Groups, alpha = .05000 Error: Between MS = 4546E6, df = 497.00							
	Air	CHS	CF	1	2	3	4
1	1	0.27	846.9	****			
3	1	0.80	1671.2	****			
2	1	0.54	2024.5	****			
6	2	0.27	15903.2	****			
7	2	0.54	25648.3	****	****		
8	2	0.80	26159.8	****	****		
4	1	1.07	45203.4		****		
5	1	1.34	124021.9			****	
9	2	1.07	124942.1			****	
10	2	1.34	190038.4				****

4.6 Efecto de la temperatura como covariable.

El análisis de ANCOVA mostró que el efecto temperatura fue estadísticamente significativa en la remoción de DQO ($p=0.005$) y CF ($p=0.049$).

El efecto temperatura en la eficiencia de remoción de DQO (Figura 20) tiene una tendencia creciente a medida que aumenta la temperatura y el mayor efecto se obtuvo a los 29°C.

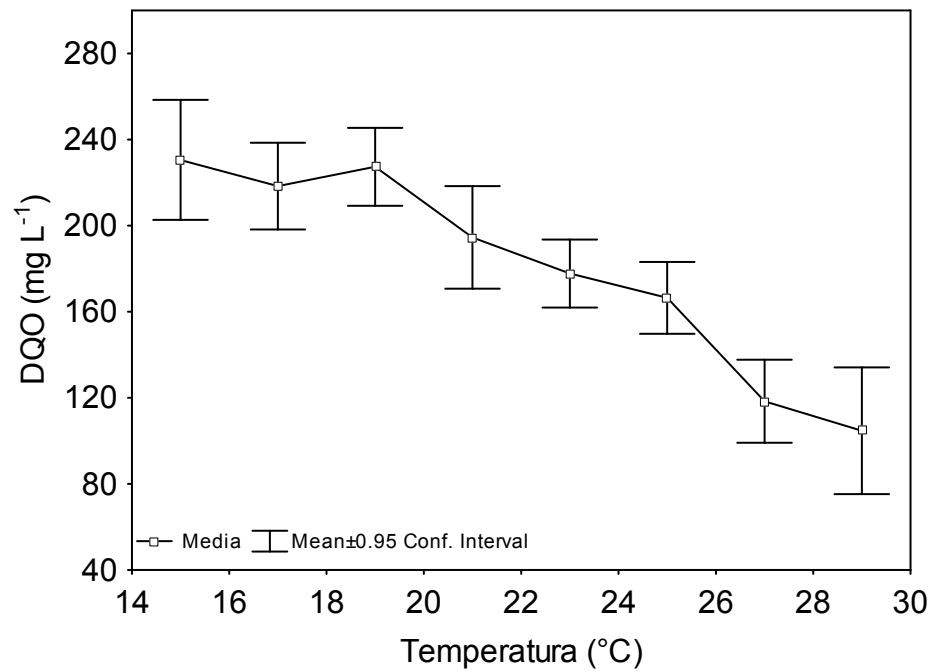


Figura 20 Efecto temperatura en la eficiencia de remoción de demanda química de oxígeno en las series de biofiltros con aire y sin aire.

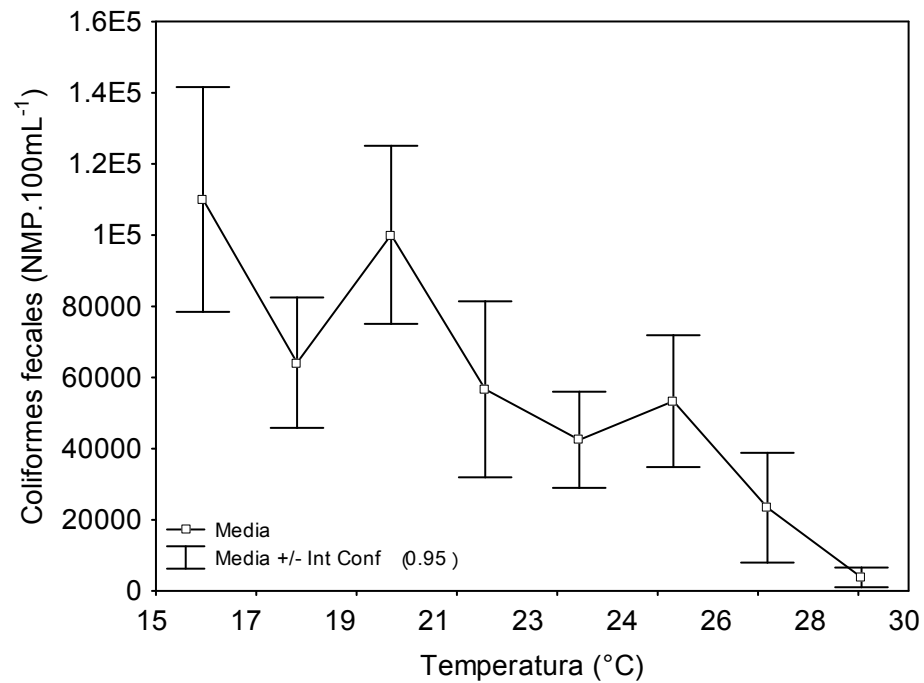


Figura 21 Efecto temperatura en la eficiencia de coliformes fecales en las series de biofiltros con aire y sin aire.

4.7 pH y conductividad eléctrica.

El valor promedio registrado de pH fue 7.12 ± 0.05 para el agua residual municipal, 7.24 ± 0.04 para los efluentes de los biofiltros aireados y 7.00 ± 0.03 para los efluentes de los biofiltros no aireados. Estos resultados son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$). Si el pH permanece constante, una calidad saludable de la biopelícula se mantiene en la fibra de agave, lo cual mejora la capacidad de adsorción de los microorganismos (Cohen 2001).

El promedio de la conductividad fue de $736 \pm 14 \mu\text{S cm}^{-1}$ en el efluente de los biofiltros, y el valor permitido es de $3000 \mu\text{S cm}^{-1}$. Por lo tanto los efluentes pueden ser reusados en el riego agrícola y áreas verdes sin el efecto de ocasionar la salinidad del suelo.

Finalmente, durante el desarrollo de esta investigación, los biofiltros aireados no mostraron problemas de obstrucción en el material soporte; una máxima pérdida de presión de 4 mm de la columna de agua fue registrada durante los diez y siete meses que duró el experimento mientras que otros investigadores reporta pérdidas de presión alta cuando los materiales orgánicos tienen menos de 60% de huecos o espacio vacío (Schmidt et al. 004). Las placas de separación colocadas dentro de los biofiltros probaron la hipótesis de que la caída de presión del aire no afecta la eficiencia del proceso de filtración. Una característica importante que se observó durante el manejo de los efluentes de los biofiltros es que estos no presentaron olores desagradables.

4.8 Cuantificación de microorganismos en medios de cultivo específicos.

4.8.1. Extracción de ADN de muestras de las series de biofiltros.

Después de realizar el cultivo de las diferentes muestras en cinco medios de cultivo diferentes, se obtuvieron 56 morfotipos. En la Figura 1 se muestra la presencia del ADN puro de algunas muestras antes de la amplificación.

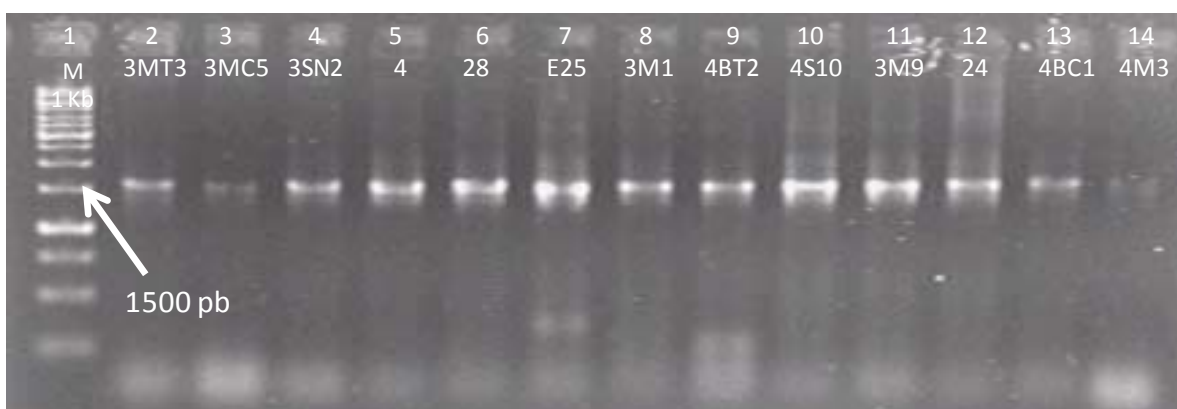


Figura 22 Presencia de ADN puro de muestras de morfotipos antes de la amplificación del gen 16S rRNA.

4.8.2. Cuenta de microorganismos por fracción extraíble.

En la Tabla 14 se muestran la cantidad de microorganismos anaerobios, celulolíticos y desnitrificantes expresada como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de fibra de agave, donde se desarrolló la biopelícula y se

obtuvieron con cinco medios de cultivo diferentes, que da una diversificación en función de los nutrientes seleccionados.

Tabla 14 Concentración de los diferentes microorganismos que conforman la biopelícula.

Tipo de biofiltro	Posición en la columna del BF	No. UFC /g de fibra de agave					
		Anaerobios	±DE	Celulolíticos	±DE	Desnitrificantes	±DE
CON AIRE	Superior	2.07E+09	1.12E+08	3.09E+09	7.03E+07	3.13E+07	5.62E+08
	Media	5.61E+08	1.80E+08	7.14E+08	4.23E+07	2.54E+06	1.06E+08
	Baja	1.56E+07	8.00E+05	2.32E+08	1.04E+08	2.94E+05	3.20E+08
SIN AIRE	Superior	7.73E+08		1.57E+09	1.50E+08	5.49E+07	1.25E+08
	Media	2.08E+07	2.23E+06	1.48E+07	4.77E+05	1.32E+05	5.25E+06
	Baja	1.95E+08	6.25E+07	4.41E+09	1.88E+08	6.06E+07	6.25E+08
EF2 (BF A)		3.00E+05		2.50E+07		2.80E+07	7.00E+07
EF5 (BF SA)		4.45E+07		1.40E+08	1.50E+08	3.40E+08	1.40E+07

DE= desviación estándar

EF2= Efluente de BF con aire

EF5= Efluente de BF sin aire

Estos resultados se obtuvieron en la etapa final del estudio, respecto de la carga hidráulica superficial de $1.34 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. La presencia de microorganismos anaerobios en los biofiltros con aire infiere que existen zonas anóxicas (zonas con baja concentración de oxígeno disuelto) que ocasiona se lleve a cabo el proceso nitrificación-desnitrificación que favorece la remoción de compuestos nitrogenados encontrados en proceso de lodos activados (Peng y Qi, 2007). Esto sugiere que es importante adentrarse en la evaluación de este proceso, ya que estudios a nivel laboratorio son muy escasos (Pathak et al., 2007).

En la Tabla 15 se muestran el complemento de los tipos de organismos encontrados las concentraciones respecto a aerobios y nitrificantes obtenidos por el método de fracción cultivable.

Tabla 15 Concentración de diferentes microorganismos que conforman la biopelícula.

Tipo de biofiltro	Posición en la columna del BF	UFC/g de fibra de agave			
		Aerobios	±DE	Nitrificantes	±DE
CON AIRE	Superior	8.92E+08	1.26E+09	1.31E+09	9.14E+07
	Media	4.66E+08	1.80E+08	2.00E+08	8.47E+06
	Baja	1.40E+08	8.00E+06	5.60E+07	5.60E+06
SIN AIRE	Superior	7.67E+09	1.25E+08	7.11E+08	1.75E+08
	Media	2.70E+07	4.77E+06	2.45E+07	
	Baja	8.37E+09	3.28E+09	2.66E+09	2.03E+08
EF2 (BF A)		1.80E+07	1.30E+06	9.35E+05	6.00E+04
EF5 (BF SA)		2.30E+08	1.00E+06	4.15E+07	1.20E+07

DE= desviación estándar EF2= Efluente de BF con aire EF5= Efluente de BF sin aire

Comparando la cantidad de microorganismos aerobios y los anaerobios estos últimos se encuentran diez veces más alta la concentración en la parte superior de los biofiltros con aire, después de 15 mese de operación. Una explicación podría ser que el material de empaque cada vez es más compacto y las zonas anóxicas se incrementan, lo que podría estar relacionado con la baja eficiencia en remoción de coliformes fecales.

En la Figura 24 se muestra la diversidad de población microbiana en los tres sitios del biofiltro con aire donde predomina en la parte superior la presencia de microorganismos celulolíticos. Esto obedece principalmente a que la materia orgánica que contiene el agua residual cruda es rica en estos este tipo de compuestos y conforme se va degradando en compuestos más simples, monómeros, la concentración también disminuye.

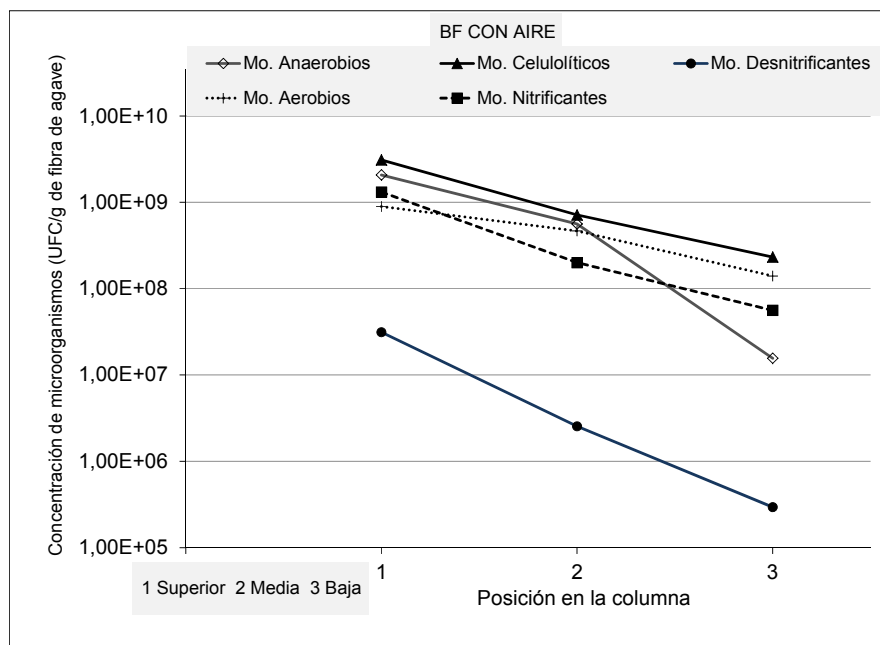


Figura 23 Concentración promedio de microorganismos en tres secciones de los biofiltros con aire.

Debido a que durante la descarga del agua residual en los biofiltros, la acumulación de materia orgánica en suspensión y los propios sólidos suspendidos totales influyen para que se forme una capa relativamente gruesa, esto podría contribuir al crecimiento zonal de anaerobios que es microambiente idóneo para que se desarrolle este tipo de organismos (Gaudy y Gaudy, 1988). Otra característica de la cuenta elevada de microorganismos anaerobios comparada con las otras poblaciones que el agua residual cruda es rica en este tipo de microorganismos, debido a que la concentración de oxígeno disuelto es cero (Ramalho, 1996). De ahí que los procesos anaerobios para tratamiento de aguas residuales con alta carga orgánica expresada como DQO, sean recomendable (Metcalf y Eddy, 1991). En los procesos anaerobios su función principal de los organismos que ahí se desarrollan es la descomposición de polímeros en monómeros (Gaudy y Gaudy, 1988).

Respecto a los microorganismos desnitrificantes, estos son facultativos heterótrofos que requieren carbono orgánico como fuente, son responsables de la reducción de los nitratos a nitrógeno atmosférico. Su baja concentración en la biopelícula en la parte baja del biofiltro, podría deberse a la presencia de oxígeno disuelto en la parte baja de la columna del biofiltro, al cual es susceptible. El oxígeno presente en las moléculas del nitrato es suficiente para que pueda realizar el proceso de desnitrificación aunado a una estabilidad del pH, donde es recomendable entre 7 y 8 unidades. Las aguas residuales suministradas a los biofiltros se mantuvieron en este rango por lo que este parámetro no tuvo ningún efecto sobre el proceso de desnitrificación.

Es importante destacar la presencia de microorganismos nitrificantes ya que por ser un sistema aireado la presencia del oxígeno favorece el desarrollo del proceso de nitrificación dentro de los biofiltros orgánicos empacados con fibra de agave. Su función principal es oxidar y transformar los compuestos nitrogenados a nitratos (NO_3^-) y agua (proceso de nitrificación). Por otro lado, la presencia de microorganismos desnitrificantes actúan sobre los nitratos para transformarlos en compuestos estables como es el N_2 y H_2O (proceso de desnitrificación).

Finalmente, la concentración de los microorganismos aerobios son más bajos que los anaerobios en la parte superior del biofiltro aún y cuando hay suministro de oxígeno, lo cual viene a ratificar que el agua residual cruda no tiene oxígeno disuelto.

