

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INGENIERÍA

*Bio-reactores Anaerobios de Membrana: Efectividad
de Remoción de Contaminantes y Caracterización de
los Fenómenos de Taponamiento.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

Miguel Herrera Robledo

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Adalberto Noyola Robles
SUPERVISOR TÉCNICO: Dr. Juan Manuel Morgan Sagastume

México DF.

Marzo, 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A Arturo Herrera Vega, mi padre, que con su sabiduría me ha formado

A mi madre Consuelo Robledo Dimas por su amor y enseñanzas

A mis hermanas Elizabeth y Sofía por su apoyo incondicional.

A Friné Mora por su confianza, amor y apoyo

A mis familiares todos

A todos los que creen y trabajan por un mundo donde quepan muchos mundos

A todos los que han muerto en la lucha por la justicia y la liberación de

Latinomérica

Al Frente de los Pueblos en Defensa de la Tierra, por su ejemplo de soberanía,

organización y fortaleza

Al pueblo de Oaxaca cuya valentía, coraje y conciencia de clase debe guiar al

pueblo de México

Agradecimientos

- A la **Universidad Nacional Autónoma de México** que entre sus muros fomenta la crítica sistemática a la vida, al conocimiento e incluso a la razón. Por permitirme ya considerarla mi *alma mater*. Por ser ella bastión de la universidad pública, gratuita y de masas.
- A los miembros del “comité de sabios” que con suma profesionalidad y vasto conocimiento científico realizaron la revisión de este documento.
- A mis asesores **Adalberto y Juan Manuel**, quienes durante el desarrollo de esta investigación lograron transmitirme sus conocimientos, confianza y recursos para que se cumplieran y ampliaran los objetivos fundamentales de este trabajo.
- A los doctores **Nathalie Cabirol, Manuel Salmón Salazar, José Guzmán, Edgar Sierra Palacios Filiberto Guitierrez y Eduardo Villarreal Ramírez** por contribuir con valiosas aportaciones teórico-prácticas al presente estudio.
- A la doctora **Margarita Navarrete Montesinos** por su infinita paciencia y sus notables enseñanzas en el ramo de la fotofísica y el uso del láser.
- A **Margarita Cisneros Ortiz** por su apoyo en varias actividades económico-administrativas que van siempre de la mano en investigaciones científicas.
- A mis compañeros del **Instituto de Ingeniería**: Dulce, Antonio Tinajero, Marcelo, Alocandro, Abril, Atahualpa, Luis Rubio, Alejandra, Lisreve, Bahena, Albar, Miguel, Rodrigo, Angela, Jorge, Rafa, Mauro y todos los demás.
- A todo el **personal académico, administrativo y trabajadores del Instituto de Ingeniería** en especial para Roberto Briones, Pedro Trinidad, Alfredo, Raúl, Ponciano Trinidad, Doña Marina, Lupita Urquiza, Soledad Lucario, Victoria Navarrete, Don Gregorio, Betty, Rosa, Santiago, Catalina Maya, Víctor Franco.
- A **Alejandro** el artesanal y excelente trabajador del vidrio del Instituto de Química.
- A mis profesores del **postgrado en ciencias Bioquímicas** por su excepcional cátedra. A Leticia García y Adelina por el apoyo administrativo.
- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca de Maestría otorgada.
- Al proyecto binacional **CONACyT-NSF 2003-C03-42441** que apoyo con enormes recursos materiales y logísticos la realización de este trabajo.
- Al fondo de becas del **Instituto de Ingeniería** por el estipendio otorgado.
- Al **Sistema Nacional de Investigadores** por su apoyo económico.
- A mis **Compañeros del Posgrado en Ciencias Bioquímicas** en especial a Tania y Martiniano.
- A mis **grandes amistades de diferentes partes del campus** que con sus charlas te mantienen al tanto de los adelantos en todos los ámbitos científicos y sociales en especial la banda del Espacio Estudiantil de Química, a la estrambótica legión de Economía, a los del pulpo de Ciencias.

I. Realidad o Augurio

El sector revolucionario de México piensa en consecuencia, que el nuevo programa del sector revolucionario, será un programa en el que estén considerados los intereses legítimos de todos los sectores sociales del país. Mayor prosperidad para el porvenir. Sin ella, nada es posible del progreso colectivo de la nación. No hay industria que pueda no sólo prosperar, sino mantenerse, en un país en donde la gran mayoría de los consumidores en perspectiva no puede comprar. Pero para esto, es precisa una reforma radical, profunda, de la agricultura mexicana. Hacerla que pase de agricultura tradicional arcaica a la categoría de industria moderna.

