



CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA EN EL EFLUENTE DE UN REACTOR NITRIFICANTE UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

CHARACTERIZATION OF ORGANIC MATTER IN THE EFFLUENT FROM A NITRIFYING REACTOR USING FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

S. Ventura-Cruz, C. Fall y M. Esparza-Soto*

Centro Interamericano de Recursos del Agua- Facultad de Ingeniería Universidad Autónoma del Estado de México Carretera Toluca-Atlacomulco km. 14.5, Unidad San Cayetano Toluca, Estado de México, C.P. 50200.

Recibido 5 de Abril, 2013; Aceptado 15 de Septiembre, 2013

Resumen

La espectroscopia de fluorescencia es una herramienta analítica utilizada para examinar muestras de agua de diferente origen por que es sensible, selectiva y puede dar un amplio espectro de información sobre la composición, características, origen y distribución de la materia orgánica disuelta (MOD). El objetivo de esta investigación fue caracterizar la MOD en el efluente de un reactor aerobio autotrófico nitrificante por espectrometría de fluorescencia de la matriz de excitación-emisión en 3D (EEM-3D, por sus siglas en inglés) y así determinar si las EEM-3D podrían identificar productos microbianos solubles de bacterias nitrificantes. El reactor nitrificante fue operado a 36 días de tiempo de retención celular (TRC), 40 horas de tiempo de retención hidráulico (TRH) y alimentado con agua residual con exceso de amonio. Se identificaron solamente dos picos de fluorescencia en el efluente del reactor nitrificante: Los picos fueron localizados a una longitud de onda de emisión similar (416.9 ± 10.3 y 415.5 ± 2.2 nm, respectivamente), pero a diferentes longitudes de onda de excitación (245.2 ± 1.0 y 330.7 ± 1.7 nm, respectivamente). Las EEM-3D fueron significativamente diferentes a los que comúnmente se encuentran en el efluente de reactores aerobios heterotróficos de lodos activados o en el efluente de reactores anaerobios heterotróficos metanogénicos.

Palabras clave: nitrificación, materia orgánica disuelta, reactor aerobio autotrófico nitrificante, espectrometría de fluorescencia, matrices de excitación-emisión.

Abstract

The fluorescence spectroscopy is an analytical tool used to test water from different origins because it is sensitive, selective and can give a broad spectrum of information on the composition, characteristics, origin and distribution of dissolved organic matter (DOM). The objective of this research was to characterize the effluent DOM of an aerobic autotrophic nitrifying reactor with fluorescence spectrometry of the excitation-emission matrix in 3D (EEM-3D) and determine if EEM-3D could identify soluble microbial products from nitrifying bacteria. The nitrifying reactor was operated at a sludge retention time of 36 days, a hydraulic retention time of 40 hours of hydraulic retention time and fed with an excess of ammonium. Only two fluorescence peaks were identified in the reactor effluent: The peaks were located at similar emission wavelength (416.9 ± 10.3 and 415.5 ± 2.2 nm, respectively), but different excitation wavelength (245.2 ± 1.0 and 330.7 ± 1.7 nm, respectively). The EEM-3D were significantly different than those found in the effluent of aerobic and anaerobic reactors.

Keywords: nitrification, dissolved organic matter, nitrifying reactor, fluorescence spectrometry, excitation-emission matrix.

*Autor para la correspondencia. E-mail: mesparzas@uaemex.mx
Tel. 72-22-96-55-50, Fax 72-22-96-55-55

1 Introducción y antecedentes

La fluorescencia es la propiedad de ciertas moléculas orgánicas e inorgánicas de liberar energía en forma de luz cuando son excitadas por una fuente de alta energía, la cual eleva los niveles de energía de los electrones dentro de la molécula (Baker y Genty, 1999). Los compuestos orgánicos aromáticos pueden ser estudiados por espectroscopia de fluorescencia (EF) debido a su nivel de energía, estructura de pares de electrones y el anillo de carbón (Stedmon y col., 2003). La materia orgánica disuelta (MOD) que absorbe luz se define como cromófora, mientras que la que re-emite energía luminiscente se define como fluorófora (Mopper y col., 1996). Los componentes orgánicos naturales fluorescentes más estudiados son: sustancias húmicas (ácidos fúlvicos y húmicos), aminoácidos (triptófano, tirosina y fenilalanina), proteínas y péptidos (Stedmon y col., 2003). Estos compuestos orgánicos fluorescentes han sido utilizados para determinar el origen, distribución y transformación de la MOD en sistemas acuáticos naturales y sistemas biológicos de tratamiento (Alberts y Takács, 2004).

Actualmente existen cuatro tipos de EF: EF de emisión, EF de excitación, EF sincronizada y EF de la matriz de excitación-emisión en 3D (EEM-3D, por sus siglas en inglés). Una EEM-3D es una manera sencilla de mostrar una serie de espectros de emisión colectados a diferentes longitudes de

excitación. Por ejemplo durante esta investigación, se construyeron EEM-3D colectando 45 espectros de emisión a longitudes de onda (λ_{em}) entre 250 y 600 nm, para longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) cada 5 nm entre 200 y 420 nm (Fig. 1). Para evitar las perturbaciones Rayleigh y Raman del agua, se utilizó un filtro a 290 nm y se sustrajo un blanco de agua desionizada, respectivamente. Al graficar los 45 espectros de emisión en un plano x-y solo se observan una serie de líneas sin sentido, perdiéndose mucha información (Fig. 1). Al graficar los espectros de emisión en 3D, convirtiendo el eje x en la λ_{em} , el eje y en la λ_{exc} y el plano z , que sobresale perpendicularmente al plano x-y, en la intensidad de fluorescencia (IF) se obtiene un mapa de contorno (Fig. 2a). Este mapa de contorno contiene líneas que indican IF similares. Si una línea es circular indica la presencia de un pico de fluorescencia (Figs. 2a y 2b), de la misma manera que una línea de contorno circular en un plano topográfico indica la presencia de un cerro o montaña.