En la Figura 25 se muestra la concentración de los diferentes tipos de microorganismos en los biofiltros sin aire, expresados como el número de UFC/ g de fibra de agave, con un comportamiento muy especial respecto de los mostrados en los biofiltros con aire.

En las cinco poblaciones diferentes determinadas en la biopelícula se observa tienen en la parte superior de la columna una concentración elevada de cada uno de ellos, los cuales disminuyen la concentración casi con la misma pendiente o velocidad y al llegar al centro de la columna del biofiltro sin aire, prácticamente se mantienen

constantes. Sin embargo, conforme va descendiendo el agua en tratamiento, ambas poblaciones reinician su crecimiento hasta casi igualar la concentración inicial. En función de este comportamiento podemos asegurar que en ambos biofiltros con aire y sin aire se lleva a cabo el proceso de nitrificación –desnitrificación lo cual favorece en la calidad del efluente.

Por otro lado, esta dinámica de crecimiento poblacional podría explicar por qué la remoción de coliformes fecales no es tan eficiente en este tipo de BFs sin aire comparado con los BFs con aire.

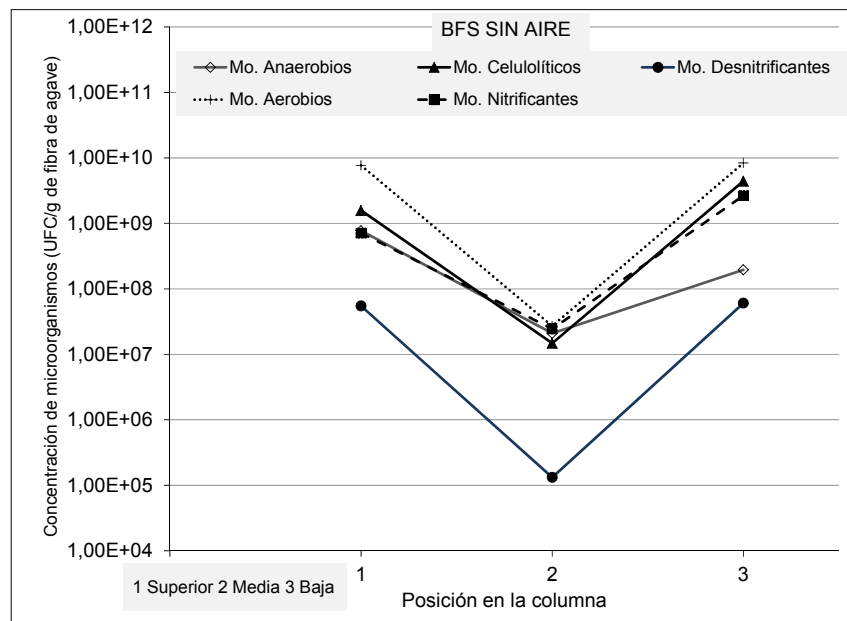


Figura 24 Concentración promedio de microorganismos en tres secciones de los biofiltros sin aire.

En cuanto a la alta concentración de microorganismos en el efluente de los biofiltros fue mayor en una unidad logarítmica en los biofiltro sin aire que los biofiltros con aire. La causa de estas diferencias es que la biopelícula podría haber llegado al proceso inverso de la adhesión (des adhesión) (Cohen, 2002) o estar lavandose por los

esfuerzos cortantes hidrodinámicos causada por la alta carga hidráulica superficial ($1.34 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$).

Tabla 16 Concentración de microorganismos presentes en el efluente de los biofiltros.

Tipo de microorganismos	Efluente de los biofiltros	
	Con aire	Sin aire
	UFC/g de fibra de agave	
Anaerobios	3.00E+05	4.45E+07
Celulolíticos	2.50E+07	1.40E+09
Desnitrificantes	2.80E+07	3.40E+08
Aerobios	1.80E+07	2.30E+08
Nitrificantes	9.35E+05	4.15E+07

4.8.3. Identificación de microorganismos de la fracción cultivable por dendrogramas.

En la Figura 26 se muestra la diversidad de amplicones del gen 16S rRNA aislados de la fibra de agave donde se desarrolla la biopelícula de donde se identificaron los siguientes géneros bacterianos: *Bacillus licheniformes*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *Lysinibacillus* sp, *Paenibacillus* sp y *Chryseobacterium meningosepticum*. pertenecientes al *Phylum Firmicutes*.

En la Tabla 8 se muestra la clave de la cepa, microorganismo presuntivo y el porcentaje de identidad más próxima del GenBank. A fin tener referencia de los microorganismos presuntivos, además de algunas citas publicadas de ese género en particular, para consulta a las bibliotecas del GenBank.

(Saito y Nei, 1987). El árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama es igual a 0.15322893. Los valores de “Bootstrap” en el cual asocia a cada uno de los taxones agrupados después de 1000 repeticiones se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1984). El árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas empleadas para inferir el árbol filogenético y son en las unidades del número de sustituciones base por sitio. La variación de velocidad entre sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de la forma = 1). El análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y falta de datos. Hubo un total de 405 posiciones en el conjunto de datos final. Se realizaron análisis evolutivos en MEGA5 (Tamura et al., 2011).

En la Tabla 17 se muestra la lista de microorganismos presuntivos con la clave asignada y el porcentaje máximo de identidad obtenidos con apoyo de bibliotecas del Taxonomy browser del NCBI. Se anota la bibliografía reportada cuando se dispone así como los sitios donde se aislaron.

Tabla 17 Lista de microorganismos presuntivos amplificados con el 16S rRNA que pertenecen al *Pyilum Bacteriodates* y *Firmicutes* aislados de los biofiltros orgánicos.

Cepa	Microorganismo presuntivo	Máximo % de	Medio donde se aisló*
4MN4	<i>Bacillus licheniformis</i> HM753626	99	No determina sitio de aislamiento http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore
4MN2	<i>B. licheniformis</i> JN391533	99	En suelos salinos http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/320584229
4MN3	<i>Bacillus subtilis</i> AY881638	98	No publicado
4MO2	<i>B. circulans</i> NR042726	100	Tolerantes al Boro en cenizas de volcánica
30	<i>Lysinibacillus</i> sp. FN397524	99	Heces fecales humanas (Hoyle et al., 2012)
4M4	<i>Paenibacillus</i> sp. AM162316	100	Aislado en humanos, no publicado http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/82940479
3M4	<i>Chryseobacterium joostei</i> AY468479	98	Ambientes acuáticos (Bernardet et al. 2005)
3M2	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> AJ704543	98	Ambientes acuáticos (Bernardet et al. 2005)

*Se buscó en Taxonomy browser <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/82940479>

Los amplificados con el gen 16S rRNA identificados en el dendrograma de *Bacteridates* y *Fimicutes* son localizados en la parte media de los biofiltro orgánicos empacados con fibra de agave sin aire y son identificados como desnitrificantes, que también fueron reconocidos por la DGGE, como son *Bacillus licheniformes* y *B. subtilis*, mientras que *B. circulans* es un anaerobio; *Lysinibacillus* sp. es celulolítico, mientras que *Chryseobacterium joostei* y *C. meningosepticum* son dos bacteria conocidas como desnitrificantes.

En la Figura 27 se observa el dendrograma de los amplicones con el gen 16S rRNA donde se identificaron los géneros de *Cellulomonas parahominis*, *C. Hominis* y *Arthrobacter* sp., perteneciente al *Phylum Actinobacterias*.

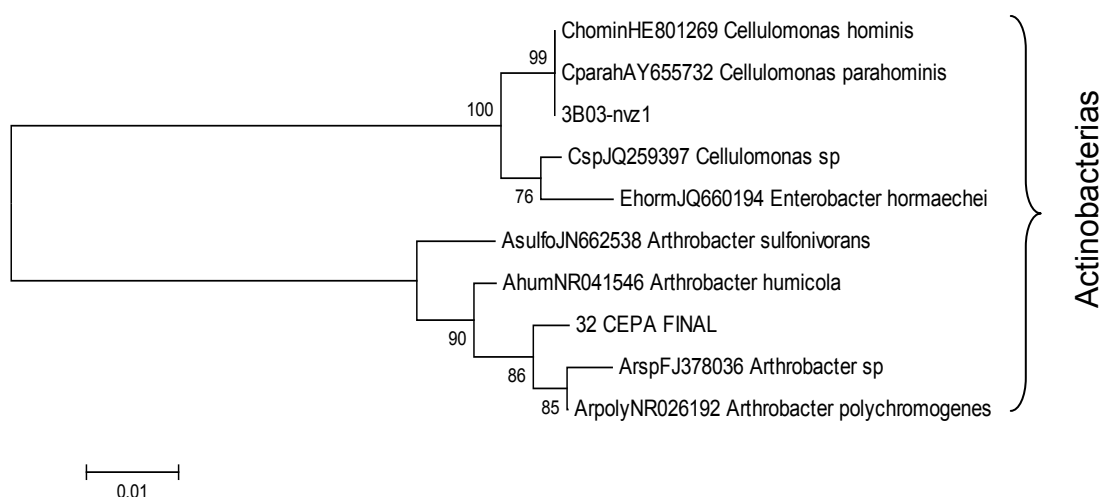


Figura 26 Árbol filogenético de la amplificación del gen 16S rRNA aislados de la biopelícula de los biofiltros con y sin aire en los diferentes medios de cultivo, con 1000 replicas (prueba de Bootstrap) correspondientes al *Phylum Actinobacterias*. La barra representa el 1% de cambios entre las frecuencias.

En la Figura 27 las amplificaciones del gen 16S rRNA de las cepas del *Phylum Actinobacterias* muestra que la historia evolutiva fue inferida mediante el método Neighbor-Joining (Saitoy y Nei, 1987). El árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama es igual a 0.15322893. El porcentaje de replicadas de árboles con la asociación de taxas se agrupan juntos en la prueba Bootstrap (1000 repeticiones) y se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1984). El árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que la de las distancias evolutivas empleadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Tajima-Nei (Tajima y Nei, 2011) en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. La variación de velocidad entre sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de la forma = 1). El análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contiene vacíos y falta de datos. Hubo un total de 405 posiciones en el conjunto de datos finales. Se realizaron los análisis evolutivos con MEGA5 (Tamura et al., 2011). En la Tabla 18 se

describe el tipo de microorganismo, porcentaje de identidad y el sitio donde fue aislado.

Tabla 18 Lista de microorganismos presuntivos de las amplificaciones del gen 16S rRNA aislados en la biopelícula de los biofiltros y cultivados en diferentes medios de cultivo.

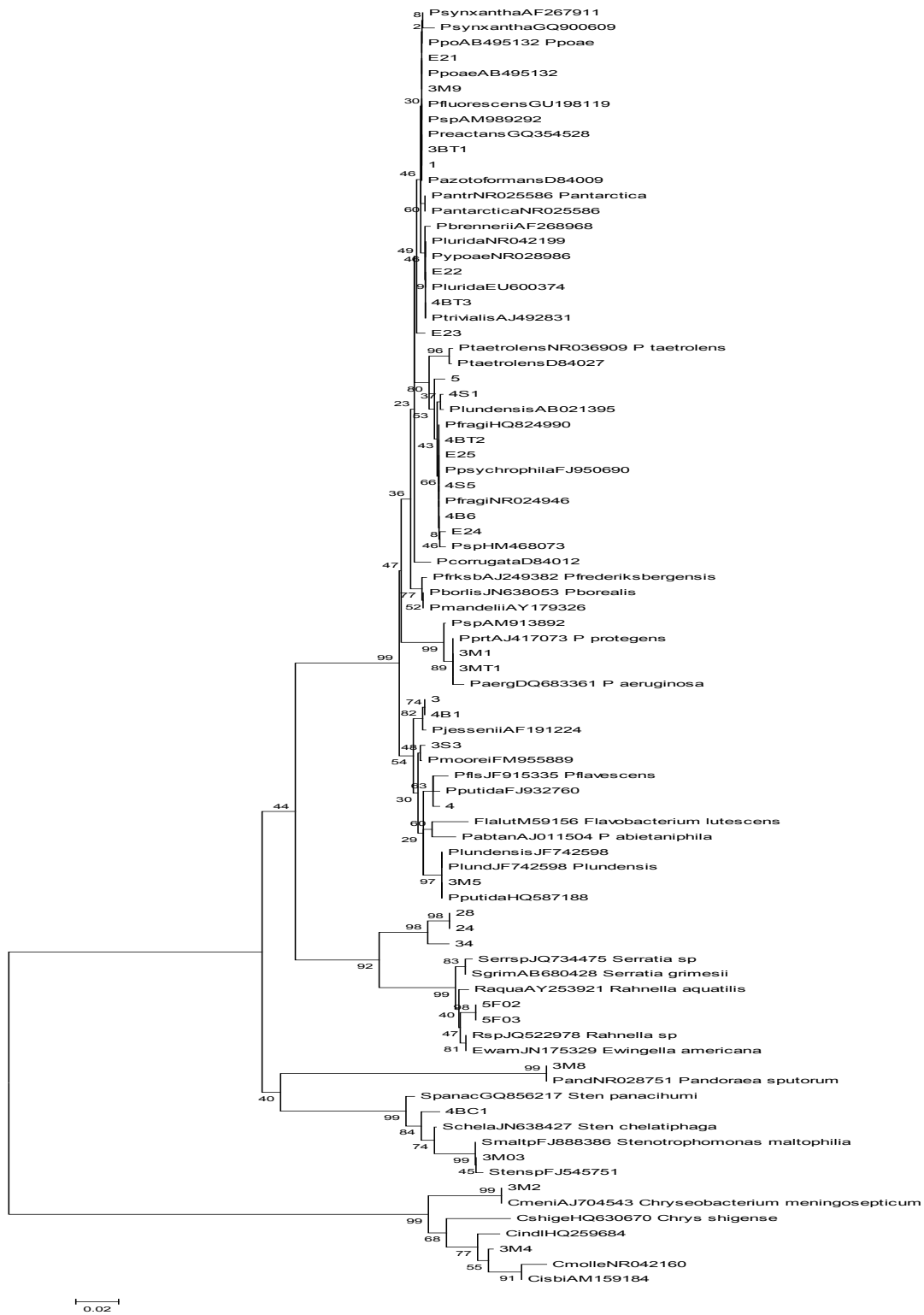
Cepa	Microorganismo presuntivo	Maximo % de identidad	Medio donde se aisló
3BO3	<i>Cellulomonas hominis</i> HE801269	99	Degradador de hidrocarburos en suelos No hay publicación.
32	<i>Arthrobacter</i> sp FJ378036	99	Degradador de ésteres de ácido Phtalico (Liang et al., 2010)

3BO3 clave de identificación: 3 = aerobio; B= bajo; O=nitrificante; 3= No. amplicon

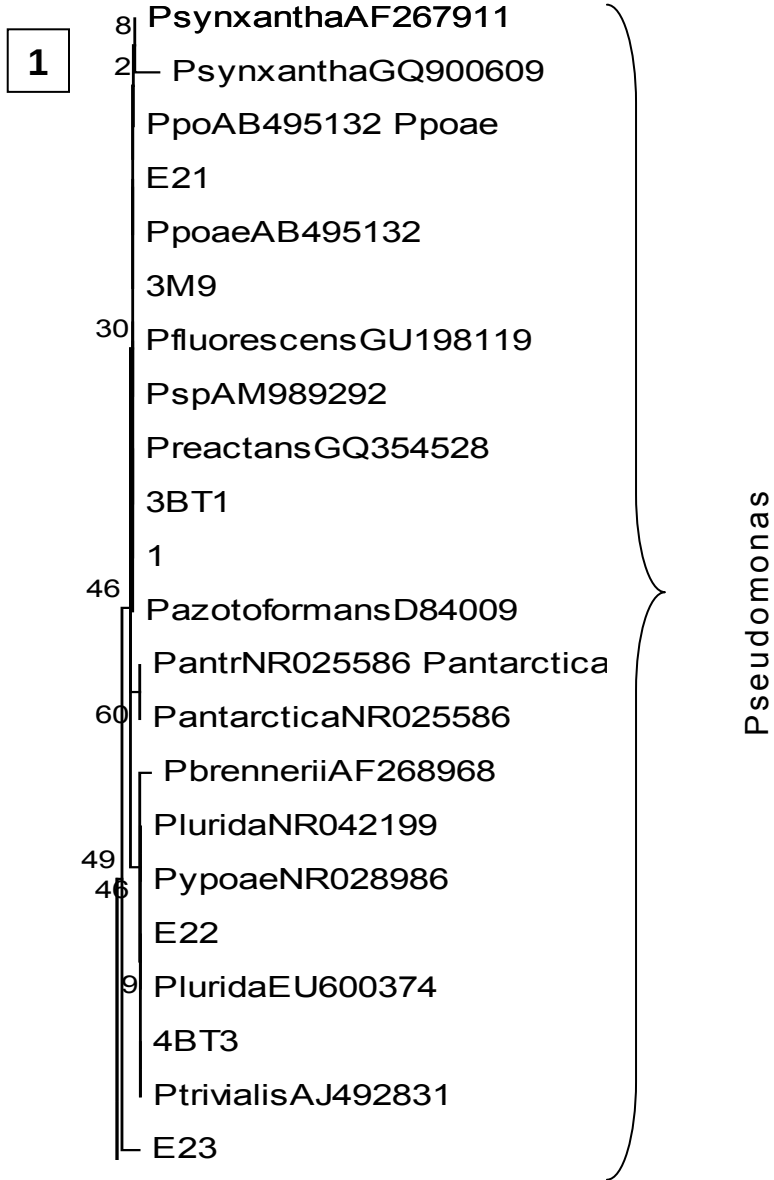
De los dos microorganismos identificados con dendrograma de *Actinobacterías* estos tienen alta relevancia ambiental y biotecnológica, el primero (*Cellulomona hominis*) es un microorganismo desnitrificante, localizado en la parte baja de los biofiltros aireados, tiene importancia ambiental ya que es degradador de hidrocarburos por lo que puede ser un amplificado de gran potencial biotecnológica para coadyuvar a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. El segundo es el amplificado de *Arthrobacter* sp también desnitrificante tiene la característica de ser degradador de ésteres del ácido phtalico, componente básico de los plásticos que produce flexibilidad y su producción biotecnológica podría aplicarse como un catalizador en los rellenos sanitarios para acelerar la degradación de los plásticos (Liang et al., 2010).