Beneficiará este gran plan, ente todo, pues, a la inmensa mayoría del pueblo, integrada por las masas rurales. El proletariado mexicano no podrá prosperar, por tanto, sino a condición de que progresen las masas campesinas. No puede haber crecimiento del proletariado en número, ni progreso suyo en cuanto a prestaciones y salarios, en un país donde las fábricas están detenidas en su desarrollo natural por ausencia de un mercado interior; y no hemos logrado aspirar todavía, por desgracia, a ser un país que exporte, en grande, manufacturas para consumo de otras naciones.

Y lo que se afirma en relación al proletariado, es mucho más cierto con respecto a la clase capitalista. No hay progreso para la burguesía nacional, para los industriales mexicanos, para los banqueros mexicanos, para los técnicos mexicanos, para los comerciantes honestos de México; no hay posibilidad de progreso, de desarrollo en su fortuna lícita, sino a condición de que el campesino mexicano eleve su nivel de vida y de que se multiplique, como factor de consumo, el proletariado incipiente en nuestro país.

No afirmamos, sin embargo, que el paso trascendental que México debe dar, iniciándolo en la posguerra, ha de ser el de mejorar nuestra agricultura para seguir siendo un país agrícola, aunque de agricultura moderna. Es evidente que el porvenir agrícola de México está en los productos de alto precio, de gran rendimiento, tratándose de la agricultura del altiplano, y en el desarrollo de la agricultura tropical. Pero el porvenir económico de México depende, principalmente, de su desarrollo industrial.

Industrializar a México, revolucionar a nuestro país mediante las industrias, hacer de la producción una unidad indivisible, de acuerdo con un plan previsor, lleno de estímulo, es la única solución que puede ofrecerse a un país que no sólo quiere vivir mejor –vieja aspiración secular- sino que va a ser objeto o puede serlo en la posguerra, de la intromisión de poderosas fuerzas del extranjero.

Vicente Lombardo Toledano (1944), "Por la industrialización de México" en El nuevo programa del sector revolucionario de México.

II. El mal presagio se cumplió, la respuesta es el combate

Hay que tener un gran sentido de humanidad, un gran sentido de la verdad y de la justicia para no caer en extremos dogmáticos, en escolasticismos fríos, en aislamientos de las masas. Todos los días hay que luchar por que ese amor a la humanidad se transforme en actos concretos, en actos que sirvan de ejemplo, de movilización.
Ernesto Guevara de la Serna (1967).

¡Más de un millón de personas en la sexta megamarcha de la APPO!
Periódico Noticias, (Noviembre 5, 2006). Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México

¡Fox, entiende, la tierra no se vende!
Consigna del FPDT (2001)

Es necesaria una cierta dosis de ternura para comenzar a andar con tanto, tanto en contra. Es necesaria una cierta dosis para encontrar en esta oscuridad un pedacito de luz...pero a veces no basta con una cierta dosis de ternura y es necesario agregar...es necesario agregar...es necesario agregar... una cierta dosis...de plomo... una cierta dosis... pero de plomo...para quitar de en medio a tanto y tanto hijo de puta que anda por ahí...que anda por ahí.

Declaración de Principios (extracto), EZLN (1994).