El mapa de contorno en 3D revela la localización e intensidad de los fluoróforos que podrían estar presentes en la muestra (Fig. 2a). De acuerdo a la literatura, un fluoróforo tendrá dos picos de fluorescencia, los cuales se ubican a una misma λ_{em} , pero distinta λ_{exc} (Barker y Stuckey, 1999). Normalmente, el pico que aparece a la menor λ_{exc} es el que tiene una mayor IF (Fig. 2a).

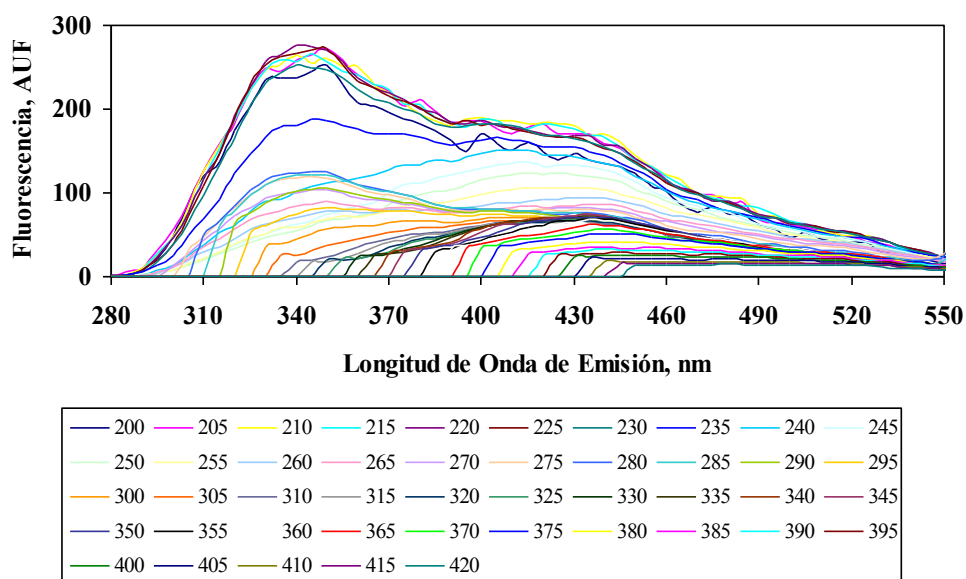
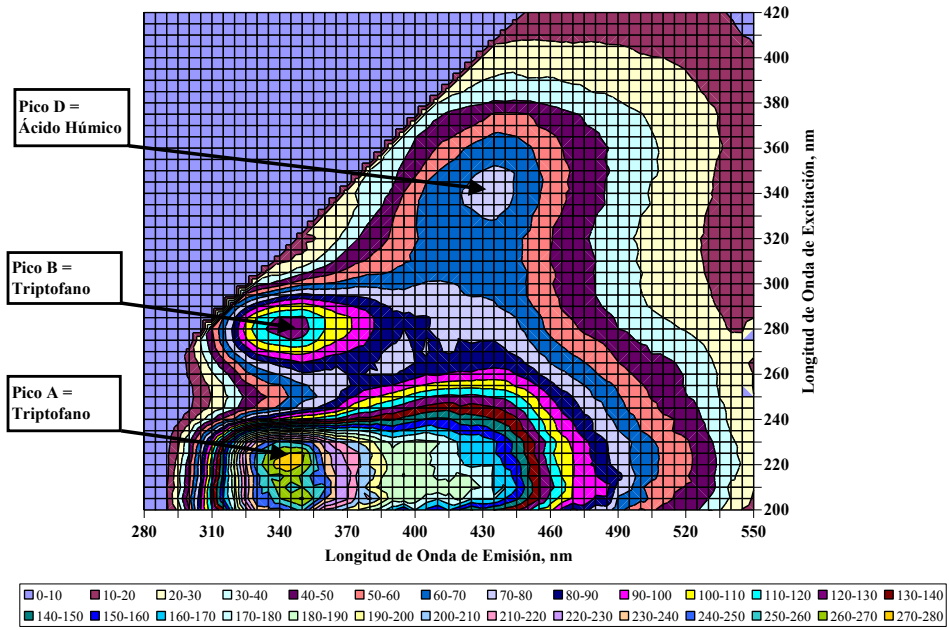
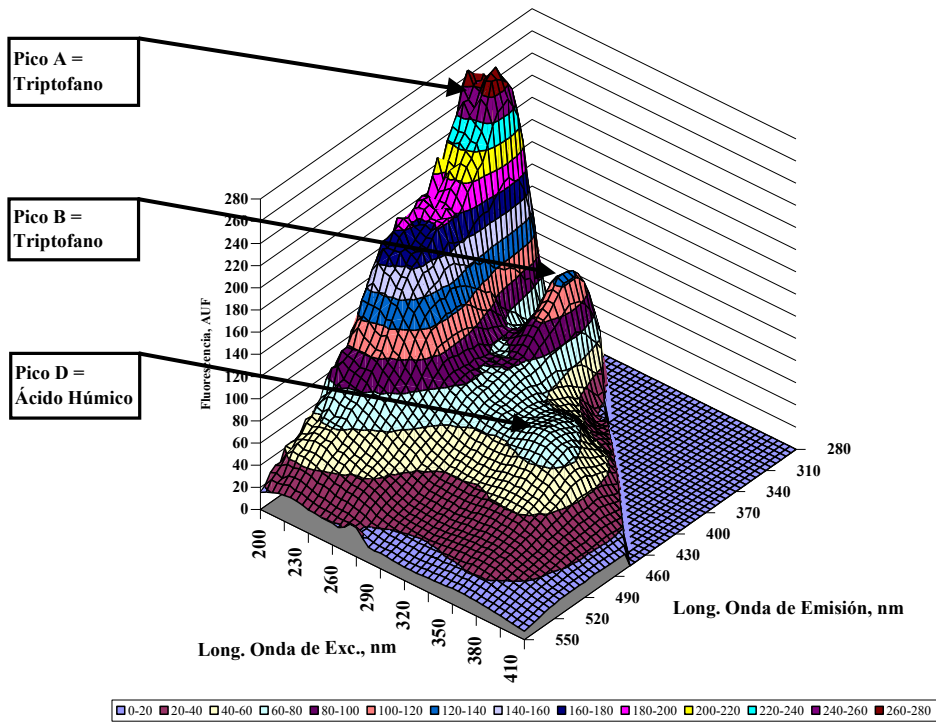


Fig. 1. Espectros de emisión graficados en un plano x-y.