Respecto a los amplificados del gen 16S rRNA del *Phylum Proteobacterias* (gamma y alfa) se muestran en la Figura 28. Debido a que el tamaño gráfico del árbol

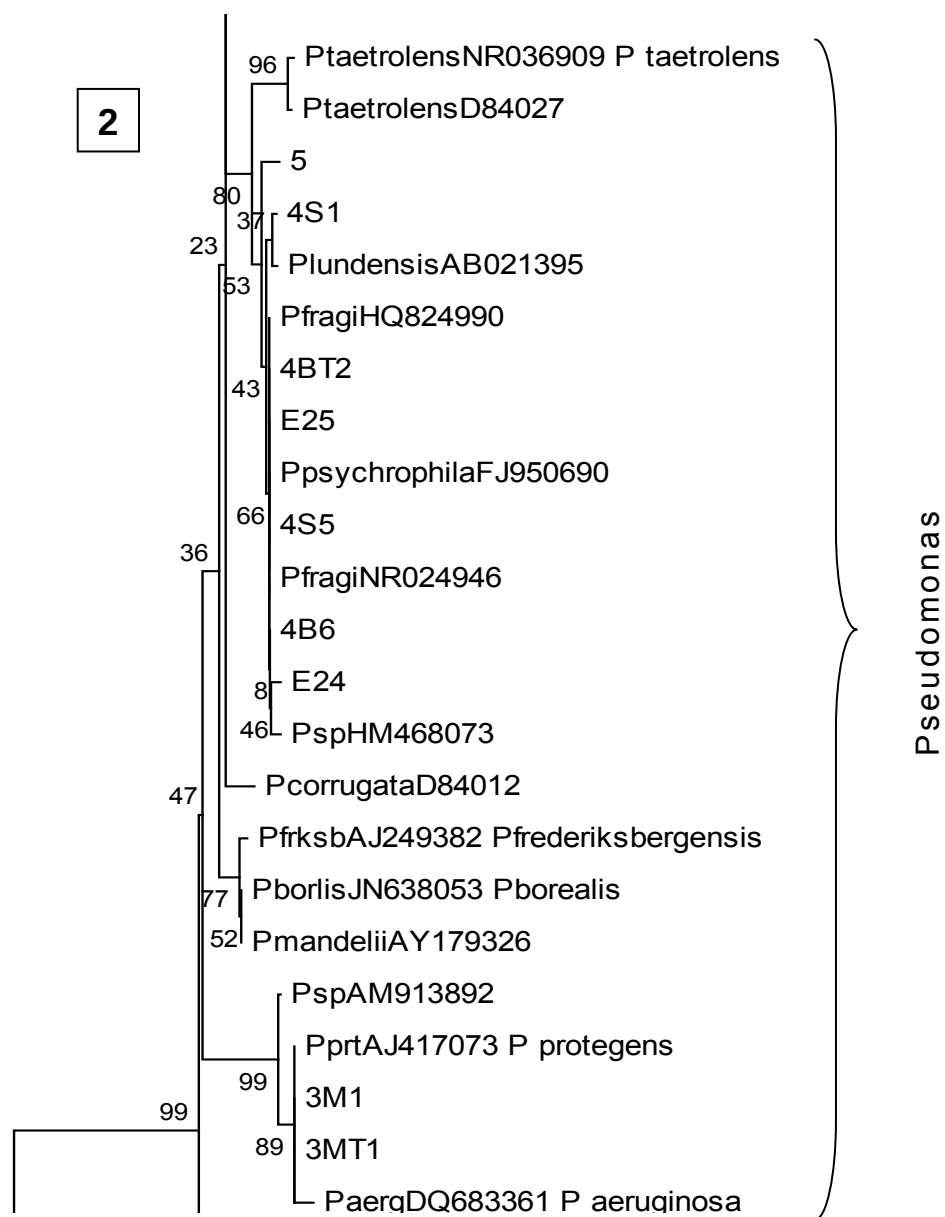
filogenético es grande, se fragmentó en cuatro secciones. La composición de la comunidad bacteriana está dominada por gran cantidad de α -*Proteobacteria* y β -*Proteobacteria*, con una cantidad menor de *Bacteriodates*, similar a los resultados obtenidos en un tratamiento de aguas residuales industriales por Reid et al. (2008).



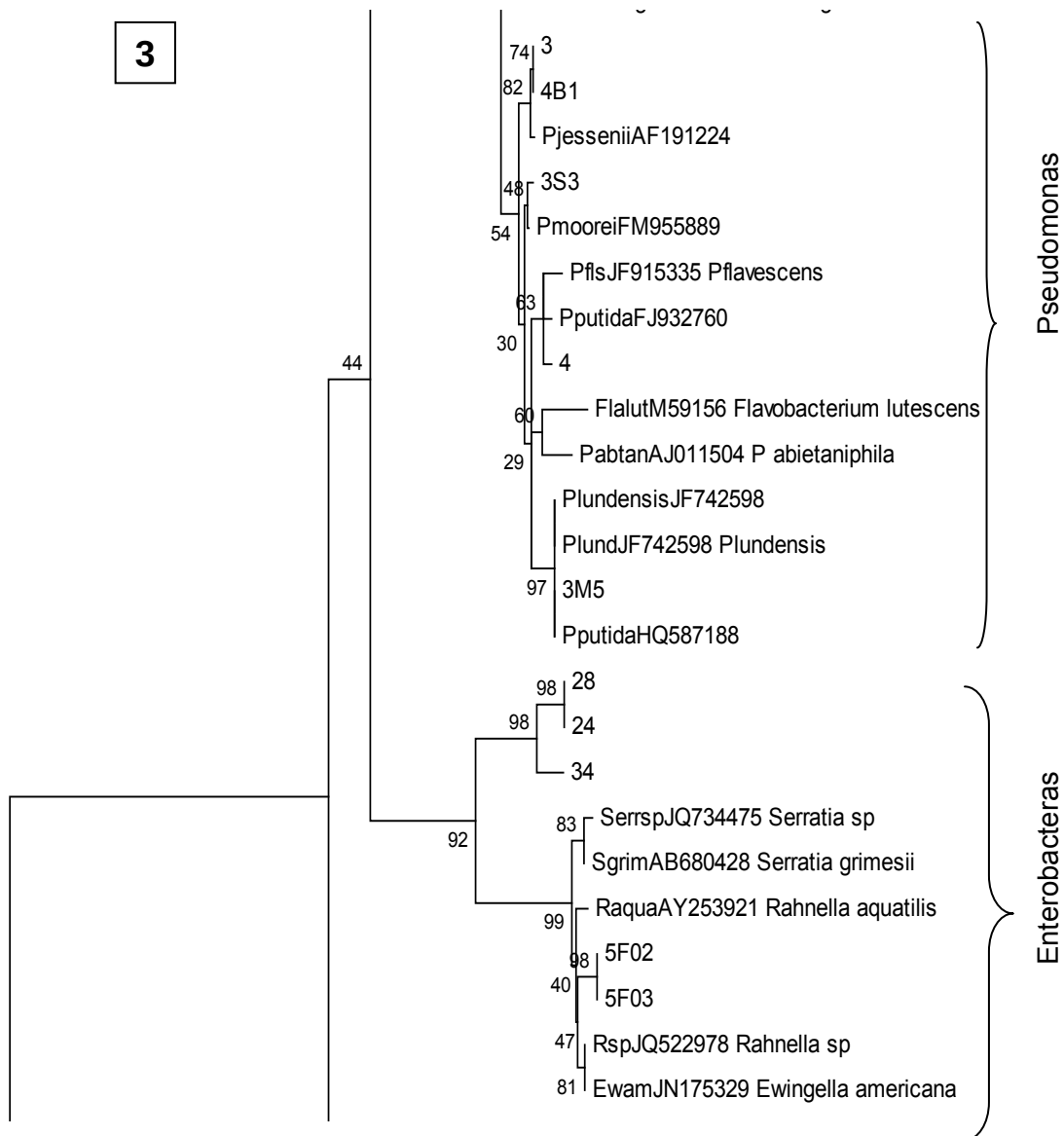
Árbol filogenético del Phylum Protobacterias.



Primera sección del árbol filogenético del *Phylum Protobacterias*.



Segunda sección del árbol filogenético del *Phylum Protobacterias*.



Tercera sección del árbol filogenético del *Phylum Protobacterias*.

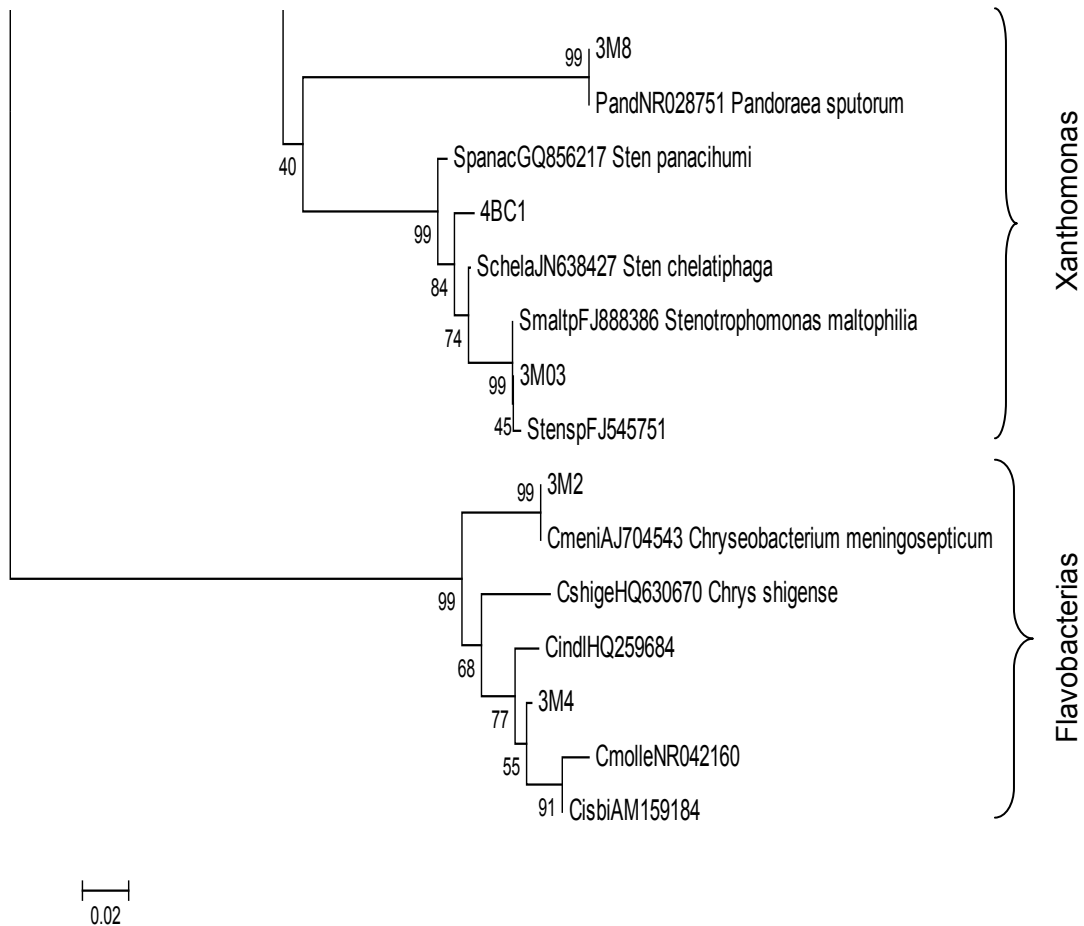


Figura 27 Árbol filogenético, fraccionado en cuatro secciones, de la amplificación del gen 16S rRNA aislados de la biopelícula de los biofiltros con y sin aire en los diferentes medios de cultivo, con 1000 replicas (prueba de Bootstrap) correspondientes al *Phylum Protobacteria*. La barra representa el 2% de cambios entre las secuencias

En la Figura 28 las amplificaciones del gen 16S rRNA de las cepas de *Protobacterias* (gamma y alfa) muestra la historia evolutiva de los amplificados inferida mediante el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). El árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama es igual a 1.07480292. El porcentaje de replicas de árboles en el cual asocia los taxos se agrupan juntos en la prueba Bootstrap (1000 repeticiones) y se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1984). Las distancias evolutivas se

calcularon utilizando el método de Tajima-Nei (Tajima y Nei,1984) y son en las unidades del número de bases de sustitución por sitio. La variación de velocidad entre sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de la forma =1). El análisis involucró 84 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y falta de datos. Hubo un total de 412 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA5 (Tamura et al., 2011).

Los microorganismos presuntivos de la Tabla amplificados con el gen 16S rRNA resultantes del análisis filogenético pertenecientes al *phylum protobacterias* destacan las siguientes géneros *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Pandorea*, *Stenotrophomonas* y *Rahnella*, con sus diferentes variedades, que más adelante se destaca la importancia ambiental y biotecnológica que por sus especificaciones descritas en la biblioteca de la NCBI, merecen ser descritas y que se muestran en la Tabla 19.

La importancia de la identificación de los microorganismos no es solo conocer su nombre sino la aplicación que se puede dar posterior a este informe de tesis, como es el caso de algunos microorganismos que se localizan en la parte media de la columna del material de empaque de los biofiltros aireados (BF3) en la asociación de organismos nitrificantes-desnitrificantes *Stenotrophomonas* sp. y *Chryseobacterium indologenes*, junto con *Pseudomona putida* quienes son organismos necesarios especializados para lograr una eficiencia de remoción de compuestos orgánicos nitrogenados en los procesos de tratamiento de aguas residuales y que a través de proceso biotecnológicos se puede logra su producción masiva.

Otra aplicación biotecnológica sería la producción de compuestos antimicrobianos a través de las cepas de *Rahnella* sp. (organismo nitrificante) y *Pseudomonas protegens* (aerobio) quienes potencialmente están identificados como agentes de control antimicrobiano de plantas (Remette et al., 2011).

Tabla 19 Lista de microorganismos presuntivos en la fracción cultivable y amplificados con el gen 16S rRNA encontrados en la biopelícula de los biofiltros empacados con fibra de agave y que pertenecen al *phylum Protobacteria*.

Clave de la cepa	Microorganismo presuntivo	Máximo % de identidad	Sitio donde se aisló y la publicación
3BT1	<i>Pseudomona</i> sp. AM989292	99	Asociacion con filósfera (Behrndt et al., 2003)
3M1	<i>P. protegens</i> AJ417073	99	Produce antimicrobianos para biocontrol de plantas (Remette et al., 2011)
3M2	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> AJ704543	99	No publicado
3M4	<i>Chryseobacterium indologenes</i> HQ259684	98	Desnitrificante en reactor anoxico removedor de fosfatos
3M5	<i>P. putida</i> HQ587188	99	Alta capacida de remoción de fosforo no hay publicacion
3M8	<i>Pandorea sputorum</i> NR_028751	99	Suelo y pacientes con esputo con fibreosis quistica (Coenye et al., 2000)
3M9	<i>P. fluorescens</i> GU198119	99	Agua de río/no publicado
3MO3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> FJ888386	99	Precurso de fiebre porcina/no hay publicación
3MT1	<i>P. aeuroginosa</i> DQ683361	99	No publicado
3MT2	<i>Stenotrophomonas</i> sp. JQ925936	99	Transforma amonio a nitratos/No hay publicación
3S3	<i>P. mororei</i> FM955889	99	Glaciares, no hay publicación
4B6	<i>P. fraji</i> NR024946	100	No publicado
4BT3	<i>P. poae</i> NR028986	99	(Behrndt et al., 2003)
1	<i>P. reactans</i> GQ354528	99	Coloniza las raíces en trigo, no hay publicación
5FO2	<i>Rahnella</i> sp. JQ522978	97	Agente control antimicrobiano, no hay publicación
5FO3	<i>Rahnella</i> sp. JQ522978	98	Agente control microbiano no hay publicación
E21	<i>P poae</i> AB495132	100	Cultivos hidroponicos/(Tani et al., 2011)
E22	<i>P poae</i> N_R028986	99	CULTivos hidroponicos/(Behrndt et al., 2003)
E24	<i>P. fragi</i> NR_024946	99	No publicado

Clave de identificación: primer no. 3 = BF con aire y 4= BF sin aire; S= superior; B= bajo; S= superior O=nitrificante; T= anaerobio; último no.3= No. Amplicon.