Índice

			Pag.
1 RESUMEN			5
2 ABSTRACT			6
3 INTRODUCCIÓN			7
	3.1 Justificación		9
4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS			10
	4.1 Tecnología de Membranas		10
	4.2 Bio-reactores de Membrana (BRM)		12
		4.2.1 Configuraciones de BRM	13
	4.3 Taponamiento en BRM		15
		4.3.1 Mecanismo Básico de Retención de Partículas: La Capa Eléctrica Dual (CED)	15
		4.3.2 El Modelo de Resistencia para el análisis de los factores que influyen el flujo de agua a través de membranas	16
		4.3.3 Flujo Crítico	19
		4.3.4 Precipitación de Solutos en la superficie de membranas	19
		4.3.5 <i>Biofouling</i> y Depósitos de Materia Orgánica en la superficie de Membranas	21
		4.3.6 <i>Biofouling</i> en membranas acopladas a Bioreactores Anaerobios	24
	4.4 Biomineralización		25
		4.4.1 La Biomineralización y sus perspectivas de estudio	25
		4.4.2 Mineralización Biológicamente Inducida (MBI)	26
		4.4.3 Mineralización Biológicamente Controlada (MBC)	26
5 PLANTEAMIENTO, OBJETIVOS E HIPÓTESIS			29
	5.1 Planteamiento del problema		29
	5.2 Hipótesis		30
	5.3 Objetivos		30
	5.4 Estrategia general de trabajo		31
6 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL			32
	6.1 Características de las Instalaciones		32
	6.2 Control del Sistema		33
		6.2.1 Inoculación de <i>Ascaris suum</i>	34
	6.3 Identificación de los Microorganismos Asociados a la Biopelícula		35
	6.4 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) sobre la Membrana- Espectroscopía por Dispersión de Energía (EDS)		36
	6.5 Determinación de las Propiedades Mecánicas de la Biopelícula Mediante Optoacústica Pulsada (láser)		37
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN			37
	7.1 Flujo Crítico y Velocidad de Taponamiento		37
	7.2 Taponamiento en Operación a Largo Plazo		39

	7.3 Remoción de Contaminantes		41
	7.4 Formación y Superposición de Biopelículas durante la filtración a largo plazo		44
		7.4.1 Taponamiento en función del tiempo. Hipótesis de colapso/compresión	44
		7.4.2 Optoacústica Pulsada y Propiedades Mecánicas de las Biopelículas.	49
	7.5 Identificación de Microorganismos asociados a la biopelícula		52
		7.5.1 Identificación de microorganismos	52
		7.5.2 Papel de los microorganismos en la biopelícula	54
	6.6 Integración de resultados: Perspectiva Biológica		55
	8 CONCLUSIONES		60
	9 BIBLIOGRAFÍA		62
	APÉNDICES		67
	A Tiempo de Retención Celular (TRC) y Volumen de Lodo Purgado en los Bio-Reactores		68
	B Índice de Taponamiento (<i>Silt Density Index, SDI</i>)		69
	C Difractogramas de EDS		72
	D Determinación de flujo crítico		73
	E BLAST		75

Abreviaturas utilizadas en el presente estudio

Abreviatura	Significado
ADN	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
BPC	<i>bifenilos policlorados</i>
BRAM	<i>Bio-reactores Anaerobios de membrana</i>
BRM	<i>Bio-reactor de membrana</i>
CED	<i>Capa eléctrica dual</i>
CF	<i>Coliformes fecales</i>
CNA	<i>Comisión Nacional del agua</i>
Da	<i>Dalton, unidad de masa atómica</i>
DBO	<i>Demanda Bioquímica de Oxígeno</i>
DQO	<i>Demanda Química de oxígeno</i>
E	<i>Módulo de Elasticidad</i>
EDS	<i>Espectroscopía por dispersión de energía</i>
G	<i>Módulo de rigidez</i>
HCC	<i>Hipótesis de Colapso y compresión</i>
HH	<i>huevos de helminto</i>
Jc	<i>Flujo crítico</i>
MBC	<i>Mineralización biológicamente controlada</i>
MBI	<i>Mineralización biológicamente Inducida</i>
MEB	<i>Microscopía Electrónica de Barrido</i>
MF	<i>Microfiltración</i>
μ	<i>Viscosidad del agua</i>
NCBI	<i>National Centre For Biotechnology Information</i>
NF	<i>Nanofiltración</i>
OAP	<i>Optoacústica pulsada</i>
OI	<i>Ósmosis Inversa</i>
PCR	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
PTAR	<i>Planta de tratamiento de agua residual</i>
PTM	<i>Presión transmembrana</i>
Rt	<i>Resistencia de la membrana</i>
SDF	<i>Sólidos disueltos fijos (inorgánicos)</i>
SDI	<i>Silt density index, índice de taponamiento</i>
SDT	<i>Sólidos disueltos totales</i>
SDV	<i>Sólidos disueltos volátiles (orgánicos)</i>
SPE	<i>Sustancias poliméricas extracelulares</i>
SSF	<i>sólido suspendidos fijos (inorgánicos)</i>
SST	<i>sólidos suspendidos totales</i>
SSV	<i>sólidos suspendidos volátiles (orgánicos)</i>
STF	<i>Sólidos totales fijos (inorgánicos)</i>
STT	<i>Sólidos totales totales</i>
STV	<i>Sólidos totales volátiles (orgánicos)</i>
TGGE	<i>Gel de electroforesis con gradiente de temperatura</i>
TNL	<i>Temperatura de nitrógeno líquido</i>
TRC	<i>Tiempo de retención celular</i>
TRH	<i>Tiempo de retención hidráulica</i>
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Bioreactor</i>
UF	<i>Ultrafiltración</i>
UNAM	<i>Universidad Nacional Autónoma de México</i>
ν	<i>Módulo de Poisson</i>