(a)



(b)

Fig. 2. EEM-3D del efluente de un reactor de lodos activados. (a) EEM-3D plano: eje x = longitud de onda de emisión (λ_{em}); eje y = longitud de onda de excitación (λ_{exc}); eje z = perpendicular al plano x-y = intensidad de fluorescencia. (b) EEM-3D tridimensional.

La localización de los picos dentro de la EEM-3D indica el tipo de fluoróforo presente, mientras que la IF indica la concentración de dicho fluoróforo (Coble, 1996). En la Fig. 2 se muestra una EEM-3D característica de un efluente de un reactor aerobio heterotrófico de lodos activados (LA), el cual normalmente contiene los Picos A y B atribuidos al aminoácido triptofano y el Pico D atribuido a un ácido húmico (Esparza-Soto y col., 2011). Los productos microbianos solubles (PMS) son compuestos orgánicos generados durante el crecimiento y decaimiento de microorganismos en sistemas biológicos de tratamiento. Los PMS son importantes porque se forman durante el tratamiento biológico de agua residual y comprenden una fracción significativa de la MOD del efluente de estos sistemas de tratamiento (Xie y col., 2010; Ni y col., 2010). Los PMS también pueden tener efectos negativos, tales como ecotoxicidad e inhibición, sobre las mismas bacterias que los generan (Ross y col., 1998; Ichihashi y col., 2006). Los PMS se han caracterizado por diversos métodos analíticos: cromatografía de gel impregnado para determinar la distribución del peso molecular de los PMS de diferentes orígenes (Barker y Stuckey, 1999; Jarusutthirak y Amy, 2007); espectroscopia infrarroja de transformación de Fourier y carbón orgánico disuelto (COD) para analizar las características de grupos funcionales y el contenido total de PMS, respectivamente (Jarusutthirak y Amy, 2007); EEM-3D para identificar sus propiedades de fluorescencia (longitud de onda de excitación y emisión e IF de PMS fluorescentes) (Esparza-Soto y col., 2011; Ni y col., 2010; Xie y col., 2010; Li y col., 2008). Los PMS han sido caracterizados por EF en el efluente de diversos sistemas de tratamiento biológico: sistemas aerobios heterotróficos de lodos activados (Esparza-Soto y col., 2011; Ni y col., 2010; Jarusutthirak y Amy, 2007; Li y col., 2008; Saadi y col., 2006); sistemas anaerobios heterotróficos metanogénicos (Sheng y Yu, 2006; Janhom y col., 2009); sistemas anóxicos de desnitrificación (Xie y col., 2010); sin embargo, los autores no encontraron en la literatura información sobre la caracterización de PMS por EF en sistemas aerobios autotróficos de nitrificación. En este caso los PMS generados por bacterias nitrificantes se consideraron que serían interesantes de caracterizar por que las bacterias nitrificantes son microorganismos autótrofos y consumen materia inorgánica en forma de amonio para la obtención de energía, pero producen PMS en forma de MOD en su efluente.

Tabla 1. Composición del efluente del reactor de lodos activados

Componentes	Concentración
DQO (mg/L)	58.5 ± 38
Nitrógeno total (mg/L)	15 ± 2
Fósforo (mg/L P)	30 ± 8
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	2.7 ± 1
Número de muestras	15

El objetivo principal del presente trabajo fue caracterizar la MOD del efluente de un reactor aerobio autotrófico nitrificante utilizando EEM-3D y así determinar si las EEM-3D podrían identificar los PMS producidos por bacterias nitrificantes.

2 Metodología y materiales

2.1 Composición del influente del reactor nitrificante

El reactor nitrificante se alimentó con una mezcla compuesta de 200 mL de efluente de un reactor de LA (Tabla 1) y 1,600 mL de una solución madre con 150 mg/L de N-NH₄⁺. La Tabla 1 muestra el promedio y desviación estándar de los parámetros medidos en el efluente del reactor de LA. El reactor de LA es parte de un sistema piloto de tratamiento de agua residual de una industria procesadora de chocolate, el cual inicia con un reactor anaerobio de flujo ascendente y termina con el reactor de LA. Se utilizó esta mezcla compuesta como influente para simular un proceso de nitrificación con agua industrial real y no sintética, disminuir la concentración de MOD, disminuir la IF de la muestra compuesta y adicionar fósforo a la mezcla.

2.2 Operación del reactor nitrificante a escala de laboratorio

Se instaló un reactor de lotes secuenciales de vidrio de 2 L (diámetro = 12.5 cm, altura = 16.3 cm) para simular un proceso de nitrificación y generar un efluente tratado para caracterizarlo. El reactor nitrificante fue inoculado con 1,500 mL de lodo proveniente de un reactor aerobio heterotrófico de LA. La concentración de sólidos suspendidos volátiles de licor mezclado (SSVLM) obtenida fue de 1,006 ± 206 mg/L de sólidos suspendidos volátiles (SSV). El reactor nitrificante se operó a un TRC de 36 días, suponiendo que la pérdida de lodo en el efluente era mínima, y un TRH de 40 horas.

Tabla 2. Promedio de los parámetros de operación y de control del reactor nitrificante.