Una vez identificados los microorganismos con el apoyo de los árboles filogenéticos, se hace un análisis de la posición que guardan en la columna del biofiltro y en la Tabla 20 se enlistan los que pertenecen a los biofiltros con aire y en la tabla 21 los microorganismos de los biofiltros sin aire.

Tabla 20 Microorganismos clasificados según la posición en la columna del biofiltro con aire.

Posición en el biofiltro	Cepa	Microorganismo	Tipo de microorganismo	Phylum
Media	3M1	<i>Pseudomonas protegens</i> AJ417073	Aerobios	Protobacteria
	3M2	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> AJ704543	Desnitrificante	Protobacteria
	3M4	<i>Chryseobacterium indologenes</i> HQ259684	Desnitrificante	Bacteriodetes
	3M5	<i>P. putida</i> HQ587188	Aerobios	Protobacteria
	3M8	<i>Pandorea sputorum</i> NR_028751	Desnitrificante	Protobacteria
	3M9	<i>P. fluorescens</i> GU198119	Aerobios	Protobacteria
	3MO3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> FJ888386	Nitrificante	Protobacteria
	3MT1	<i>P. aeuroginosa</i> DQ683361	Anaerobio	Protobacteria
	3MT2	<i>Stenotrophomonas</i> sp JQ925936	Anaerobio	Protobacteria
	3M4	<i>Chryseobacterium joostei</i> AY468479	Desnitrificante	Bacteriodetes
Baja	3M2	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i> AJ704543	Desnitrificante	Bacteriodetes
	3BO3	<i>Cellulomonas hominis</i> HE801269	Desnitrificante	Actinobacteria
	32	<i>Arthrobacter</i> sp. FJ378036	Desnitrificante	Actinobacteria
	3BT1	<i>Pseudomona</i> sp. AM989292	Anaerobio	Protobacteria

Clave de identificación: primer no. 3 = BF con aire; S= superior; B= bajo; S= superior O=nitrificante; T= anaerobio; último no.3= No. Amplicon.

Tabla 21 Microorganismos clasificados según la posición en la columna del biofiltro sin aire.

Posición en el biofiltro	Cepa	Microorganismo	Tipo de microorganismo	Phylum
Superior	4S1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Aerobios	<i>Protobacteria</i>
	4S5	<i>Pseudomonas putida</i>	Aerobios	<i>Protobacteria</i>
	4S6	<i>Pseudomonas</i> sp.	Aerobios	<i>Protobacteria</i>
	4S10	<i>Buttiauxella</i> sp.	Aerobios	<i>Protobacteria</i>
	4S11	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aerobios	<i>Protobacteria</i>
Media	4MN4	<i>Bacillus licheniformis</i> HM753626	Desnitrificantes	<i>Firmicutes</i>
	4MN2	<i>B. licheniformis</i> JN391533	Desnitrificantes	<i>Firmicutes</i>
	4MN3	<i>Bacillus subtilis</i> AY881638	Desnitrificantes	<i>Firmicutes</i>
	4MO2	<i>B. circulans</i> NR042726	Nitrificantes	<i>Firmicutes</i>
Baja	4BN1	<i>Rahnella</i> sp.	Desnitrificantes	<i>Protobacteria</i>

Clave de identificación: primer no. 4= BF sin aire; S= superior; B= bajo; S= superior O=nitrificante;N= desnitrificante; último no.3= No. Amplicon.

4.9 Identificación de componentes de la población bacteriológica a través de la DGGE-PCR con ampliación del gen 16S rRNA en muestras de los biofiltros orgánicos.

En la Figura 29 se observa la presencia del ADN puro de algunas muestras obtenidas a través de la extracción con la técnica Hoffman y Winston (1987) que se van a amplificar con el gen 16S rRNA con la PCR-DGGE.

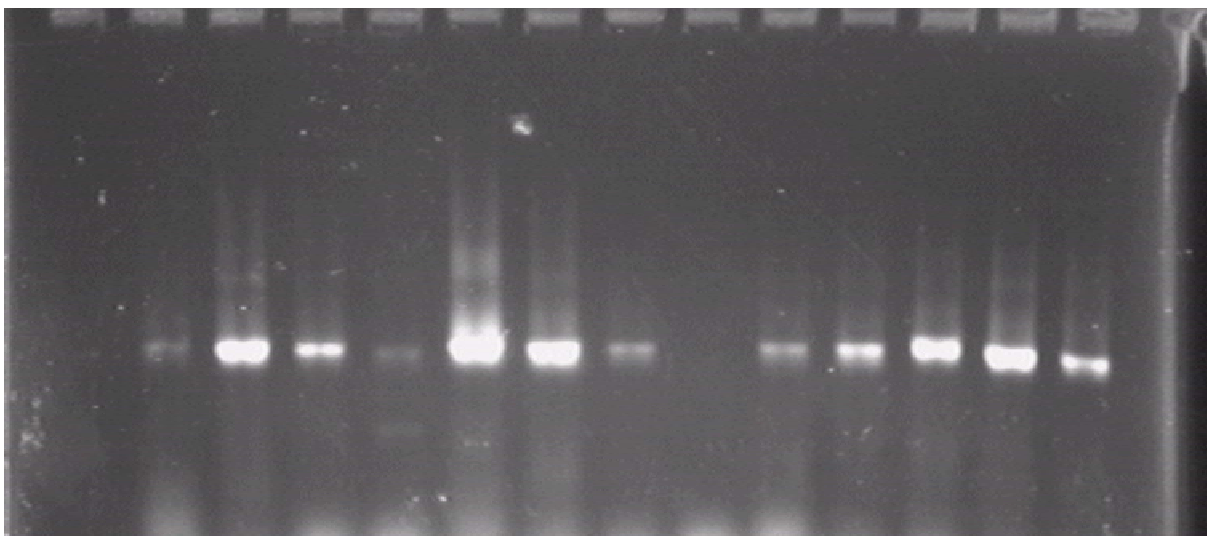


Figura 28 Presencia de ADN puro en las muestras extraídas de la biopelícula para la DGGE.

Se observa que la concentración de ADN en cada muestra es diferente y en esta etapa, antes de amplificarlas, se buscó la dilución adecuada para obtener los resultados en la amplificación.

4.9.1 Técnica de la DGGE

En la Figura 30 se observa el corrimiento de la prueba de la DGGE con 21 muestras obtenidas de las tres posiciones de cada biofiltro empacado con fibra de agave.

En cada pozo del gel desnaturalizado se observa una gran cantidad de bandas que pertenecen a diferente tipo de microorganismos. Para el recorte de bandas se eligieron las que tuvieron mayor concentración de ADN pero que para el análisis final de identificación del microorganismo se hará a través de un análisis exhaustivo con lo que se podrá definir con mayor precisión cada uno de ellos, lo cual forma parte de un trabajo de refinación no contemplado en este trabajo.

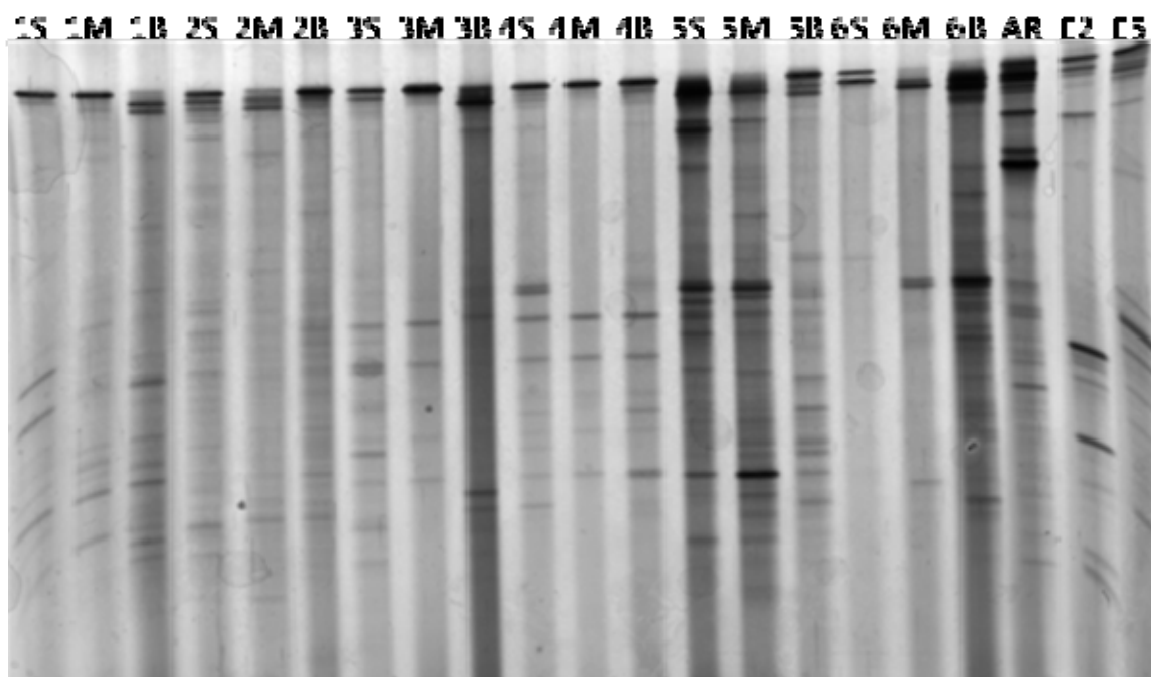


Figura 29 Imagen de las bandas obtenidas 21 muestras con la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizado.

En la Figura 31 se observa el recorte de las bandas, de donde se obtuvieron 60 bandas las que posteriormente fueron amplificadas con el gen 16S rRNA con la PCR y purificadas para finalmente secuenciarlas.

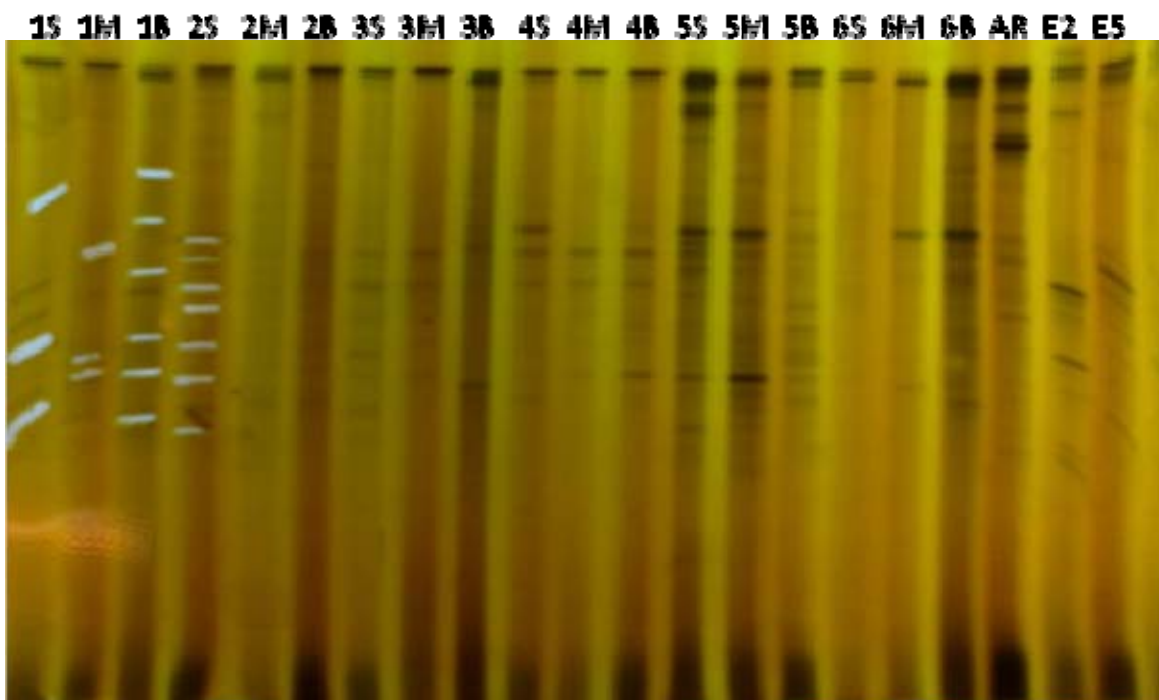


Figura 30 Recorte de bandas del gel desnaturalizado en la técnica de la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizado.

Después de la secuenciación y amplificaciones de gen 16S rRNA de las muestras aisladas en cada banda y analizadas en bibliotecas de la NCBI, finalmente se obtuvieron 43 amplicones por la técnica PCR-DGGE. 24 muestras pertenecen a los biofiltros aireados, 16 a los BFs sin aire y 3 a la muestra de agua residual.

En la Tabla 22 y 23 se muestran los organismos que se obtuvieron con la prueba de la DGGE presentes en los biofiltros orgánicos aireados. En la Tabla 24 se enlistan los microorganismos de los biofiltros que operaron sin aire. En la sección de material y métodos se mencionó el por qué no hay igual número de bandas para cada sitio del biofiltro.

Tabla 22 Listado de microorganismos presentes en las ampliaciones del gen 16S rRNA aisladas de la biopelícula de los biofiltros orgánicos con aire con la técnica de la DGGE.

Cepa	Microorganismo	Sitio de aislamiento	Referencias	Phylum	% identidad
1S2	<i>Staphylococcus xilosus</i> HQ238663	Barro de tanques productores de licores	No hay publicación	Firmicutes	100
1S3	<i>Staphylococcus aureus</i> JN390832	Garganta	No hay publicación	Firmicutes	95
2S3	<i>Bacillus senegalensis</i> AB110415	Degrada fenol anaerobia en sedimentos de ríos	No hay publicación	Firmicutes	99
2S5	<i>Clostridium magnum</i> GU129927	Tratamiento anaerobio de paja podrida	No hay publicación	Firmicutes	98
2S5	<i>Clostridium aciditolerans</i> NR_043557	Sedimento de wetlands con aguas ácido sulfatadas	Lee et al.(2007)	Firmicutes	98
3S1	<i>Staphylococcus</i> sp.GU595344	Suelos pobres de nutrientes	No hay publicación	Firmicutes	93
3S2	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i> AF322002	Heridas y sangre en humanos	Trülsch et al., 2002)	Firmicutes	93
3S2	<i>Staphylococcus pseudolugdunensis</i> EF053371	Estudios microbiológicos clínicos	Tang et al., 2008	Firmicutes	93
3S3	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i> DQ538519	Heridas y sangre en humanos	No hay publicación	Firmicutes	94
3S4	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i> AF322002	Heridas y sangre en humanos	Trülsch et al., 2002)	Firmicutes	89
3S5	<i>Bacillus pocheonensis</i> FN870348	Sedimentos ácidos bacteria cicladora deFe	Gischkat et al., 2010	Firmicutes	84
1M3	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i> AF322002	En heridas infectadas	No publicado Trülsch et al. (2002)	Firmicutes	98
3M1	<i>Staphylococcus gallinarum</i> JQ409528	No hay información	No hay publicación	Firmicutes	99
3M2	<i>Staphylococcus gallinarum</i> AB727358	No hay información	No hay publicación	Firmicutes	86
3M3	<i>Staphylococcus</i> sp.JF513164	En suelo, tolerante a sales	No hay publicación	Firmicutes	
3M4	<i>Staphylococcus gallinarum</i> JQ409528	No hay información	No hay publicación	Firmicutes	99
2B1	<i>Staphylococcus aureus</i> GU213356	Humanos	No hay publicación	Firmicutes	98
2B2	<i>Staphylococcus</i> sp. JQ687114	Agua de mar	No hay publicación	Firmicutes	97
2B3	<i>Staphylococcus aureus</i> JQ726637	Fermentaciones	No hay publicación	Firmicutes	99

Tabla 23 Listado de microorganismos presentes en las ampliaciones del gen 16S rRNA aisladas de la biopelícula de los biofiltros orgánicos con aire con la técnica de la DGGE.

Cepa	Microorganismo	Sitio de aislamiento	Referencias	Phylum	% identidad
2B4	<i>Staphylococcus gallinarum</i> JQ409528	No hay reporte	No hay publicación	Firmicutes	96
2B5	<i>Staphylococcus aureus</i> JQ975911	No hay reporte	No hay publicación	Firmicutes	95
2B6	<i>Staphylococcus aureus</i> JN175374	Piel humana sana	No hay publicación	Firmicutes	94
2B7	<i>Staphylococcus aureus</i> JN315150	Torundas de la boca con faringitis	No hay publicación	Firmicutes	97
AR7	<i>Flavobacterium</i> sp. HQ675251	Fija carbon inorgánico en aguas profundas	Swan et al. (2011)	Bacterioidetes	82

B= Bajo; AR=agua residual

De los 24 amplificados obtenidos de los biofiltros con aire, 11 ejemplares se localizaron en la parte superior de los biofiltros, 6 en la parte media y 7 en la parte baja. De los primeros, 6 revisten importancia ambiental y biotecnológica como es el caso de *Bacillus senegalensis* que tiene aplicaciones en la degradación de fenoles en aguas de río por lo que su aplicación tiene una expectativa en el tratamiento de aguas residuales industriales que tienen como desecho este tipo de compuestos.

En cuanto a *Clostridium magnum* es un amplificado que tiene una aplicación sobre la degradación de compuestos celololíticos por lo que explotación biotecnológica es de considerarse para otros estudios de investigación. Con *Bacillus pocheonensis* este amplificado tiene la capacidad de oxidar el fierro en aguas ácidas, por lo que su aplicación en aguas residuales de la industria minera tiene un potencial digno de tomarse en cuenta.