1 *Resumen*

En una planta escala laboratorio se evaluó el efecto del tiempo de retención celular (TRC) sobre la remoción de contaminantes durante la operación de dos bio-reactores anaerobios (del tipo UASB) de membrana (BRAM) mediante el seguimiento de los parámetros fisicoquímicos, hidráulicos y biológicos. Se comprobó que el efluente de estos sistemas cumple con la normatividad mexicana para la reutilización de agua NOM-003-SEMARNAT-1997.

El fenómeno de taponamiento fue simulado de acuerdo a los ciclos normales de operación de una planta de bio-reactores. El comportamiento de filtración fue estudiado en ambos módulos de ultrafiltración, compuestos por una membrana hidrófoba de polietersulfona (PES) con 40 kDa de tamaño de corte de peso molecular, utilizando el modelo de resistencia ($\text{Flux} = J = \text{PTM}/\mu\text{Rt}$). Se encontró que este se comportaba de acuerdo al mecanismo de dos etapas típico en experimentos de filtración, es decir: en primera instancia un decremento exponencial en el flujo de permeado (con un correspondiente incremento en la presión aplicada) seguido por una etapa "estacionaria" en la cual el flux se mantenía relativamente constante. Durante la operación a largo plazo del sistema, en esta segunda etapa se presentaron decrementos marcados y de menor amplitud en el flujo de permeado. Cada uno con su correspondiente estado pseudo-estacionario. De acuerdo con la teoría de formación de biopelículas en sistemas de filtración, cada etapa estacionaria es referida a la consolidación de bio-películas microbiana, de tal forma que la discusión de esta serie de fenómenos se encuentra dirigida hacia la sobreposición de biocapas taponantes. Para corroborar esta hipótesis, se realizó una autopsia de las membranas taponadas después de 510 horas de filtración intermitente. Para ello se efectuaron determinaciones gravimétricas, estudios microscópicos de la ultraestructura del material mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), ensayos con optoacústica pulsada, microanálisis de las superficies por espectroscopia por dispersión de energía (EDS) y se identificaron los microorganismos asociados a la biopelícula mediante metodologías de biología molecular.

Los datos obtenidos soportan la hipótesis que la biopelícula está formada por capas superpuestas de películas semipermeables en las que se encuentran mezclados compuestos orgánicos e inorgánicos dentro de la matriz que la constituyen.

La organización tridimensional de la bio-película, la presencia de elementos inorgánicos cuya solubilidad es pobre (compuestos de Ca, Mg, Fe, P y Si), la confirmación genética de existencia de microorganismos secretores de sustancias poliméricas extracelulares, los decrementos escalonados en el flujo a través de la membrana, sin dejar de lado las condiciones microambientales predominantes dentro de la membrana tubular permitieron fundamentar dos mecanismos de formación de las bio-películas superpuestas: una es la hipótesis de colapso-compresión de biopelículas (HCC) y el otro es la mineralización biológicamente inducida (MBI) que se discuten con bases ingenieriles, estructurales y biológicas.

2 *Abstract*

The effect of the sludge retention time (SRT) over fouling transients and pollutants removal in a dual anaerobic membrane bio-reactor (ANMBR) was evaluated. The effluent of AMBR systems meet the mexican regulation for water reclamation (NOM-003-SEMARNAT-1997).

The fouling phenomena was simulated and studied in both ultrafiltration modules ($7.2 \times 10^{-3} \text{ m}^2$, polyether sulphone, PES, hydrophobic membrane with 40kDa of molecular weight cut off). Membrane fouling was evaluated according Darcy's postulate. It was observed that flux decline was related with a typical two step mechanism in filtration studies: on a first instance an exponential drop happened (with it's co-related exponential rise in transmembrane pressure, TMP) and the beginning of a longer step with practically no variation of TMP and flux (slope near to zero).