Parámetro	Etapa I
TRH (h)	40 ± 0.1
T(°C)	19.7 ± 2.8
OD (mg L ⁻¹)	3.2 ± 0.1
pH	7.5 ± 0.45
DQO _{inf} (mg/L)	43.8 ± 20.1
DQO _{ef} (mg/L)	27.4 ± 11.8
Eficiencia de remoción DQO (%)	32.6 ± 13.5
SSVLM (mg/L)	1030.1 ± 141.9
SSV _{ef} (mg/L)	50.6 ± 8.3
DBO ₅ calculado (mg/L)	21.6 ± 9.8
Fracción de organismos Nitrificantes (f _N)	0.4 ± 0.2
Concentración de organismos nitrificantes en el licor mezclado (X _N)(mg/L)	416.2 ± 238
TRC (d)	35.5 ± 4.2
[N-NH ₄ ⁺] _{influyente} (mg/L)	147.4 ± 6.8
[N-NH ₄ ⁺] _{efluente} (mg/L)	41.5 ± 10.8
Eficiencia NH ₄ (%)	72.2 ± 6.9

TRH = Volumen del reactor, 2 L / Purga diaria de sobrenadante, 1.2 L/d; TRC = SSVLM * Volumen del reactor, 2 L / (SSV en el efluente * Purga diaria de sobrenadante, 1.2 L/d).

Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de TRH y TRC se indican al pie de la Tabla 2. El reactor se operó en lotes secuenciales, mezclando y aireando 23 horas, sedimentando 30 minutos, y purgando manualmente 1.2 L de sobrenadante tratado durante 30 minutos. El influente se alimentó directamente al reactor y el aire fue suministrado con bombas aereadoras de pecera, obteniendo 3.2 mg/L de oxígeno disuelto (OD). Para tener un mejor mezclado se instaló un agitador magnético. El reactor nitrificante se monitoreó desde el día que se inoculó la biomasa hasta lograr el estado estacionario, el cual se consideró cuando la concentración de MOD y amonio en el efluente varió menos de 10 % durante cuando menos 10 días consecutivos. El reactor nitrificante tardó aproximadamente 30 días en estabilizarse y alcanzar el estado estacionario; una vez estabilizado, el reactor se operó por 60 días continuos en estado estacionario. En la Tabla 2 se muestra el promedio y la desviación estándar de los parámetros de operación del reactor nitrificante durante el estado estacionario.

El reactor nitrificante se monitoreó tres veces por semana durante la etapa de estabilización, mientras que durante la etapa de estado estacionario se monitoreó diariamente. El monitoreo comprendió la medición diaria de OD, pH, temperatura, SSVLM, sólidos suspendidos volátiles del efluente (SSV_{ef}), demanda química de oxígeno (DQO), N-NH₄⁺ y EEM-3D. Los valores obtenidos sirvieron para evaluar el rendimiento del reactor nitrificante a través de la eficiencia de remoción de amonio, acumulación de nitratos y nitritos en el efluente, aumento de la concentración de la biomasa y variación del TRC.

2.3 Métodos analíticos

Se determinó la concentración de amonio en el influente y efluente, mientras que la concentración de nitrato y nitrito se determinó solo en el efluente; estos parámetros se midieron tres veces por semana durante estado estacionario. La DQO se midió diariamente durante estado estacionario; los SSVLM y SSV_{ef} se midieron una vez por semana. La DQO se determinó filtrando las muestras con filtros de fibra de vidrio de tamaño de poro de 1.2 μm (GF/C, Whatman) y fue medida con un kit comercial de bajo rango (0 - 150 mg/L, Método 435, Hach Co., Loveland, CO, EUA). Los SST, sólidos suspendidos volátiles (SSV) y sólidos suspendidos fijos (SSF) se determinaron de acuerdo con la NMX-AA-034-SCFI-2001. La concentración de amonio fue medida con un kit comercial de alto rango (0 - 50 mg/L N-NH₄⁺, Método 10031, Hach Co., Loveland, CO, EUA), los nitratos se midieron con un kit comercial de alto rango (0 - 30 mg/L N-NO₃⁻, Método 10020, Hach Co., Loveland, CO, EUA) y la concentración de nitritos con un kit comercial de bajo rango (0 - 0.5 mg/L N-NO₂⁻, Método 8507, Hach Co., Loveland, CO, EUA).

2.4 Espectrometría de fluorescencia de la EEM-3D

Todos los espectros de fluorescencia fueron medidos en un espectrofluorómetro (Modelo LS-55, Perkin Elmer, EUA) equipado con una lámpara de xenón de 150 watts como fuente de excitación. El espectrofluorómetro fue controlado con el software WINLAB (Perkin Elmer, EUA, 2000) operado desde una computadora de escritorio (Hewlett Packard, Compac dc7900, 2009). Las EEM-3Ds se construyeron colectando 45 espectros de emisión con λ_{em} entre 250 y 600 nm, para λ_{exc} entre 200 y 420 nm, incrementados cada 5 nm. Para evitar las

perturbaciones Rayleigh y Raman del agua se utilizó un filtro a 290 nm y se sustrajo un blanco de agua desionizada, respectivamente. La degradación de la fuente de excitación (lámpara de xenón) del instrumento se monitoreó con la IF del pico Raman ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 350/394.5$ nm) de agua desionizada, obteniéndose variaciones del 5 % de la IF (Baker, 2001). Los archivos de las EEM-3Ds se exportaron a hojas de cálculo de Excel con el programa Migración (Esparza-Soto, 2009), en donde a cada EEM-3D se le sustrajo un espectro de agua destilada para eliminar las perturbaciones Rayleigh y Raman. En estas hojas de Excel se realizó el análisis visual de las EEM-3D, el cual consistió en la identificación de los picos de fluorescencia y sus propiedades de fluorescencia ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ e IF).

3 Resultados y discusión

3.1 Rendimiento del reactor nitrificante

En la Tabla 2 se muestran los promedios y las desviaciones estándar de los parámetros de operación del reactor nitrificante. El TRH del sistema fue de 40 ± 0.1 h y la temperatura de operación de 19.7 ± 2.8 °C. La temperatura de operación se conservó por abajo de la reportada en la literatura (Espinoza-Rodríguez y col., 2012; Campos y col., 2007; Carrera y col., 2003). Bougard y col. (2006) operaron un reactor completamente mezclado y reportaron que a temperaturas por arriba de 30°C se acumuló nitrito en el efluente y disminuyó la eficiencia de remoción del amonio de 80 % a 68 %. Por otro lado, la inhibición por temperaturas bajas (< 15°C) es mayor para *Nitrobacter* que para *Nitrospira*, por lo tanto, es común que los iones nitrito se acumulen a bajas temperaturas (Gerardi, 2002); sin embargo, durante nuestra investigación la temperatura fue mayor a 15°C y se registró una acumulación de nitritos en el efluente del reactor nitrificante (27.7 ± 5.7 mg/L N-NO₂⁻).