Por la complejidad de la materia orgánica presente en las aguas residuales es común la presencia de bacterias infecciosas, que en un momento dado podría inferirse que las aguas residuales de unidades hospitalarias o de rastros están siendo vertidas al

sistema de alcantarillado de la ciudad de Durango y que las autoridades responsables deben hacer vigilancia para evitar estas descargas.

Tabla 24 Listado de microorganismos presentes en las ampliaciones del gen 16S rRNA aisladas de la biopelícula de los biofiltros orgánicos sin aire con la técnica de la DGGE.

Cepa	Microorganismo	Sitio de aislamiento	Referencias	Phylum	% identidad
4S1	<i>Pseudomonas putida</i> JQ995481	Tratamiento terciario de aguas residuales	No hay publicación	<i>Protobacteria</i>	100
4S2	<i>Bacillus anthracis</i> JF975598	Degrada compuestos Azo	No hay publicación	<i>Firmicutes</i>	100
4S2	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> CP000774	Degrada surfactantes lineales	Schleheck et al. (2000)	<i>Alfaprotobacteria</i>	89
4S6	<i>Bosea vestrisii</i> JQ689184	Aguas minerales embotelladas	No hay publicación	<i>Alfaprotobacteria</i>	91
5S6	<i>Bacteroidetes bacterium</i> JF488161	Degrada de polisacáridos para aplicar en producción de biocombustibles y bioremediación	Martínez-García et al. (2012)	<i>Bacteriodetes</i>	85
4M7	<i>Methylosinus</i> sp. AB007840	Degrada metano	No hay publicación	<i>Alfaprotobacteria</i>	90
5M10	<i>Methyloferula stellata</i> FR686345	Turbas ácidas	Vorobev et al. (2011)	<i>Alfaprotobacteria</i>	91
5M2	<i>Staphylococcus</i> sp. GU595344	Suelos pobres de nutrientes	No hay publicación	<i>Firmicutes</i>	89
5M4	<i>Salinisphaeraeae bacterium</i> GU452538	Agua salada degradadora de alcanos	No hay publicación	<i>Protobacteria</i>	89
5M6	<i>Labrys</i> sp. HM149537	Suelo degrada insecticidas	No hay publicación	<i>Epsilonprotobacteria</i>	81
5M7	<i>Parvibaculum</i> sp. FN430653	Reductor de nitratos	Blöthe y Roden, (2009)	<i>Epsilonprotobacteria</i>	96
5M8	<i>Methylocapsa palustris</i> AJ563927	Fija nitrógeno atmosférico	Dedysh et al. (2004)	<i>Alfaprotobacteria</i>	99
5M9	<i>Dongia mobilis</i> FJ45532	Tratamiento de aguas residuales	Liu et al. (2010)	<i>Alfaprotobacteria</i>	94
5B3	<i>Ornithinibacillus</i> sp. HQ433455	Agua salada	No hay publicación	<i>Firmicutes</i>	90
6B3	<i>Glycomyces</i> sp. JQ901958	Suelo extremadamente haloalcalinos	No hay publicación	<i>Actinobacteria</i>	91
6B4	<i>Sulfurospirillum</i> sp. AY135396	Biofiltros aerobios reductor de sulfatos	Hubert et al., 2003	<i>Epsilonprotobacteria</i>	93
AR3	<i>Macellibacteroides fermentans</i> HQ020488	Aguas residuales en reactor anaerobio	Jabari et al., 2011	<i>Bacteriodetes</i>	99
AR4	<i>Chryseobacterium</i> sp. EF204452	Proteolíticas en leche cruda	Hantsis y Halpern, (2007)	<i>Bacteriodetes</i>	90

La discusión del contenido de los microorganismos resulta muy interesante desde cualquier punto de vista que se quiera abordar y que por lo tanto será complejo abarcar al máximo. El 60% de los amplificados tiene un máximo porcentaje del 95% de identidad por lo que muchas de las cualidades de microorganismos encontradas en las bibliotecas de la NCBI, predicen que se tiene un potencial biotecnológico y científico para desarrollar futuros proyectos. En los amplificados de los biofiltros sin aire tienen el mayor potencial ambiental y biotecnológico que los biofiltros aireados. Destaca que ningún amplificado en los biofiltros sin aire tenga cualidades del área de la salud.

Todos los amplicones de los biofiltros sin aire en la prueba de la DGGE tienen una aplicación de eventos de interés ambientales y biotecnológico como su aplicación en tratamiento de aguas residuales con colorantes ya que son degradadores de compuestos Azo, en el tratamiento terciario de aguas residuales, degradadores de detergentes, celulosa, metano, fijadores de nitrógeno, reductor de sulfatos, reductor de nitratos, degradador de insecticidas, degradador de polisacáridos para producción de biocombustibles y de hidrocarburos para biorremediación de suelos contaminados, entre muchos.

En cuanto a la eficiencia de remoción de los diferentes contaminantes en los biofiltros empacados con fibra de agave y la presencia de estos microorganismos no se puede inferir su presencia sobre este aspecto debido a que las muestras fueron analizadas en la última etapa del estudio con una carga hidráulica superficial de $1.34 \text{ m}^3\text{m}^{-2}\text{d}^{-1}$, donde los efectos de los esfuerzos cortantes hidrodinámicos están afectando la estabilidad de la biopelícula que se ve reflejado en la baja eficiencia de remoción de DBO_5 y coliformes fecales (Cohen, 2002).

V. Sugerencias y recomendaciones

Estudiar el efecto flujo de aire cuando menos con tres flujos diferentes y monitorearlo en los sitios de muestreo de la biopelícula.

Determinar la comunidad bacteriana después del proceso de adaptación de los biofiltros y al final de cada carga hidráulica superficial para establecer la dinámica del desarrollo de la biopelícula.

Determinar la eficiencia del proceso de nitrificación-desnitrificación en las dos series de biofiltros orgánicos midiendo la concentración de nitratos, amonio y gas nitrógeno.

Hacer un tratamiento combinado de las aguas residuales en serie de un proceso de biofiltración aire-sin aire y/o al inverso para evaluar la calidad del efluente.

Hacer mediciones de los componentes de la materia orgánica en los tres puntos de referencia para determinar cual es la altura efectiva de la columna empacada para optimizar el proceso.

Identificar con mayor precisión los amplificadores con el gen 16S rRNA aislados en las diferentes secciones de los biofiltros con técnicas más precisas que coadyuven a este logro.

Desarrollar proyectos de biotecnología con algunos amplificadores que vayan en beneficio de ambientes contaminados.

Rescatar los amplificadores que no dieron respuesta con los software con otros más potentes.

VI. Conclusiones

Las eficiencias de remoción de los biofiltros con aire y sin are fueron estadísticamente significativos. Temperaturas entre 27 a 30°C favorecen la remoción de los constituyentes medidos. Los platos de separación ayudaron a mantener estable la fibra de agave como material soporte por largos periodos de tiempo manteniendo la presión sin variación durante el periodo experimental de 17 meses, y el efecto de los platos de separación probablemente requiera más tiempo para probar su hipótesis. Los biofiltros empacados con fibra de agave tuvieron una alta eficiencia en la remoción de la DBO_5 para cargas hidráulicas superficiales de hasta $0.80 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, y los efluentes cumplieron con las normas internacionales (USA-EPA 2004) y la norma mexicana (DOF 1998) para riego agrícola y de áreas verdes. Los huevos de helminto y los sólidos suspendidos totales cumplieron con la calidad de los estándares de calidad hasta $1.34 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de carga hidráulica superficial. La innovación de emplear fibra de agave como soporte de la biopelícula es una alternativa eficiente, simple y económica para el tratamiento de aguas residuales domesticas y municipales de pequeños generadores, y los efluentes pueden ser utilizados en proyectos de irrigación agrícola y de áreas verdes, así también pueden ser vertidos en lagos artificiales, previo tratamiento de desinfección.

La identificación de la comunidad microbiana de los biofiltros empacados con fibra de agave se logró con la amplificación de los aislados con la PCR-DGGE utilizando como iniciador el gen 16S rRNA que son las herramientas molecular que permite la identificación de los microorganismos sin realizar cultivos. Se identificaron 29 amplificados aislados de la fracción cultivable y 43 con la DGGE-PCR pertenecientes al *Phylum Protobacteria* (alfa, gamma y beta), *Actinobacteria*, *Bacteriodetes* y *Firmicutes*. Algunos amplificados poseen especificidad sobre degradación de compuestos celulolíticos, hidrocarburos, insecticidas, alcanos, sulfatos, metano, nitratos y fosfatos a partir de los cuales se pueden desarrollar proyectos

biotecnológicos para resolver problemas ambientales en las matrices agua, suelo y aire.

Agradecimientos:

A mi *alma mater*, el Instituto Politécnico Nacional quien a través de la COTEPABE tuve el apoyo para realizar este trabajo de investigación (2009-2012) y a la COFAA-IPN por el apoyo de la beca por Exclusividad en el periodo 2009-2011.

Al CIIDIR IPN Unidad Durango quien a través del Laboratorio de Ciencias Ambientales se me permitió realizar la mayoría de las técnicas fisicoquímicas y biológicas.

Al Dr. César Hugo Hernández Rodríguez; Jefe del Laboratorio de Microbiología de la ENCB-IPN, por el apoyo incondicional con material, equipo y financiamiento de la secuenciación de 180 muestras derivadas de las técnicas moleculares para la identificación de la comunidad bacteriana

VII. Bibliografía

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation de protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.

APHA, AWWA, and WEF. 1995. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 19TH Edition. Washington, USA.

Behrendt U, Ulrich A, Schumann P. 2003. Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**(5):1461-9.

Bernardet JF, Vancanneyt M, Matte-Tailliez O, Grisez L, Tailliez P, Bizet C, Nowakowski M, Kerouault B, Swings J. 2005 .Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. *Syst Appl Microbiol* **28**(7):640-60.

Bomo Anne-Marie; Tor KristianStevik; IneHovi and Jon Fredrik Hanssen 2004. Bacterial Removal and Protozoan Grazing in Biological Sand Filters. *J. Environ. Qual.* **33**:1041–1047.

Borin S., Marzorati M., Brusetti L., Zilli M., Cherif H., Hassen A., Converti A., Sorlini C. and Daffonchio D. 2006.Microbial succession in a compost-packed biofilter treating benzene-contaminated air. *Biodegradation*. DOI 10.1007/s10532-005-7565-5

Brown J.M., Frazier R.P., Morey R.E., Steigerwalt A.G., Pellegrini G.J., Daneshvar M.I., Hollis D.G., McNeil M.M. 2005. Phenotypic and genetic characterization of clinical isolates of CDC coryneform group A-3: proposal of a new species of *Cellulomonas*, *Cellulomonas denverensis* sp. nov. *J Clin Microbiol* **43**(4):1732-7.

Buelna G. and G. Belángier. 1991. Peat-based biofiltración for small municipalities wastewater treatment. *Sciences et Techniques de Leau* **23**:259-264.

Buelna, G. 1994. La biofiltración en lecho orgánico: Una novedosa alternativa para el tratamiento de efluentes industriales y pequeños municipios. *II Congreso y Exposición Internacional de la Industria del Medio Ambiente*. México–Canadá–Estados Unidos, México D.F., 13 al 15 de abril.

Buelna, G., Garzón-Zúñiga M.A., Moeller-Chávez G. 2011. Los biofiltros de empaque orgánico: una alternativa simple, robusta y eficiente para el tratamiento de aguas residuales en zonas rurales., *Ide@s CONCYTEG*, **6** (71), pp. 541-552.

Chandravathanam S., Murthy D.V.S. 1999. Studies in nitrification of municipal sewage in an upflow biofilter. *Bioprocess Engineering* **21**: 117 -122

Chaudhary D.; S. Vigneswaran†; Huu-Hao Ngo; Wang Geun Shim and Hee Moon. (2003). Biofilter in Water and Wastewater Treatment. *Korean J. Chem. Eng.*, **20**(6), 1054-1065.

Coenye T, Falsen E, Hoste B, Ohlén M, Goris J, Govan JR, Gillis M, Vandamme P. 2000. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50** (2):887-99.

Cohen Y. 2001. Biofiltration –the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material. A review. *Bioresource Technol.* **77**, 257-274.

Corley M, Rodgers M, Mulqueen J, Clifford E. 2006. The performance of fibrous peat biofilters in treating domestic strength wastewater. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* **41**(5):811-24.

Crites R., Tchobanoglous G. 1998. *Small and Decentralized Wastewater Management Systems*. Mc Graw Hill. USA.

D.O.F. (1997). NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. México.

D.O.F. (1998). NOM-003-SEMARNAT-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público. México

Das Neves M.L.C, TaemiMiazaki T., Miyamura O., Moraes D.A., VessoniPenna T.C., Converti A. 2006. Biofiltration Methods for the Removal of Phenolic Residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **129–132**: 130-152.

Datta I., Allen, D. G. 2005. Biofilter Technology. Chapter 6 from: *Biotechnology for Odor and Air Pollution Control*. Shareefdeen/Singh (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 125-145.

Dedysh S.N., Ricke P., Liesack W. 2004. NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology* 150(Pt 5):1301-13.

Dorado A.D., Lafuente F.J., Gabriel D., Gamisans X. 2010. A comparative study based on physical characteristics of suitable packing material in biofiltration. *Environmental Technology* 31 (2): 193-204.

Dowd S.E., Sun Y., Secor P.R., Rhoads D.D., Wolcott B.M., James G.A., and Wolcott R.D. 2008. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiology* 2008, 8:43 doi:10.1186/1471-2180-8-43.

Ebie Y., Noda N., Miura H., Matsumura, M., Tsuneda S., Hirata A., Inamor Y. 2004. Comparative analysis of genetic diversity and expression of *amoA* in wastewater treatment processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64** (5):740-744.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.

Feng G.D., Deng MR, Zhu H.H., Guo J., Zhang X., Zhu C.X., Liang H.L. 2010. Microbial source tracking of water fecal pollution: a review. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* (12):3273-81.

Fernández N., Díaz E.E., Amils R., Sanz J.L. 2008. Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment Reactor. *Microb Ecol* **56**:121–132.

Gabriel, D., and M. A. Deshusses M. A. 2003. Retrofitting existing chemical scrubbers to biotrickling filters for H₂S emission control. *PNAS*, **100**(11): 6308–6312.

Gálvez, J.M., Gómez, M.A., Hontoria E., González-López J. 2003. Influence of hydraulic loading and air flowrate on urban wastewater nitrogen removal with a submerged fixed-film reactor. *Jour. Hazard. Mater.* **101**:219–229.

Garbeva P., van Overbeek L.S., van Vuurde J.W.L., van Elsas J.D. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microb Ecol* **41**:369-383.

Garzón Zúñiga M. A. y Moeller G. 2007. Nueva tecnología sustentable para tratar las aguas residuales. *Gaceta IMTA*, (7). México.

Garzón Zúñiga M., Lessard P., Aubry G., Buelna G. 2005. Nitrogen elimination mechanisms in an organic media aerated biofilter treating pig manure. *Environmental technol.* **26**; 361-371.

Garzón Zúñiga M.A.; Lessard P., Buelna G. 2003. Determination of the hydraulic residence time in a trickling biofilter filled with organic matter. *Environmental Techol.* **24**; 605-614.

Garzón-Zúñiga M. A. and Buelna G. 2011 Treatment of wastewater from a school in a decentralized filtration system by percolation over organic packing media. *Water Sci Technol* **64** (5), 1169–1177.

Garzón-Zúñiga M.A., Lessard P., Aubry G. and Buelna G. 2007 Aeration effect on the efficiency of swine manure treatment in a filter packed with organic materials. *Water Sci. Technol.* **55**(10), 135-143.

Garzón-Zuñiga M.A., Tomasini-Ortíz A.C., Moeller-Chávez G., Hornelas-Urbe Y., Buelna G. and Mijaylova-Nacheva P. 2008 Enhanced pathogen removal in on-site biofiltración systems over organic filtration materials. *Water Practice and Technology.* **3**(2): 053

Gaudy AF and Gaudy E.T.1988. *Elements of Bioenvironmental Engineering.* Engineering Pres Inc. USA.

Giusto C., D. Medrala, G. Comi, M. Manzano 2007. Application of PCR-DGGE for the identification of lactic acid bacteria in active dry wine yeasts. *Annals of Microbiology,* **57** (1) 137-141

Gorakshakar A.C., Pawar A.R., Nadkarni A.H., Lu C.Y., Mohanty D., Krishnamoorthy R., Besmond C., and Colah R.B. 1999. Potential of denaturing gradient gel electrophoresis for scanning of b-thalassemia mutations in India. *American Journal of Hematology* **61**:120–125

Goregues C.M., Michotey V.D., Bonin P.C 2005. Molecular, biochemical, and physiological approaches for understanding the ecology of denitrification. *Microbial Ecology* **49**, (2):198-208.

Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**:95–98.

Henckel T., Roslev P. and Conrad R. 2000. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environmental Microbiology* **2**(6), 666±679

Hoffman CS, Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. **57**:267–272.