It was also observed that during long-term operation, several drops in flux took place, each of them appeared with corresponding pseudo steady state. In filtration theory, every stationary stage is related to biofilm development and, in accordance with this, the overall discussion was focused over cake layer overpositionning.

After long-term filtration experiments and in order to validate these ideas, a membrane autopsy was performed including: gravimetric measurements, scanning electron microscopy and energy dispersion spectroscopy and optoacustics studies in fouled membranes. Moreover, using molecular biology techniques, the microbial dynamics on the biofilm were determined.

Experimental facts support the hypothesis of cake layer overpositionning and in addition it was found that inside of biofilm structure there were organic-inorganics associations.

Ultrastructure determination, presence of inorganics with poor solubility rate (such as calcium, magnesium, iron, phosphorus and silica), genetic evidence of EPS related with microbial consortia, periodical drops in flux and the extreme microenvironmental conditions were the main elements that led to a possible explanation of that behaviour. Apparently, two supra-macromolecular chemistry mechanisms were involved in biofilm development: one of these is the biological induced mineralization (MBI) that happens with ionic attractions between the matrix of EPS that surrounds the microorganisms and the low soluble inorganic compounds. The other mechanism is the collapse-compression of biofilm structure that initially involves a pore redistribution and biofilm collapse followed by a structural compression while TMP rises. Both mechanisms are discussed with engineering, structural and biological basis.

3 *Introducción*

Los sistemas de filtración mediante membranas constituyen actualmente la principal innovación tecnológica en los procesos de tratamiento de agua residual; además de acuerdo a su funcionalidad y eficacia se han convertido en el desarrollo más importante desde la consolidación del sistema de lodos activados de Arden y Lockett en 1914 (Adham et al, 2001). La integración de membranas dentro de la secuencia de tratamiento de agua residual no sólo facilita la separación de la biomasa sino que también favorece la separación de otros sólidos suspendido, por lo tanto permite que el proceso convencional pueda operarse sin las a veces complicadas operaciones unitarias de clarificación, sedimentación y/o floculación. El uso de membranas de ultra o microfiltración, y de ósmosis inversa se ha vuelto una opción atractiva en lugares en donde los requisitos normativos son muy estrictos, como en Europa y los EUA, o bien en los que se requiere de la reutilización directa del agua tratada.

La tecnología de membranas filtrantes fue concebida y desarrollada para intentar hacer potable el agua del mar, al principio de la década de 1960, utilizando diversos sistemas de ósmosis inversa, sin embargo los gastos de operación resultaban muy elevados al trabajar con altas presiones. Veinte años después se comenzó a utilizar en la Florida un sistema de nanofiltración para remover dureza del agua subterránea mientras que en Noruega se utilizó para decolorar agua proveniente de zonas ricas en humus. Pero el despunte de la tecnología de membranas en el área del tratamiento de agua residual, ocurrió al inicio de 1990 cuando fueron desarrolladas las membranas de separación de partículas (microfiltración, ultrafiltración) para reutilizar agua residual.

El aumento en la escala además del continuo mejoramiento de los sistemas de membrana han sido factores importantes que han tornado viable el diseño de nuevos y más eficaces sistemas de filtración, tanto que en países desarrollados, existen grandes plantas que utilizan membranas con caudales de hasta 10 000 m³/d.

Los principales factores que han favorecido la adopción de los sistemas de filtración y que permiten prever una incursión mayor en el mercado, son:

- El rápido descenso en los costos de operación y construcción de sistemas de filtración ha tornado a la tecnología de membrana como competencia directa con los sistemas convencionales de tratamiento.
- Los límites para patógenos y para contaminantes químicos en aguas para consumo humano y para la reutilización de efluentes de plantas de tratamiento de agua residual están siendo progresivamente reducidos por las autoridades pertinentes. Actualmente cumplir con la normatividad requiere la adopción de tecnologías complementarias de alto costo por lo que en muchos casos ha tornado viable la adopción de un sistema de filtración con membranas.
- El progresivo agotamiento de los manantiales de agua potable combinado con la creciente demanda de agua para consumo humano y para la producción agrícola e industrial ha forzado al sector encargado del saneamiento básico a cambiar su filosofía de operación. Uno de los aspectos importantes de ese análisis es el que gran parte del

uso de agua en centros urbanos no requiere de agua con calidad de consumo humano y bien podría ser atendido con agua reutilizada de diferentes calidades.