El pH permaneció en el rango de 7.25 ± 0.6 a 7.5 ± 0.45 , valor que se encuentra dentro del rango óptimo recomendado (7.5 - 8.5) para lograr una velocidad de nitrificación constante (Campos y col., 2007; Carrera y col., 2003; Gerardi 2002). Es importante recalcar que a valores de pH cercanos a 6.0, la tasa de nitrificación es mucho más lenta.

Otro parámetro de operación importante fue la concentración de OD; la literatura reporta que la acumulación de nitrito durante la nitrificación puede evitarse manteniendo el OD > 0.7 mg/L (Bae y

col., 2002). Durante nuestra investigación se logró mantener la concentración de OD en un promedio de 3.0 mg/L (Tabla 2), valor mayor al reportado en la literatura (Xie y col., 2012).

La concentración de biomasa inicial en el reactor nitrificante fue alrededor de $1,006 \pm 206$ mg/L SSV y se mantuvo en $1,030.1 \pm 141.9$ mg/L SSV después de un periodo de operación de 90 días (Tabla 2). La purga en el reactor nitrificante se realizó vaciando 1,200 mL del sobrenadante, esto ocasionó dos efectos negativos en la calidad del efluente; primero, que se fugara lodo en el efluente (50.6 ± 8.3 mg/L); y segundo, que 800 ml del sobrenadante quedara más tiempo dentro del reactor originando una acumulación PMS.

El TRC calculado fue de 35.5 ± 4.2 días, el cual es mayor al recomendado en la literatura (Wu y col., 2011). TRC menores a 5 días, la nitrificación se ve afectada debido a la acumulación de nitrito, mientras que TRC mayores a 20 días la nitrificación no se ve alterada por la acumulación de nitritos (Wu y col., 2011).

La eficiencia de remoción de la DQO se mantuvo alrededor del 32.6 ± 13.5 %, mientras que la eficiencia de remoción del NH₄⁺ fue de 72.2 ± 6.9 %, lo cual indicó que las bacterias que crecían en el reactor en su mayoría eran autotróficas nitrificantes, no heterotróficas (Fig. 3) (Muñoz-Sánchez y Reyes-Mazzoco, 2012; Xie y col., 2012). La eficiencia de remoción del amonio fue menor a la reportada para un reactor nitrificante de biopelícula de 5 L con un influente sintético con altas concentraciones de amonio (250 mg/L N-NH₄⁺) y bajas concentraciones de OD (0.5 mg/L) (Bernet y col., 2001) y para un agua residual con concentraciones altas de amonio (1,912 mg/L N-NH₄⁺).

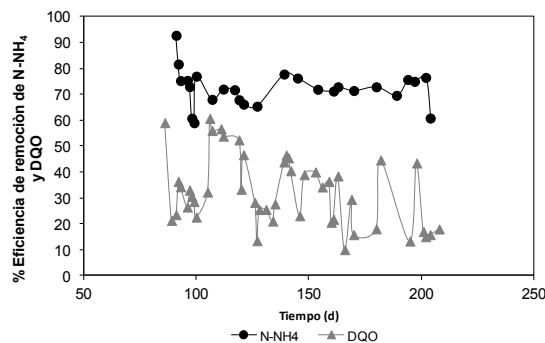


Fig. 3. Eficiencia de remoción de DQO y N-NH₄⁺ del reactor nitrificante.

Por otro lado, la eficiencia de remoción de amonio fue cercana a la reportada para un reactor de 36 L de lotes, TRC de 37 días y concentraciones en el influente de 48 mg/L N-NH₄⁺ y 417 mg/L de DQO (Mahvi y col., 2004).

3.2 Espectros de fluorescencia característicos del reactor nitrificante

El objetivo principal de esta investigación fue obtener las EEM-3D del efluente de un reactor nitrificante. La Fig. 4 y la Tabla 3 muestran EEM-3D representativas y los promedios de las propiedades de fluorescencia ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$, IF y tasa de fluorescencia (TF)), respectivamente, del influente y efluente del reactor nitrificante. De manera general, el influente mostró tres picos de fluorescencia bien definidos (Fig. 4a): un Pico A que se localizó a una $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de $226.9 \pm 4.8/360.2 \pm 19.2$ nm, y los Picos C y D que se localizaron a una λ_{em} similar (399.7 ± 7.6 y 416.9 ± 4.9 nm, respectivamente), pero a una λ_{exc} diferente (225.9 ± 6.6 y 330.4 ± 1.4 nm, respectivamente). La IF del Pico A (611.4 ± 105.5 unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF) fue mayor que la IF de los Picos C y D indicando su concentración más alta con respecto a estos picos (Tabla 3). De acuerdo a la localización de los picos observados dentro de las EEM-3D (coordenadas de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$), el Pico A puede atribuirse al aminoácido triptofano, mientras que los Picos C y D se pueden atribuir a un ácido húmico (Coble, 1996). El Pico A debería de presentar su pico acompañante, Pico B, muy bien definido a una $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de $280/360$ nm, sin embargo, en la Fig.

4a no aparece. Este pico podría estar oculto y su identificación visual hacerse imposible, pero se podría encontrar con métodos matemáticos (Esparza y col., 2011; Stedmon y col., 2003). La presencia de los tres picos en la EEM-3D del influente del reactor nitrificante se debió a que 200 ml de la mezcla del influente provenía del efluente de un reactor de LA.