Hoyles L., Honda H., Logan N.A., Halket G., La Ragione R.M., McCartney A.L. 2012. Recognition of greater diversity of *Bacillus* species and related bacteria in human faeces. *Res Microbiol*. **163**(1):3-13.

Hu Z. and Gagnon G. A., 2006. Impact of filter media on the performance of full-scale recirculating biofilters for treating multi-residential wastewater. *Water Res*. **40**, 1474-1480.

Huang L.N., De Wever H., Diels L. 2008. Diverse and distinct bacterial communities induced biofilm fouling in membrane bioreactors operated under different conditions. *Environ Sci Technol* **42**(22):8360-6.

Hubert C, Nemati M, Jenneman G, Voordouw G. 2003. Containment of biogenic sulfide production in continuous up-flow packed-bed bioreactors with nitrate or nitrite. *Biotechnol Prog* **19**(2):338-45.

Ilhan Z. E., Ong S.K., Moorman T.B. 2011. Herbicide and antibiotic removal by woodchip denitrifications filters: sorption process. *Water Air Soil Poll* DOI 10.1007/s11270-011-1057-5.

Ito T., Okabe S., Satoh H., Watanabe Y. 2002. Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Appl Environ Microbiol*. **68**(3):1392-402.

Jabari L., Gannoun H., Cayol J.L., Hedi A., Sakamoto M., Falsen E., Ohkuma M., Hamdi M., Fauque G., Ollivier B, Fardeau ML. 2011. *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. *Int J Syst Evol Microbiol*. **16**.
[En prensa]

Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **23**:403–405

Kennes C., Veiga M.C. 2002. Inert filter media for the biofiltration of waste gases – characteristics and biomass control. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology* **1**: 201–214.

Krishnakumar B.; Hima A. M. and AjitHaridas. 2007. Biofiltration of toluene-contaminated air using an agro by-product-based filter bed. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**:215–220.

Kundu K., Sharma S., Sreekrishnan T.R. 2012. Effect of operating temperatures on the microbial community profiles in a high cell density hybrid anaerobic bioreactor. *Bioresour Technol* **18**:502-511.

Lens P.N., Vochten P.M., Spelleers L. and Verstraete W. H. 1994. Direct treatment of domestic wastewater by percolation over peat, bark and woodchips. *Water Res* **28**(1), 17-26.

Li C., Moe W. M. 2004. Assessment of microbial populations in methyl ethyl ketone degrading biofilters by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**: 568–575.

Li M., Hong Y., Klotz G.M., Gu J.D. 2010. A comparison of primer sets for detecting 16S RNA and hydrazine oxidoreductase genes of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in marine sediments. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**:781–790.

Li Y., Saxena D., Barnes V.M., Trivedi H.M., Ge Y., Xu T. 2006. Polymerase chain reaction-based denaturing gradient gel electrophoresis in the evaluation of oral microbiota. *Oral Microbiology Immunology* **21**: 333–339.

Liang R., Wu X., Dai Q., Jin D., Wang Y. 2010. Genetic diversity of phthalic acid esters-degrading bacteria isolated from different geographical regions of China. *Antonie Van Leeuwenhoek* **97**(1):79-89.

Liu F.H., Wang S.B., Zhang J.S., Zhang J., Yan X., Zhou H.K., Zhao G.P., Zhou Z.H. 2009. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* **106**:952–966

Lu S., Gischkat S., Reiche M., Akob D.M., Hallberg K.B., Küsel K. 2010. Ecophysiology of Fe-cycling bacteria in acidic sediments. *Appl Environ Microbiol.* **76**(24):8174-83.

Lydmark P., Almstrand R., Samuelsson K., Mattsson A., Sörensson F., Lindgren P.E., Hermansson M. 2007. Effects of environmental conditions on the nitrifying population dynamics in a pilot wastewater treatment plant. *Environ Microbiol.* (9):2220-33.

Makarevich, A. V.; Dunaitsev I. A. and L. S. Pinchuk (2000). Aerobic treatment of industrial wastewaters by biofilters with fibrous polymeric biomass carrier. *Bioprocess Engineering* **22**; 121-126.

Metcalf and Eddy, 1991. *Wastewater Engineering: Treatment, disposal and Reuse*. Third Edition. McGraw Hill. USA.

Middleton S. A., Anzenberger G. and Knapp L. A. 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) screening of clones prior to sequencing. *Molecular Ecology Notes* **4**, 776–778.

Morales-Jiménez J., Zúñiga G., Villa-Tanaca L., Hernández-Rodríguez C. 2009. Bacterial Community and Nitrogen Fixation in the Red Turpentine Beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: *Curculionidae*: *Scolytinae*). *Microb Ecol* **58**:879–891.

Mota C.R., So M.J., de los Reyes III F.L. 2012. Identification of nitrite-reducing bacteria using sequential mRNA fluorescence in situ hybridization and fluorescence-assisted cell sorting. *Microbial Ecology* **64**, (1):256-267

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993 Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16s RNA. *Appl Environ Microbiol* **59**:695–700.

Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **2**(3):317-22.

Okabe S., Naitoh H., Satoh H., Watanabe Y. 2002. Structure and function of nitrifying biofilms as determined by molecular techniques and the use of microelectrodes. *Water Sci Technol.*; **46**(1-2):233-41.

Peng L., HU Chaoqun, ZHANG Lüping, REN Chunhua, SHEN Qi. 2007. Effects of DNA extraction and universal primers on 16SrRNA gene-based DGGE analysis of a bacterial community from fish farming water. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* **25** (3): 310-316.

Peng Z. and Qi Z. 2007. Simultaneous nitrification and denitrification in activated sludge system under low oxygen concentration. *Front. Environ. Sci. Engin. China*, **1**(1): 49–52.

Porteous L.A., Seidler R.J., Watrud L.A. 1997. An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Molecular Ecology* **6**:787-791.

Powelson, D. K., Chanton, J.T., Morales A.J. 2006. Methane oxidation in water-spreading and compost biofilters. *Waste Manage Res*: **24**: 528–536.

Pujol R., Hamon H., Kandel X., Lemel H. 1994. Biofilters, flexible, reliable biological reactors. *Water Sci Technol* **29**:33–38.

QianYi Q., Xianghua W., Huang Xia H. 2007. Development and application of some renovated technologies for municipal wastewater treatment in China. *Front. Environ. Sci. Engin. China* **1**(1): 1–12.

Ramalho R.S. 1996. *Tratamiento de aguas residuales*. Ed. Reverte, S.A., Barcelona, España.

Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffaz C., Meyer J.M., Défago G., Sutra L., Moëgne-Loccoz Y. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst Appl Microbiol* **34**(3):180-8.

Reid M.N., Bowers T.H., Lloyd-Jones G. 2008. Bacterial community composition of a wastewater treatment system reliant on N₂ fixation. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**:285–292

Relman D.A. 1993. Universal bacterial 16S rRNA amplification and sequencing. *American Society of Microbiology*, Washington,DC, pp 489–495.

Riahi K, Mammou A.B., Thayer B.B. 2009. Date-palm fibers media filters as a potential technology for tertiary domestic wastewater treatment. *J Hazard Mater.* **161**(2-3):608-613.

Roelfsema J. H. and Peters D. J. M. 2009. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Chapter 8, From: *Molecular Biomethods Handbook, 2nd Edition*. Edited by: J. M. Walker and R. Rapley © Humana Press, Totowa, NJ

Sailing W.J.B., Westerman P.W., Losordo T.M. 2007. Wood chips and wheat straw as alternative biofilter media for denitrification reactors treating aquaculture and other wastewaters with high nitrate concentrations. *Aquaculture Engineering* **37**:222-233.

Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**:406-425.

Sanguinetti C.J., Dias-Neto E., Simpson A.J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotech.* **17**:915–919.

Sasaki K., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y. 2007. Microbial population in the biomass adhering to supporting material in a packed-bed reactor degrading organic solid waste. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**:941–952.

Schleheck D, Dong W, Denger K, Heinzle E, Cook AM. 2000. An alpha-proteobacterium converts linear alkylbenzenesulfonate surfactants into sulfophenylcarboxylates and linear alkyldiphenyletherdisulfonate surfactants into sulfodiphenylethercarboxylates. *Appl Environ Microbiol.* **66**(5):1911-6.

Schmidt D; Janni K. and Nicolai R. 2004. *Biofilter Design Information*. University of Minnesota. BAEU-18.

SEDECO 2008 Our mescal is Duranguense. Government of Durango, Mexico (Spanish). www.durango.gob.mx/file/7377. (Accessed 10 September 2010).

Song Y.C., Woo J.H., Sang Jo Kwon S.J., Koh S.C. 2006. Microbial Activity and Population Structure of Anaerobic Sludge Alternately Exposed to Mesophilic and Thermophilic Conditions. *KSCE Jour Civil Eng* 10(5):310-323.

Su C., Lei L., Duan Y., Zhang K.Q., Yang J. 2012. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol.*; **93**(3):993-1003.

Tajima F. and Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* **1**:269-285.

Tamura k., Peterson d., Peterson D., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**(10):2731–2739

Tani A., Akita M., Murase H., Kimbara K., 2011. Culturable bacteria in hydroponic cultures of moss *Racomitrium japonicum* and their potential as biofertilizers for moss production. *J Biosci Bioeng* **112**(1):32-9.

Thompson J.D., Gibson T.J.F., Higgins D.G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acid Res* **24**:4876-4882.

Thornhill D.J., Kemp D.W., Sampayo E.M., Schmidt G.W. (2010). Comparative analyses of amplicon migration behavior in differing denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) systems. *Coral Reefs* **29**:83–91.

USA-EPA. 2004 *Manual-Guidelines for water reuse*. EPA/625/R-04/108. U.S. Agency for International Development Washington, DC

Vanysacker L., Declerck S.A.J., Hellemans B., De Meester I., Vankelecom I., Declerck P. 2010. Bacterial community analysis of activated sludge: an evaluation of four commonly used DNA extraction methods. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**:299–307

Vorobev AV, Baani M, Doronina NV, Brady AL, Liesack W, Dunfield PF, Dedysh SN. 2012. *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium that possesses only a soluble methane monooxygenase. *Int J Syst Evol Microbiol*. **61**(10):2456-63.

Wagner M., A. Loy, R.Nogueira, U.Purkhold; N. Lee and H. Daims. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**(1-4), 665-680.

Wahman D.G., Katz L.E., Speitel G.E. 2011. Performance and biofilm activity of nitrifying biofilters removing trihalomethanes. *Water Res.* **45**:1669-1680.

Wang L.M., Chien I.C., Yuan S.L., Wu Y.J. 2009. Nitrifying community structures and nitrification performance of full-scale municipal and swine wastewater treatment plants. *Chemosphere* **75**(2):234-42.

Wick T. 2003. Trickling filters and biofilm reactor modeling. *Environmental Science and Bio/Technology* **2**:193–212.

Wilderer P. A., Arnz P., Arnold E. 2000. Application of biofilms and biofilm support materials as a temporary sink and source. *Water, Air, and Soil Pollution* **123**: 147–158.

Wuertz S., Okabe S., Hausner M. 2004. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. *Water Sci Technol* **49**(11-12):327-36.

Yoon C.G., Song-Bae Kim, Tae-Young Kwunand Kwang-Wook Jung. 2008. Development of natural and ecological wastewater treatment system for decentralized community in Korea. *Paddy and Water Environment* **10**.1007/s10333-008-0109-y.

Yunusov K.B. 2011. Improving ecological parameters of wastewater by integrating various cleaning methods. *Chemical and Petroleum Engineering* **47**(1–2):133-139.

Ziembińska A., Ciesielski S., Miksch K. 2009. Ammonia oxidizing bacteria community in activated sludge monitored by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *J Gen Appl Microbiol* **55**(5):373-80.

Citas de Internet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/320584221>, consultado el 22 junio de 2012.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/320584229>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/82940479>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/82940479>

VIII. Anexos

Anexo 1

Método de extracción de ADN cromosómico.

1. Se toman 250 mg de la muestra de fibra de agave y se pone en un microtubo Eppendorf de 1.5 mL y se adiciona 200 µL de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM; NaCl 10 mM; SDS 1% Tritón X-100 2%) para un rompimiento químico y se adiciona perlas de vidrio (0.5 g). para rompimiento mecánico. Estas deberán recuperarse al final del proceso de extracción. Posteriormente se adicionaron 200 µL de Fenol-cloroformo-isoamílico 25:24:1
2. La muestra se agita en un vortex durante 5 min. Hacer 5 repeticiones, dejando los tubos 1.0 minuto en hielo antes de volver a agitar.
3. Aplicar un choque térmico de 60°C durante 5 min y después mantenerlo en un ultracongelador a -70°C durante 5 min. Repetir por segunda ocasión. Se realizó el choque térmico en una incubadora térmica AccuBlock Digital Dry Bath, Labnet. Hacer un Spin de 1.0 min a 13 000 rpm.
4. Se adicionar 200 µL de regulador TE pH8. Centrifugar 10 min a 13 000 rpm
5. La fase acuosa se coloca en un tubo nuevo y se adiciona 200 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 Agitar en vortex 1.0 min y centrifugar 10 min a 13 000 rpm.
6. Separar la fracción acuosa a un nuevo tubo y adicionar 1.0 mL de alcohol isopropanol y dejar precipitar a -20°C durante toda la noche (12 horas).
7. Después de la incubación se centrifuga a 13,000 rpm durante 10 min.
- 8 Eliminar el sobrenadante y lavar con 1.0 mL de etanol al 70%. NO VORTEX

9. centrifugar durante 5 min y eliminar el sobrenadante. Dar un spin. Evaporar en un concentrador a 45°C de 15 a 20 min.

10 Resuspender la pastilla en 50 µL de agua estéril de alta pureza. Homogenizar.

En adelante la manipulación de las muestras con el ADN extraído deberán permanecer en hielo.

Notas a la técnica.

Las muestras (Ms) que contienen fibra de agave se preservan en hielo y se transportan al laboratorio.

Las Ms se toman con pinzas esterilizadas procurando reducir el tamaño sea lo más pequeña posible utilizando tijeras esterilizadas colocándolas en un tubo de plástico de 1.5 mL.

Observaciones:- *Las Ms en adelante se ponen en hielo inmediatamente después de prepararlas.*

Se adiciona una cantidad “prudente” de microperlas de vidrio.

A las Ms se le adiciona 200 µL de Solución de Lisis y 200 µL de una solución de Fenol:Cloroformo:Isoamílico 25:24:1

Observaciones:- *Es conveniente calentar el baño seco a 60°C después del paso 1, ya que tarda en alcanzar la temperatura deseada.*

Las Ms se agitan 5 veces por 1.0 min en el Vortex.

Se hace un choque térmico calentando 5 min a 60°C. Se sacan del baño seco y se meten al Ultracongelador durante 5 min a -70°C. Repetir nuevamente el choque térmico.

Se les dá un Spin a los tubos. (consiste en meterlos a la centrifuga hasta que alcance la máxima velocidad de 13 000 ó 14000 rpm y parar manualmente la centrifuga)

Adicionar 200 μ L de solución TE pH8.

Centrifugar 10 min a 12000 rpm.

Pasar la fase acuosa (Es la que se encuentra en la parte superior) a un nuevo tubo y rotular.

Observaciones:- *es muy importante cuidar no arrastrar la fase más pesada ya que el fenol interfiere en el éxito del resultado final.*

Adicionar 200 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Agitar con vortex.

Centrifugar 10 min a 12000 rpm. Separar la fracción acuosa a nuevo tubo y rotularlo.

Adicionar 1.0 mL de alcohol Isopropanol y se deja precipitar a -20°C mínimo 2 horas o toda la noche no se alcanza a continuar con la rutina.

Centrifugar 5 min a 12000 rpm. Eliminar el sobrenadante.

Adicionar 1.0 mL de Etanol al 70% (para lavar).

Centrifugar 5 min a 12000 rpm. Eliminar el sobrenadante.

Dar un Spin. Vaciar el exceso con la micropipeta. Dejar evaporar de 15 a 20 min.

Adicionar 50 μ L de H₂O estéril. Homogenizar. Poner en hielo las muestras. Vortex.

Centrifugar 5 min a 14 000 rpm

Después de este procedimiento ya se tiene la extracción del ADN. Para comprobar su presencia se corre un proceso de electroforesis empleando gel de agarosa.

ANEXO 2

Preparación del gel de agarosa al 1.5%

Pesar 1.5 g de agarosa y disolver en la Solución de TAE 1X. Fundir la agarosa en el microondas durante 45 a 60 seg.

El TAE 1X, se preparó a partir de una solución concentrada (TAE 50X), poniendo 20 mL de este concentrado por 980 mL de agua destilada.

ANEXO 3

Preparación del gel en el sistema de electroforesis.

Poner la base sobre la bandeja donde se formará el gel procurando que esta se encuentre completamente horizontal; este a su vez deberá estar entre una base de acrílico el que cuenta con dos tornillos para hacer que la burbuja quede completamente centrada. Poner los separadores del gel y los cepillos para hacer las perforaciones o pozos donde se adiciona la muestra. Sellar los extremos de la base con la agarosa fundida. Dejar enfriar y adicionar la agarosa procurando quede al ras de la base.

Dejar enfriar (10 min aproxmt).

Retirar los separadores y adicionar la solución de TAE 1X, dejando inundado el gel. Retirar finalmente los peines.

Adicionar las muestras a analizar.

ANEXO 4

Preparación de las muestras para la electroforesis en gel

Poner en una “gradilla” o en papel Parafilm 1 μL del regulador de carga (glicerol-xilencianol- Azul de bromofenol-agua).

En el primer pozo siempre se pone el marcador de 1 k pb ó 100 pb el cual ya contiene el regulador.

Tomar la muestra (3 μL) de los tubos y mezclar con el regulador.

Colocar cuidadosamente la muestra en el 2º pozo del gel tratando de no rebose fuera de éste.

Cada vez que se vaya a adicionar una nueva muestra se DEBERA CAMBIAR de puntilla.

Conectar la corriente poniendo el polo positivo en extremo opuesto al punto de depósito de la muestra. El polo negativo se conecta en el extremo de los pozos de la muestra. Esto obedece a que el ADN tiene carga (-) negativa.

Procurar que la muestra corra hasta 1.0 cm antes de la segunda serie de pozos.

Sacar y teñir o revelar en una solución de Bromuro de Etidio. De 20 a 25 min.

Sacar con mucho cuidado el gel y checarlo en el transiluminador.

Grabar en la computadora la imagen para su interpretación y procesamiento.

ANEXO 5

Procedimiento para la replicación en PCR.

Una vez extraído el ADN, las Ms se les da el siguiente tratamiento.

Preparar una solución con los siguientes componentes:

Componente	Conc.(μ L)
Agua	variable*
Buffer	2.5
MgCl ₂	2 ó 3
DNTP's	1
mar-01	1
mar-02	1
Taq	0.2
DNA muestra	1 ó 2

*Sirve para ajustar a 25 μ L, y depende de cuanta muestra y/o MgCl₂ se ponga.

X. Artículo enviado a la revista Water Science and Technology.

Fw: Submission Confirmation for Performance of biofilters packed with agave fiber and separation plates on municipal wastewater treatment

De: **Ignacio Villanueva** (ifierro62@yahoo.com)

Enviado: lunes, 04 de junio de 2012 08:22:42 p.m.

Para: Juan Manuel (jmvigueras@hotmail.com); Jose de Jesus Navar (josedejesusnavar@yahoo.com.mx); Marco Antonio Garzon IMTA (mgarzon@tlaloc.imta.mx); César Hernandez Rodriguez ENCB (chdez38@hotmail.com)

1 archivo adjunto

WST-S-12-01394.pdf (1115.5 KB)

Estimados todos,

Les anexo el manuscrito enviado y recibido por Water Science and Technology de Juan Manuel. Ojala que se cumpla eso de que a la tercera va la vencida. Reconozco la guía y gran contribución del Dr. Navar para que haya quedado como lo enviamos, y también que necesitamos todavía pulirlo más.

Saludos cordiales

----- Forwarded Message -----

From: Water Science and Technology <wstem@iwap.co.uk>

To: Ignacio Villanueva-Fierro <ifierro62@yahoo.com>

Sent: Mon, June 4, 2012 7:57:45 PM

Subject: Submission Confirmation for Performance of biofilters packed with agave fiber and separation plates on municipal wastewater treatment

Dear Dr. Villanueva-Fierro,

Your submission entitled "Performance of biofilters packed with agave fiber and separation plates on municipal wastewater treatment" has been received and will now be peer reviewed for possible publication in the journal Water Science and Technology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://wst.edmgr.com/>.

You will shortly be notified of the reference number assigned to your submission.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Michelle Herbert
Journals Production Assistant
Water Science and Technology

Water Science and Technology

Performance of biofilters packed with agave fiber and separation plates on municipal wastewater treatment

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Performance of biofilters packed with agave fiber and separation plates on municipal wastewater treatment
Short Title:	Biofilters packed with agave fiber for wastewater treatment
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Biological Treatment Processes for Wastewater (inc Activated Sludge, Biofilms, Membrane Bioreactors)
Keywords:	Biofiltration; healthy quality; low filtration rate; organic filter media.
Corresponding Author:	Ignacio Villanueva-Fierro, Ph. D. CIIDIR IPN Unidad Durango Durango, Durango MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	CIIDIR IPN Unidad Durango
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Juan Manuel Vigueras Cortés, M. I.

First Author Secondary Information:

Order of Authors:

Juan Manuel Vigueras Cortés, M. I.
Ignacio Villanueva-Fierro, Ph. D.
Marco Antonio Garzón Zúñiga, Ph. D.
José de Jesús Návar Cháidez, Ph. D.
César Hugo Hernández Rodríguez, Ph. D.
Isaías Chairez Hernández, Ph. D.

Order of Authors Secondary Information:

Manuscript Region of Origin:

MEXICO

Abstract:

Agave fiber is a byproduct of the mescal industry that has not been reported as material support in biofiltration processes. This study has as hypothesis that air (2), separation plates (3), and hydraulic loading rates (5) would produce effluents that do not meet set standards for 5 d biochemical oxygen demand (BOD₅); chemical oxygen demand (COD), helminth eggs (HE), fecal coliforms (FC), and total suspended solids

Performance of biofilters packed with agave fiber and 1 separation plates on municipal wastewater treatment

3

4

Juan Manuel Vigueras-Cortés¹, Ignacio Villanueva-Fierro^{1*5}, Marco Antonio Garzón-Zúñiga², José de Jesús Návar-Cháidez¹, Isaías Chaires-Hernández¹⁶, César Hugo Hernández-Rodríguez³

7

8

9

¹Environmental Laboratory of ¹⁰Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, CIIDIR IPN Unidad Durango. Sigma 119, Frac. 20 de Noviembre II, 34220, Durango, Dgo. México. *ifierro62@yahoo.com. ²¹²Mexican Institute of Water Technology, Paseo Cuauhnáhuac 8532, Jiutepec, Mor., 62550, México. ³¹³Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, Unidad Profesional “Lázaro Cárdenas”, Prolongación Manuel M. Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo, 11340, 16 México D.F.

17

18

Abstract Agave fiber is a byproduct of the mescal industry that has not been reported as material support in biofiltration processes. This study set as hypothesis that air (2), separation plates (3), and hydraulic loading rates (5) would produce effluents that do not meet set standards for 5 biochemical oxygen demand (BOD₅); chemical oxygen demand (COD), helminth eggs (HE), fecal coliforms (TFC), and total suspended solids (TSS). Two

series of three biofilters each were tested; the first one had an aeration rate of 0.62 m³ m⁻² h⁻¹

; and no air was fed into the second set. Each of two sets of biofilters was divided with 4, 8, and 12 acrylic plates installed along the column to reduce compaction of the material support. All biofilters were run at 0.27, 0.54, 0.80, 1.07, and 1.34 m³ m⁻² d⁻¹ hydraulic loading rates (HL) using environmental temperature as a covariable since the experiment lasted 17 continuous months. The agave fiber improved water quality parameters since effluents met Mexican and USA-EPA standards to irrigate agricultural and green areas when using HL smaller than 0.8 m³ m⁻² d⁻¹. In addition, the biofiltration process was dependent on temperature, air, and HL*air interaction effects.

Keywords: Biofiltration, healthy quality, low filtration rate, organic filter media.

1 Introduction

Developing countries have problems with the handling of wastewater causing contamination of receiving streams as groundwater, rivers and others. This problem is common for low volume generators of wastewater in rural areas, micro industry and schools far from town. Adaptation of technology and innovation is needed to install, operate and maintain suitable treatment plants for these sites that do not need high qualified employees to handle the wastewater treatment processes. Biofiltration using organic materials has been studied and applied at full scale in the last two decades for the treatment of polluted air and municipal and agro-industrial wastewater for his high removal efficiency (Cohen 2001; Hu and Gagnon 2006; Garzón-Zúñiga et al. 2007), security, low investment and operating cost of the process with 0.078 m³m⁻² d⁻¹ of HL (Buelna et al. 2011). Support

[Click here to download Manuscript: manuscript Vigueras.doc](#)

materials used include peat, bark and woodchips of pine and tropical trees, fiber of sugar cane and date-palm fibers. Even though biofilters have been used for many years, it is still difficult to explain theoretically all the biological processes occurring during the filtration (Chaudhary et al. 2003).

During the operation of a biofilter, the wastewater is fed at the top, infiltrates through the support media and flows down, as in a trickling filter (Wik 2003); they are characterized by low filtration-flow rate of less than 0.5 m³ wastewater m⁻² d⁻¹, which favors retention of organic matter and pollutants by adsorption, absorption and ion exchange mechanisms (Lens et al. 1994; Buelna et al. 2011).

Biofilters were applied for the treatment of drinking water using granular activated carbon as filter media (Wahman et al. 2011); to remove herbicides, pesticides and antibiotics in sewage (Ilhan et al. 2011) and organic matter and nitrogen in urban wastewater by nitrification-denitrification processes (Gálvez et al. 2003). Other researchers have used the biofiltration to remove hydrogen sulfide and livestock odors from gas-phase (Gabriel and Deshusses 2003; Schmidt et al. 2004). Using woodchips, Lens et al. (1994) obtained a removal efficiency of 97% of BOD₅, 63% of COD; 72% of TSS and 64% of NH₄⁺-N.

Buelna and Bélanger (1991) using peat obtained efficiencies of 96% of BOD₅, 87% of

66 COD, 98% of TSS, and 99% of FC. Garzón-Zúñiga et al. (2008) assessed the removal of
67 pathogens with aerobic biofilter using woodchips and natural fiber and removed 98.5% of
68 BOD₅; 99.99% of FC and 96.93% of HE. Riahi et al. (2009) used a biofilter packed with
69 date-palm fiber to obtain a removal of 80.6% of COD, 57.7% of phosphorous (P) and 98%
70 of HE in a tertiary treatment of wastewater. Garzón-Zúñiga and Buelna (2011), treating
71 sanitary wastewater in a biofilter packed with jacaranda and tabachin woodchips without
72 aeration, obtained average efficiencies of 97% of BOD₅, 71% of COD, 95% of TSS, 93%
73 of N-NTK; 4 log units of FC and 100% of HE. Hu and Gagnon (2006) using peat in
74 domestic wastewater treatment at field-scale were obtained 90% of BOD₅ removal
efficiency with an organic loading rate (OL) of 0.07 kg BOD₅ m⁻² d⁻¹, smaller than the used
in our study of 0.30 kg BOD₅ m⁻² d⁻¹.

77
78 The literature review shed light into the biofilter high removal efficiency for several
79 chemical and physical constituents. However, some problems using biofilters have yet to be
80 investigated. Questions such as: (a) is the agave fiber an efficient material support to treat
81 municipal wastewater effluents?, (b) can the packaging material support compact, clog and
82 pressure drop in water during the carrying out of a long-term experiment?, (c) what is the
83 maximum hydraulic load the agave fiber can support with effluent outputs that meet set
84 standards?, (d) is the pumped air component an important factor in the biofiltration
85 process? These questions were solved in this study by using agave fiber as a material voids
86 media for the growth of microorganisms (biofilm) in the biofiltration process that has not
87 been investigated in other studies and it is available in high amounts in Durango, Mexico.
88 The fiber is a byproduct of the agave mescal industry, and comes mainly from *Agave*
89 *durangensis*, plants that grows in Durango, Mexico. In 2007, there were 64 million plants
90 cultivated for the mescal industry in Durango, Mexico (SEDECO 2008). This process
91 produces 20 to 30% of fiber in wet base as a solid waste. This organic fiber has a very high
92 contact area which makes it suitable for the development of bacterial biofilm to degrade
93 organic matter contained in wastewater; it is available at no cost and does not need
94 pretreatment as bark and woodchip milling.

95
96 In the literature searched there were not studies performed with separation plates, which are
97 commonly used in non organic packages (Chandravathanam and Murthy 1999), where the
98 use is to redistribute the flow. Garzón Zúñiga et al. (2007) had problems of clogged after
the first 50 days when the applied TSS load 68 g m⁻² d⁻¹. In biofilters, where organic matter
100 is used as packaging, the weight of the wet package contributes to the compacting and was
101 thought that using separation plates this could be diminished. Separation plates set within
102 biofilters tested the hypothesis of pressure drop in water as well as in the biofiltration
103 process efficiency.

104
105 The hydraulic loading rate is a critical variable for biofiltration as it influences the voids of
106 filter material and the hydraulic residence time and is characterized by a very slow
filtration
107 rate (Garzón Zúñiga et al. 2003). By properly managing the HL, it has been possible
108 maintain a thinner biomass layer consistently; improve in performance and to avoid the
sloughing (Metcalf and Eddy 1991). It has been used a HL of 0.025 and 0.10 m³ m⁻² d⁻¹ for

110 a mixture of bark, peat and woodchips as packaging for domestic sewage (Lens et al.
1994); a HL of 0.03, 0.06 or 1.3 m³ m⁻² d⁻¹ 111 using peat as packaging and municipal
112 wastewater (Buelna and Bélanger 1991); with silica sand, crushed, glass, peat, and
geotextile in domestic wastewater 0.16 m³ m⁻² d⁻¹ 113 of HL (Hu and Gagnon 2006). It was
decided to use five hydraulic loads, 0.27, 0.54, 0.80, 1.07 and 1.34 m³ m⁻² d⁻¹ 114 which include
115 low medium and high HL levels, to decide which of the HL was economic and technically
116 more adequate to the process, to find the maximum loading rate to produce effluents that
117 meet set standards.

118
119 The function of aeration rate is providing oxygen to aerobic bacteria for degradation
120 organic matter and complete nitrification process and the presence of anoxic zones
121 facilitates in the denitrification process (Garzón Zúñiga et al. 2007). To test the hypothesis
122 that air plays a key role in the biofiltration process, air was pumped to a set of three and no
123 air was fed to the remaining three biofilters. Evaluated physical, chemical, and biological
124 constituents in municipal sewage and biofilter effluents were BOD₅, COD, TSS, FC and
125 HE. The main hypothesis of this study was that organic biofilters packed with agave fiber
126 would produce effluents that meet set standards for the irrigation of agricultural and green
127 areas.

128

129 **2 Material and Methods**

130 **2.1 Biofilters setup**

131 Two series of three laboratory-scale biofilters (BF) were built with PVC pipe of 2.0 m in
height and 0.185 m of internal diameter (ID), with an inside volume of 0.054 m³ 132. The
133 extremes of each biofilter were closed with a tight lid. Columns were divided with acrylic
134 perforated plates in order to avoid the agave fiber to compact during the application of
135 wastewater. The number of plates was 4, 8 and 12 at each of two series of biofilters. The
136 first series includes the biofilters BF1, BF2 and BF3 with 12, 8 and 4 divisions,
respectively. One set of three biofilters was aerated at a rate of 0.62 m³ m⁻² h⁻¹ 137, to supply
1 the oxygen required for aerobic 138 microorganisms. The airflow was introduced to the
column

from the bottom and was measured and controlled daily with a Dwyer™ 139 flow meter of 0-1
140 SCFH. The air pressure drop of each aerated reactor was determined with a U-shaped
141 silicon tubing manometer through the displacement of a water column; where
142 measurements were recorded in mm daily. The second set of biofilters did not receive
143 pumped air and they were left as controls and corresponded to biofilters BF4, BF5 and
BF6

144 with 4, 8 and 12 plates, respectively. **Figure 1** sketch one of the BF used to support the
145 agave fiber, with inlets and outlets. The BFs with no air supplied have not air inlet and
146 pressure drop.

147

148

149 **Figure 1** Agave fiber biofilter setup.

150 **2.2 Packing material**

151 Each BF was packed with 10 kg of agave fiber, with 65% of moisture content. Biofilters
152 with 4 acrylic divisions had 2.5 kg of fiber in each division; biofilters with 8 divisions had

1.25 kg each division and biofilters with twelve divisions had 0.833 kg each division. The BF filling procedure with agave fiber was carried out according to Garzón-Zúñiga et al. (2003).

156

2.3 Wastewater influent

Sewage used as influent of the biofilters was taken after primary treatment (screening, sedimentation and homogenization) of the wastewater treatment plant (WWTP) of the city of Durango, México. The wastewater influent was pumped at the top of each biofilter with peristaltic pumps using MasterFlex™ silicon tubing. Five hydraulic loading rates: 0.27, 0.54, 0.80, 1.07 and 1.34 m³ m⁻² d⁻¹ were applied during seventeen months, run with a constant flow of 5, 10, 15, 20 or 25 mL min⁻¹. An adaptation period of three months was used discharging a flow of 3 mL min⁻¹ at the top of each biofilter in order to start the microorganism's adaptation to the system. The objective of tested five HL was found which

is the most effective in the removal with the novel filter material of agave fiber. A 400 L polyethylene tank buried served as the wastewater storage and had a hermetic cup to minimize the air entry to the system that could result in passive wastewater oxygenation.

169

2.4 Influent and effluent physic, chemical and biological characterization.

Influent and effluents were physically and chemically characterized by the content of organic matter with the techniques BOD₅ through the modified Winkler method and the COD by Closed Reflux Colorimetric method. The healthy quality was measured through the concentration of FC by the method of the Most Probable Number in 100 mL and the determination of HE by flotation with Zinc sulfate. Analysis of TSS was measured by the gravimetric method of dry weight. These techniques were carried out according to the APHA (1995) methodology, except HE that was analyzed according to NOM-003-SEMARNAT-1997 (DOF, 1998). These chemical analyses were performed weekly with the exception of HE that was analyzed every fifteenth days. The pH and EC were measured

by the electrometric method. Inlet wastewater temperature (T) was measured daily with a Brannan glass thermometer (-5 to 120°C).