Una EEM-3D de un efluente de LA tiene tres picos característicos: Pico A y B asociados al aminoácido triptofano ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 220/350$ y $280/350$ nm, respectivamente) y un Pico D asociado a una sustancia húmica ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 335/425$ nm) (Esparza y col., 2011; Esparza y Westerhoff, 2001; Saadi y col., 2006; Chen y col., 2003). En el caso del efluente de reactores de LA, el Pico C, el cuál es el pico acompañante del Pico D y se encuentra visualmente oculto, pero se ha podido resolver con métodos matemáticos (Esparza y col., 2011).

En la Fig. 4b se muestra una EEM-3D característica del efluente del reactor nitrificante. Los espectros mostraron solamente dos picos de fluorescencia. Los Picos C y D fueron localizados a una similar λ_{em} (416.9 ± 10.3 y 415.5 ± 2.2 nm, respectivamente), pero a diferentes λ_{exc} (245.2 ± 1.0 y 330.7 ± 1.7 nm, respectivamente). La TF de los Picos C/D fue de 1.2, valor menor al obtenido en el influente (Tabla 3). Por otro lado, un hombro de origen desconocido que no se logró formar completamente como pico y se localizó a una $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de $295/410.6$ nm (Fig. 4b). De acuerdo a la localización de los picos dentro de las EEM-3D, el par de Picos C y D se pueden atribuir a la presencia de un ácido húmico (Coble, 1996).

Tabla 3. Promedio de las propiedades de fluorescencia de los espectros del influente y efluente del reactor nitrificante

	PICO A			PICO C			PICO D			TF
	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	IF (UAF)	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	IF (UAF)	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	IF (UAF)	C/D
Influente										
Promedio	226.9	360.2	611.4	225.9	399.7	535.2	330.4	416.9	301.8	1.8
D. E.	4.8	19.2	105.5	6.6	7.6	123.5	1.4	4.9	53.6	0.1
n	13	13	13	11	11	11	13	13	13	11
	SHOULDER			PICO C			PICO D			TF
	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	IF (UAF)	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	IF (UAF)	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	IF (UAF)	C/D
Efluente										
Promedio	295	410.6	375.4	245.2	416.9	537.1	330.7	415.5	462.9	1.2
D. E.	0	1.9	88.7	1.0	10.3	113.5	1.7	2.2	113.9	0.1
n	22	22	22	23	23	23	23	23	23	23

D. E. = Desviación Estándar; n = Número de muestras.

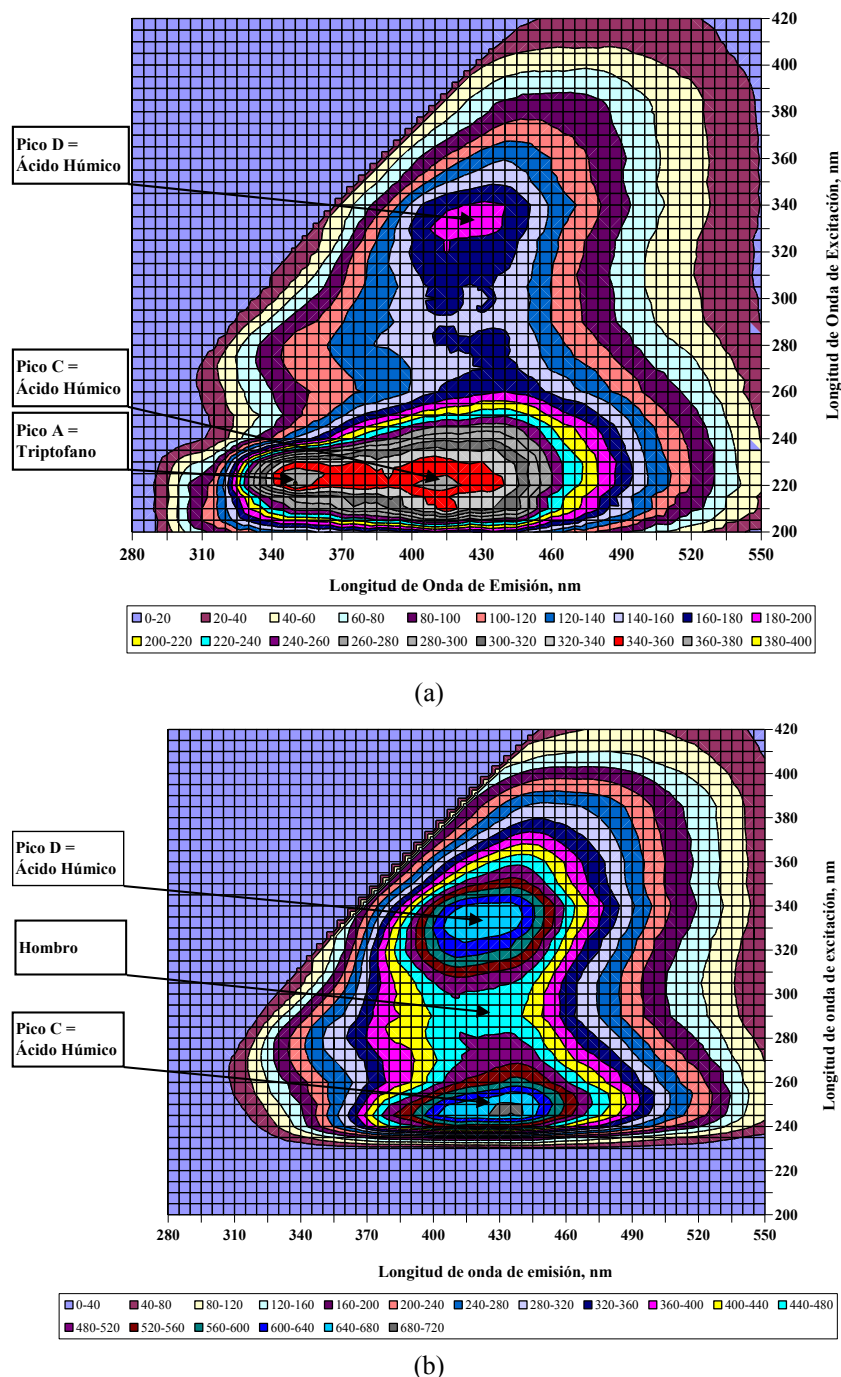


Fig. 4. EEM-3D representativas del reactor nitrificante: (a) influente; (b) efluente.