182

2.5 Experimental design

Aeration (2: with and without air), number of plates in the filtration column (3: 4, 8 and 12 plates) and hydraulic loading rate (5: 0.27, 0.54, 0.80, 1.07 and 1.34 m³ m⁻² d⁻¹) were tested applying a strip plot design in a factorial experiment with one covariate. It is known that wastewater treatment depends on temperature (T), but in this study was not controlled, and then it acts as a covariate in this experimental design. The observations are described by the

linear statistical model.

190

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha_i * \beta_j + \alpha_i * \gamma_k + \beta_j * \gamma_k + \alpha_i * \beta_j * \gamma_k + \delta T_{ijk} \pm \varepsilon_{ijkl}$$

192

where Y_{ijkl} is the l th observations on the response variable taken under the ijk th treatments of

the α_i , γ_j , and β_k factors; μ is the overall mean effect; α_i is the effect of the i th level of the air factor; β_j is the effect of the j th level of separation plates factor; γ_k is the effect of the k th level of HL factor; $\alpha_i * \beta_j$, $\alpha_i * \gamma_k$, and $\beta_j * \gamma_k$ is the double interaction between factors; $\alpha_i * \beta_k * \gamma_j$ is the effect of the triple interaction between factors; T is the temperature factor covariable; δ is a linear regression coefficient indicating the dependency of Y_{ijkl} on T_{ijk} and ϵ_{ijkl} is the random error. The statistical method and its sources of variation were evaluated with the Statistica V. 7.0 software.

201

202 **3 Results and discussion**

203 3.1 Wastewater influent characterization

204 Average physicochemical and biological constituents of untreated municipal wastewater during the experimental period of seventeen months are shown in **Table 1**.

206 Concentration of organic matter expressed as BOD₅ and COD; FC and TSS are similar to the quality parameters provided by Metcalf and Eddy (1991). Wastewater samples were taken during the first peak mass loading in the WWTP, period of time that usually has high content of organic matter. The COD/BOD₅ ratio was 2.3, a common ratio obtained for municipal wastewater (Metcalf and Eddy 1991). However, the TSS content is relatively small, probably due to a good operation in the removal of grit and sedimentable solids during primary treatment.

213

215 **Table 1** Physicochemical and biological characterization of raw wastewater.

216

217

218 3.2 Air factor

219 The air factor was statistically significant in BOD₅, COD and FC ($p=0.001$) respectively, unlike TSS. Aerated biofilters removed better BOD₅ since they produced effluents with an average of 22 ± 2.3 mg L⁻¹ ($\alpha=0.05$) and biofilters without air produced effluents with 24.0 ± 1.9 mg L⁻¹, both for a HL of 0.8 m³ m⁻² d⁻¹ and these two figures meet the USA (USA-EPA 2004) and Mexican Norm of 30 mg L⁻¹ (DOF, 1998) for irrigating agricultural and green areas. Average removal efficiency of BOD₅ at this HL was 92.0% for biofilters treated with air and 90.9% for biofilters with no air. HL above 0.8 m³ m⁻² d⁻¹ produced effluents exceeding the BOD₅ concentration required for these objectives.

227

There are not set standards for COD and the average removal efficiency at an HL of 0.8 m³ m⁻² L⁻¹ was 79.7% (128 ± 10 mg L⁻¹) and 62% (240 ± 34 mg L⁻¹) for aerated and unaerated biofilters, respectively. The recorded efficiencies are higher than those encountered Buelna and Bélanger (1991) using peat as biofilm support, whom obtained 96 and 87% of BOD₅ and COD, respectively. Lens et al. (1994) used bark and peat and reported 97%, but reported a removal efficiency of 63% COD; Garzón Zúñiga et al, (2008) using mixtures of tropical trees woodchips and natural fibers, obtained a removal efficiency of 98.5% BOD₅, in a tropical zone of Mexico.

236

237 With respect to CF, biofilters do not remove all bacteria and standard effluents do not meet set standards for irrigation. Average removal efficiency of fecal coliforms was 99.99% (4 log unit) and 99.9% (3 log unit) with the lowest HL of 0.27 m³ m⁻² d⁻¹, in aerated and

unaerated BFs, respectively. However with $0.80 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ of HL an efficiency of 99.95% (3 log unit) is obtained in aerated biofilter and 99.56% (2 log units) for unaerated BFs. The recorded efficiency is higher than the reported by Buelna and Bélanger (1991), who used peat and obtained 99%, and similar to the obtained by Garzón-Zúñiga et al. (2008) with 99.9% of FC removal using woodchips and natural fiber.

245

The removal efficiency of helminth eggs was 98% for the BFs with air and 100% for unaerated BFs up to the highest HL of $1.34 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and $0.46 \text{ kg BOD}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ of OL.

These results are quite similar to those reported by Riahi (2009), who obtained a removal efficiency of 98% for HE using date-palm fiber in a tertiary treatment with smaller

1

biofilters (0.55 m height and 0.10 m of internal diameter). Garzón-Zúñiga et al. (2008), obtained 96.93% HE with aerated biofilters in domestic wastewater. The maximum allowed

limit is $<1 \text{ HE L}^{-1}$ by the NOM-003-SEMARNAT-1997.

253

The average TSS concentration in biofilters with air was $19.7 \pm 3.3 \text{ mg L}^{-1}$ ($\alpha=0.05$), that is equivalent to 91.9% removal efficiency in a HL of $1.07 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and $0.30 \text{ kg BOD}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ of OL; and $16.0 \pm 3.2 \text{ mg L}^{-1}$ (93.4% removal efficiency) without air, both with the highest

HL used in this study of $1.34 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ and $0.46 \text{ kg BOD}_5 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ of OL. The Mexican Norm allows a maximum concentration level of 30 mg L^{-1} of TSS. Efficiencies are higher to those obtained by Lens et al. (1994) who reported 72% of TSS removal using woodchips; and lower than the reported by Buelna et al. (2011), who reached 95% of TSS and Buelna and Bélanger (1991) with 98% of TSS. Agave fiber at the end of the study period was more degraded in biofilters with air than in biofilters without air.

263

264 3.3 Packing factor

The packing effect was statistical significant in the removal of BOD_5 ($p=0.029$), COD ($p=0.001$), TSS ($p=0.007$) and the HL*packing effect was statistically significant in the removal of COD ($p=0.048$) as it is shown in **Figure 2**. After the application of a HL of $0.80 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ the removal efficiencies of COD are not statistically different.

269

270

Figure 2 HL*Packing effect in the removal of COD

272

273 3.4 Hydraulic Loading Rate Factor

The HL effect was statistically significant in the removal of BOD_5 , COD and FC ($p=0.001$)

and TSS ($p=0.004$), and the interaction air*HL for BOD_5 , COD and FC ($p=0.001$). The HL*air interaction effect of removal of BOD_5 is shown at **Figure 3**. The abrupt change on the slope direction in biofilter without air of BOD_5 after $0.80 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, could be explained as the maximum capacity of the biofilters to meet the Norm, as well as a potential reduction

in the biofilm thickness (detachment) due to the hydrodynamic shear stress forces, which tends to reduce removal efficiency of biofilters (Cohen 2001). The removal efficiency of

281 both series of biofilters keeps decreasing constantly when increasing HL.

282

1285 **Figure 3** HL*air interaction effect on the removal of BOD₅ in two series of biofilters
286 (Means with same letter are not significantly different).

287

288 The HL*air effect in the COD/BOD₅ ratio is shown at **Figure 4**. During the first two HLs,
289 there is no statistical difference in the COD/BOD₅ ratio of both biofilter series, but above
0.8 m³ m⁻² d⁻¹ 290 of HL there is a statistically significant difference between aerated and
291 unaerated, being aerated biofilters the ones that obtain a smaller COD/BOD₅ ratio. Also it
is

292 observed a tendency of the ratio COD/BOD₅ to diminish towards the initial COD/BOD₅
293 ratio of 2.3 due to the loss of removal efficiency of the system.

294

295

296 **Figure 4** HL*air interaction effect on the COD/BOD₅ ratio for biofilters with air and with
297 no air fed (Means with same letter are not significantly different).

298

The HL*air interaction effect in the removal of FC is shown in **Figure 5**. Before of 0.80 m³
299

m⁻² d⁻¹ 300 of HL the removal efficiencies of FC was constant with 4 and 3 log units in aerated
301 and unaerated BF_s, respectively. The FC efficiency removal decreases as HL increases.

For 302 use in irrigation of agricultural and green lands, effluents requires disinfection to
obtain the 303 set standard of <1000 NMP 100.mL⁻¹ for general irrigation or <200

NMP.100mL⁻¹ for raw 304 eaten vegetables.

305

1

307 **Figure 5** Hydraulic load*air interaction effect statistical on the removal of fecal coliforms
308 (Means with same letter are not significantly different).

309

310 3.5 Covariate temperature effect

311 The ANCOVA analysis showed the temperature effect was statistically significant in the
312 removal of COD (p=0.005), FC (p=0.049) and TSS (p=0.001). Removal efficiency of
COD

313 has an increasing trend as temperature increases; the higher temperature effect was
obtained

314 at 29°C and maximum removal efficiency of BOD₅ is obtained between 27 and 29°C,
315 characteristic of mesophilic microorganisms (Metcalf and Eddy 1991 and Datta and Allen
316 2005). This factor should be considered for the design of a wastewater treatment plant.

317

318 3.6 Evaluation of pH and electrical conductivity.

319 The average recorded pH was 7.12±0.05 for municipal wastewater; 7.24±0.04 for effluents
320 of BF with pumped air and 7.00±0.03 for effluents of BF without pumped air. These
results

321 are statistically different ($\alpha=0.05$). If pH remains constant, a healthy biofilm growth is
322 promoted in the agave fiber, which improves the ability of adsorption of microorganisms
323 (Cohen 2001).

324

Average electrical conductivity was $736 \pm 14 \mu\text{S cm}^{-1}$ in effluent, and the allowed value in NOM-003-SEMARNAT-1997 is $3000 \mu\text{S cm}^{-1}$. Therefore the effluent can be reused in the irrigation of agricultural and green areas without the effect of soil salinity.

Finally, during the development of this research, the aerated biofilters did not show clogging problems on the material support; a maximum pressure drop of 0.4 mm of water column was recorded during the seventeen months that lasted the experiment, while other research on this issue report a higher pressure when this have less of 60% voids (Schmidt et

al. 2004). In addition, unpleasant odors in effluents were not present during this study.

4 Conclusions

Removal efficiencies for biofilters with air and no air were statistically significant. High temperature favors the removal of measured constituents. Separation plates helped to maintain stable the fiber support for longer periods of time maintaining similar pressures during the experimental period of 17 months, and the effect of separation plates probably required more time to test this hypothesis. Biofilters packed with agave fiber as material support had a high efficiency on the removal of BOD_5 for HL of up to $0.80 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, and effluents meet the USA (USA-EPA 2004) and Mexican Norm (DOF, 1998) for the irrigation of agricultural and green lands. Helminth eggs and TSS meet the quality standards up to $1.34 \text{ m}^3 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ of HL. Biofilters packed with agave fiber as material support is an efficient, simple and economic alternative for the treatment of municipal and domestic wastewater treatment of small-scale generators, and effluents can be reused in irrigation projects of agriculture and green areas, as well as effluents can be safely discharge into lakes, after a disinfection treatment.

Acknowledgments

This research was carried out in "Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional" (CIIDIR IPN Unidad Durango) México. Financial support was provided by COTEPABE-IPN. The authors of IPN of this research are COFAA scholars.

References

- APHA, AWWA and WEF 1995 *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 19th edition. American Public Health Association/American Water Work Association/Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Buelna G. and Bélanger G. 1991 Peat-based biofiltration for small municipalities wastewater treatment. *Sciences et Techniques de Leau*. **23**, 259-264.
- Buelna G., Garzón-Zúñiga M.A. y Moeller-Chávez G. 2011 "Los biofiltros de empaque orgánico: una alternativa simple, robusta y eficiente para el tratamiento de aguas residuales en zonas rurales", *Ide@s CONCYTEG*, **6**(71), pp. 541-552.
- Chandravathanam S. and D.V.S. Murthy 1999 Studies in nitrification of municipal sewage in an upflow biofilter. *Bioprocess Engineering* **21**: 117 -122
- Chaudhary D., Vigneswaran S., Huu-Hao N., Wang G. S. and Hee M. 2003 Biofilter in water and wastewater treatment. *Korean J. Chem. Eng.* **20**(6), 1054-1065.

369 Cohen Y. (2001). Biofiltration –the treatment of fluids by microorganisms immobilized
 370 into the filter bedding material. A review. *Bioresource Technol.* **77**, 257-274.

371 Datta I. and Allen, D. G. 2005 Biofilter Technology. Chapter 6 In: *Biotechnology for Odor*
 372 *and Air Pollution Control*. Shareefdeen/Singh (Eds.), Springer-Verlag Berlin
 373 Heidelberg. 125-145.

374 DOF (1998). NOM-003-SEMARNAT-1997 that establishes the maximum permissible
 375 limits of contaminants for treated wastewaters that are reused in services to the
 376 public. México DF

377 Gabriel D. and Deshusses M. A. 2003 Retrofitting existing chemical scrubbers to
 378 biotrickling filters for H₂S emission control. *Proceeding of the National Academy of*
 379 *Sciences* **100**(11), 6308–6312.

380 Gálvez J.M., Gómez M.A., Hontoria E. and González-López J. 2003 Influence of
 hydraulic
 381 loading and air flow rate on urban wastewater nitrogen removal with a submerged
 382 fixed-film reactor. *J. Hazard. Mater.* **101**, 219–229.

1Garzón-Zúñiga M.A., Lessard P. and Buelna G 383 . 2003 Determination of the hydraulic
 384 residence time in a trickling biofilter filled with organic matter. *Environ. Technol.*
 385 **24**(5), 605–614.

386 Garzón-Zúñiga M.A., Lessard P., Aubry G. and Buelna G. 2007 Aeration effect on the
 387 efficiency of swine manure treatment in a filter packed with organic materials. *Water*
 388 *Sci. Technol.* **55**(10), 135-143.

389 Garzón-Zuñiga M.A., Tomasini-Ortíz A.C., Moeller-Chávez G., Hornelas-Urbe Y.,
 Buelna
 390 G. and Mijaylova-Nacheva P. 2008 Enhanced pathogen removal in on-site
 391 biofiltración systems over organic filtration materials. *Water Practice and*
 392 *Technology*. **3**(2): 053

393 Garzón-Zúñiga M. A. and Buelna G. 2011 Treatment of wastewater from a school in a
 394 decentralized filtration system by percolation over organic packing media. *Water Sci*
 395 *Technol* **64** (5), 1169–1177.

396 Hu Z. and Gagnon G. A., 2006 Impact of filter media on the performance of full-scale
 397 recirculating biofilters for treating multi-residential wastewater. *Water Res.* **40**, 1474-
 398 1480.

399 Ilhan Z. E., Ong S.K. and Moorman T.B. 2011 Herbicide and antibiotic removal by
 400 woodchip denitrifications filters: sorption process. *Water Air Soil Poll DOI*
 401 10.1007/s11270-011-1057-5.

402 Lens P.N., Vochten P.M., Spelleers L. and Verstraete W. H. 1994 Direct treatment of
 403 domestic wastewater by percolation over peat, bark and woodchips. *Water Res* **28**(1),
 404 17-26.

405 Metcalf and Eddy 1991 *Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse*. Third
 406 Edition. McGraw Hill. New York.

407 Riahi K., Mammou A. B. and Thayer B. B. 2009 Date-palm fibers media filters as a
 408 potential technology for tertiary domestic wastewater treatment. *J. Hazard*
 409 *Mater.* **161**(2-3), 608-613.

410 Schmidt D; Janni K. and Nicolai R. 2004. *Biofilter Design Information*. University of
 411 Minnesota. BAEU-1

412 SEDECO 2008 Our mescal is Duranguense. Government of Durango, Mexico (Spanish).
 413 www.durango.gob.mx/file/7377. (accessed 10 September 2010).
 414 USA-EPA 2004 *Manual-Guidelines for water reuse*. EPA/625/R-04/108. U.S. Agency for
 415 International Development Washington, DC
 416 Wik T. 2003 Trickling filters and biofilm reactor modeling. *Environ. Sci. BioTechnol.* **2**,
 417 193–212.
 418 Wahman D.G., Katz L. E., Speitel G.E. 2011 Performance and biofilm activity of
 nitrifying
 419 biofilters removing trihalomethanes. *Water Res.* **45**:1669-1680.

1
Figure 1 Agave fiber biofilter setup.

Figure

Figure 2 HL*Packing effect in the removal of COD

Figure

Figure 3 HL*air interaction effect on the removal of BOD₅ in two series of biofilters

(Means with same letter are not significantly different).

Figure

Figure 4 HL*air interaction effect on the COD/BOD₅ ratio for biofilters with air and with
 no air fed (Means with same letter are not significantly different).

Figure

Figure 5 Hydraulic load*air interaction effect statistical on the removal of fecal coliforms

(Means with same letter are not significantly different).

Figure

Table 1 Physicochemical and biological characterization of raw wastewater.

Table

1

2