Otra característica que mostraron los espectros del efluente fue que el Pico C se movió a $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ más largas, de 225.9 a 245.2 nm y de 399.7 a 416.9 nm, respectivamente (Fig. 4b). Este movimiento de picos a longitudes de onda más largas indica la transformación de la MOD y su correspondiente

humificación (Esparza y col., 2011; Coble, 1996). En el reactor nitrificante esta transformación pudo haber sido causada por la producción y acumulación de MOD proveniente de los PMS de las bacterias autotróficas nitrificantes.

Por otro lado, la Tabla 3 muestra que la IF

de los Picos C y D fue mayor en el efluente que en el influente del reactor nitrificante. La IF del Pico C se incrementó de 535.2 ± 123.5 a 537.1 ± 113.5 UAF, mientras que la IF del Pico D se incrementó de 301.8 ± 53.6 a 462.9 ± 113.9 UAF. Este incremento indicó que existió una acumulación de MOD fluorescente proveniente de los PMS durante el proceso de nitrificación, a pesar de que hubo remoción de DQO (32.6 ± 13.5 %). Esta acumulación de PMS atribuida al aumento de la IF fue observada en el efluente de un reactor aerobio heterotrófico de LA alimentado con agua residual sintética (Esparza-Soto y col., 2011). La presencia de los Picos C y D en el efluente del reactor nitrificante localizados a longitudes de onda más larga y con una IF más alta con respecto a los observados en el influente podría atribuirse a la producción y acumulación de PMS de bacterias aerobias autotróficas nitrificantes debido a que predominaron en el reactor y son la única posible fuente de MOD fluorescente.

Otra característica de la EEM-3D del efluente del reactor nitrificante fue la desaparición del pico del aminoácido triptofano (Pico A) después del tratamiento (Fig. 4a y 4b). Los picos de fluorescencia atribuidos a aminoácidos (triptofano y tirosina) son reportados en el efluente de otros sistemas biológicos de tratamiento. Por ejemplo, las EEM-3D de efluentes de reactores aerobios heterotróficos de LA presentan tres picos de fluorescencia, dos picos atribuidos al aminoácido triptofano (Pico A y B, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 220/350$ y $280/350$ nm, respectivamente) y un pico asociado a una sustancia húmica (Pico D, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 335/425$ nm) (Esparza y col., 2011; Saadi y col., 2006; Chen y col., 2003; Esparza y Westerhoff, 2001); las EEM-3D del efluente de un reactor anóxico desnitrificante operado a diferentes TRC presentan tres picos de fluorescencia, un pico atribuido al aminoácido triptofano (Pico B, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 280/350$ nm) y dos picos atribuidos a sustancias húmicas (Picos C y D, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 240/420$ nm y $340/420$ nm, respectivamente) (Xie y col., 2010). Estos picos fueron atribuidos a la formación de PMS bajo condiciones anóxicas, los cuales fueron menores que los producidos bajo condiciones aerobias. Por otro lado, las EEM-3D de ríos contaminados por aguas residuales municipales tratadas en filtros percoladores aerobios heterotróficos presentaron los mismos picos (Picos B, C y D) y fueron utilizados para monitorear la contaminación de los ríos por los efluentes de estas plantas de tratamiento (Baker, 2001).

En el caso del tratamiento del agua residual de una industria cervecera en un sistema de tratamiento

dual (anaerobio/aerobio), se encontraron en el efluente del reactor anaerobio heterotrófico metanogénico cinco picos de fluorescencia: dos atribuidos al aminoácido tirosina ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 230/315$ y $275/315$ nm), dos picos atribuidos a sustancias húmicas (Picos C y D, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 255/455$ y $335/455$ nm) y un pico desconocido ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 500/525$ nm); mientras que en el efluente del reactor aerobio heterotrófico de LA solo se encontró el Pico D ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 335/455$ nm) (Janhom y col., 2009). Esto sugiere que durante tratamiento aerobio heterotrófico de LA y filtro percolador, anaerobio heterotrófico metanogénico, anóxico desnitrificante se produjeron dos tipos diferentes de aminoácidos (triptofano o tirosina), mientras que durante el tratamiento de nitrificación, éstas proteínas no se produjeron.

Por otro lado, las EEM-3D también se han utilizado para caracterizar sustancia poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés) de lodos aerobios de LA y lodos anaerobios metanogénicos (Sheng y Yu, 2006; Li y col., 2008), así como, sustancias poliméricas intracelulares de lodos de reactores de LA (Li y col., 2008). Los EPS están estrechamente ligados a PMS, pues se forman en la superficie de las bacterias, pero se hidrolizan y se convierten en PMS (Laspidou y Rittmann, 2002). Las EEM-3D de las EPS de lodos aerobios y lodos anaerobios metanogénicos presentaron tres picos de fluorescencia: dos picos atribuidos al aminoácido triptofano (Picos A, B, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 225/340-350$ y $280-285/340-350$ nm, respectivamente) y un pico asociado a una sustancia húmica (Pico D, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 330/340/420-430$ nm). Como puede observarse las EEM-3D de los EPS son muy similares a las EEM-3D de los PMS encontrados en el efluente de reactores aerobios heterotróficos.

Conclusiones

Las EEM-3D del efluente del reactor nitrificante mostraron solamente dos picos de fluorescencia (Picos C y D, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 245.2/416.9$ y $330.7/515.5$ nm, respectivamente) atribuidos a sustancias húmicas.

La presencia de los Picos C y D en el efluente del reactor nitrificante localizados a longitudes de onda más larga y con una IF más alta con respecto a los observados en el influente podría atribuirse a la producción y acumulación de PMS de bacterias aerobias autotróficas nitrificantes debido a que predominaron en el reactor y son la única posible fuente de MOD fluorescente.

Las EEM-3D del efluente del reactor aerobio autotrófico nitrificante demostraron que las bacterias nitrificantes no produjeron PMS en forma de aminoácidos fluorescentes.

Agradecimientos

El primer autor agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el doctorado en ciencias del agua dentro del programa de doctorado del Centro Interamericano de Recursos del Agua, unidad académica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Referencias

- Alberts, J. J. y Takács, M. (2004). Comparison of the natural fluorescence distribution among size fractions of terrestrial fulvic and humic acids and aquatic natural organic matter. *Organic Geochemistry* 35, 1141-1149.
- Bae, W., Baek, S., Chang, J. y Lee, Y. (2002). Optimal operational factors for nitrite accumulation in batch reactor. *Biodegradation* 12, 359-366.
- Baker, A. (2001). Fluorescence excitation-emission matrix characterization of some sewage-impacted rivers. *Environmental Science and Technology* 35, 948-953.
- Baker, A. y Genty, D. (1999). Fluorescence wavelength and intensity variations of cave waters. *Journal of Hydrology* 217, 19-39.
- Barker, J. y Stuckey, C. (1999). A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. *Water Research* 33, 3063-3082.
- Bernet, N., Dangcong, P., Delgenés, P. J. y Moletta, R. (2001). Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor. *Journal of Environmental Engineering* 127, 266-271.
- Bougard, D., Bernet, N., Cheneby, D. y Delgenes, J. P. (2006). Nitrification of a high-strength wastewater in an inverse turbulent bed reactor. Effect of temperature on nitrite accumulation. *Process Biochemistry* 41, 106-113.
- Campos, J., Garrido, M. J., Corral-Mosquera, A. y Méndez, R. (2007). Stability of a nitrifying activated sludge reactor. *Biochemical Engineering Journal* 36, 87-92.
- Carrera, J., Baeza, A. J., Vicent, T. y La Fuente, J. (2003). Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system. *Water Research* 37, 4211-4221.
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A. y Booksh, K. (2003). Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science Technology* 37, 5701-5710.
- Coble, P. G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, 325-346.
- Esparza-Soto, D. (2009). Programa Migración para la exportación automática de datos generados por el software Winlab a hojas de cálculo de Excel.
- Esparza-Soto, M. y Westerhoff, P. K. (2001). Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass. *Water Science and Technology* 43, 87-95.
- Esparza-Soto, M., Hernández-Núñez, S. y Fall, C. (2011). Spectrometric characterization of effluent organic matter of a sequencing batch reactor operated at three sludge retention times. *Water Research* 45, 6555-6563.
- Espinosa-Rodríguez, M. A., Flores-Álamo, N., Esparza-Soto, M. y Fall, C. (2012). Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento y decaimiento heterotrófico en el rango de 20-32 °C en un proceso de lodos activados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 309-321.
- Gerardi, M. (2002). *Nitrification and denitrification in the activated sludge process*. Wiley-Interscience. Nueva York. Estados Unidos.
- Ichihashi, O., Satoh, H. y Mino, T. (2006). Effect of soluble microbial products on microbial metabolisms related to nutrient removal. *Water Research* 40, 1627-2826.

- Janhom, T., Wattanachira, S. y Pavasant, P. (2009). Characterization of brewery wastewater with spectrofluorometry analysis. *Environmental Management* 90, 1184-1190.
- Jarusutthirak, C. y Amy, G. (2007). Understanding soluble microbial products (SMP) as component of effluent organic matter (EFOM). *Water Research* 41, 2787-2793.
- Lapidou, C. S. y Rittmann, B. E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products and active and inert biomass. *Water Research* 36, 2711-2720.
- Li, W. H., Sheng, G. P., Liu, X. W. y Yu, H. Q. (2008). Characterizing the extracellular and intracellular fluorescent products of activated sludge in a sequencing batch reactor. *Water Research* 42, 3173-3181.
- Mahvi, A. H., Mesdaghinia, A. R. y Karakani, F. (2004). Nitrogen removal from wastewater in a continuous flow sequencing batch reactor. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7, 1880-1883.
- Mopper, K., Feng, M. Z., Bentjen, B. S. y Chen, F. R. (1996). Effects of cross-flow filtration on the absorption and fluorescence properties of seawater. *Marine Chemistry* 55, 53-74.
- Muñoz-Sánchez, T. J. y Reyes-Mazzoco, R. (2012). Organic matter and nitrogen removal capacity of a new parking for trickling filters. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 279-286.
- Ni, B. J., Rittmann, B. E., Fang, F., Xu, J. y Yu, H. Q. (2010). Long-term formation of microbial products in a sequencing batch reactor. *Water Research* 44, 3787-3796.
- Ross, N., Deschênes, L., Bureau, J., Clément, B., Comeau, Y. y Samson, R. (1998). Ecotoxicological Assessment and effects of physicochemical factors on biofilm development in groundwater conditions. *Environmental Science Technology* 32, 1105-1111.
- Saadi, I., Borisover, M., Armon, R. y Laor, Y. (2006). Monitoring of effluent DOM biodegradation using fluorescence, UV and DOC measurements. *Chemosphere* 63, 530-539.
- Sheng, G. P. y Yu, H. Q. (2006). Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Research* 40, 1233-1239.
- Stedmon, C. A., Markager, S. y Bro, R. (2003). Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* 82, 239-254.
- Wu, C., Peng, Y., Wang, S., Li, X. y Wang, R. (2011). Effect of Sludge Retention Time on Nitrite Accumulation in Real-time Control Biological Nitrogen Removal Sequencing Batch Reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 19, 512-517.
- Xie, W. M., Ni, B. J., Seviour, T., Sheng, G. P. y Yu, H. Q. (2012). Characterization of autotrophic and heterotrophic soluble microbial product (SMP) fractions from activated sludge. *Water Research* 46, 6210-6217.
- Xie, W. M., Ni, B. J., Zeng, R. J., Sheng, G. P., Yu, H. Q., Song, J., Le, D. Z., Bi, X. J., Liu, C. Q. y Yang, M. (2010). Formation of soluble microbial products by activated sludge under anoxic conditions. *Environmental Biotechnology* 87, 373-382.