Los módulos de membrana comenzaron a usarse únicamente como tratamiento terciario o en algunos casos como tratamiento secundario. Hoy en día, el sistema biológico de depuración de agua residual más eficiente es el Bioreactor de Membrana (BRM), que agrupa los beneficios del tratamiento biológico y de los sistemas de separación de partículas. En muchos países se han desarrollado numerosos sistemas y adecuaciones de BRM en sistemas aerobios mientras que las aplicaciones anaerobias se encuentran en etapa experimental con promisorias oportunidades de aplicación. La característica más importante de los BRM es la retención de la totalidad de la materia suspendida y coloidal además de algunas sustancias solubles (polipéptidos y proteínas extracelulares o bien sales de ácidos grasos de cadena larga). El resultado es la excelente calidad del efluente que generalmente cumple con la normatividad y amplía las posibilidades de su reutilización. El más grande éxito de una planta de BRM se encuentra en Singapur (llamado NEWater Project) operando con dos módulos de filtración (MF/OI), seguidos de uno de cloración y uno de UV, que es capaz de proporcionar agua de calidad potable a partir de aguas negras con un caudal de 10 000 m³/ día (Hoon Hyung, 2004).

Entre las limitaciones asociadas a esta tecnología se encuentran los altos costos de instalación y operación así como la escasa experiencia de la aplicación de estos materiales en el tratamiento del agua residual. A pesar de ello, la tendencia actual en el mercado de membranas es aumentar la producción y por lo tanto abatir el costo en virtud de la creciente aceptación de estas tecnologías alrededor del mundo. En particular, el taponamiento de la membrana, ya sea por precipitación de sustancias químicas o bien por la formación de una biopelícula, es un aspecto particularmente limitante, ya que incrementa el consumo de energía y en los costos de operación. Sin duda el estudio de los microambientes que se forman en las películas taponantes ofrece oportunidades para investigar los fenómenos de superficie y la sinergia entre especies microbianas, elucidadas parcialmente mediante microscopía y otras metodologías convencionales.

Una de las principales contribuciones de la tecnología de membranas filtrantes es que han podido ser adaptadas en sistemas compactos que producen agua reutilizada de alta calidad a un precio competitivo en relación a los sistemas convencionales. Esta alternativa podría ser viable en ciertos casos y deberá merecer una atención especial por parte de los responsables o usuarios de los sistemas de tratamiento de agua residual con fines de reutilización. Este trabajo fue enfocado en el desarrollo de bio-reactores anaerobios (UASB) de membrana con la intención de generar conocimiento acerca de los fenómenos de taponamiento y las principales causas involucradas en el desarrollo de capas taponantes.

3.1 Justificación del estudio

Nuestro país cuenta con 1433 de plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) (www.cna.gob.mx, 2006) tanto en el sector público como en el privado. Sin embargo todas ellas sólo alcanzan a depurar un pequeño porcentaje del agua de desecho generada (se calcula el 30%) por lo que se torna obligatoria la construcción de ese tipo de infraestructura. En nuestro país, carente de la infraestructura necesaria de PTAR, la construcción de plantas que operan con membranas resultaría, en ciertos casos, más económica a largo plazo ya que presentan tamaños compactos y los gastos de operación se irían abatiendo conforme se avanza en la tecnología de los materiales de fabricación de las membranas, como reportan varios autores (Ben Aim, 2004; Adham *et al.*, 2001). Por estas razones es menester comenzar a estudiar a nivel laboratorio el desempeño de membranas asociadas a otra tecnología promisorio para resolver problemas de tratamiento de agua en estas regiones tropicales, el reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB). La meta de este trabajo será entonces contribuir con conocimiento fundamental para el desarrollo y puesta en marcha de PTAR a escala real que operen con membranas acopladas a bio-reactores anaerobios.

4 Fundamentos Teóricos

4.1 Tecnología de membranas.

Una membrana podría definirse como una superficie sólida y delgada que separa dos soluciones al actuar como barrera selectiva para el transporte de algún componente de estas soluciones cuando se aplica una fuerza externa (ver Figura 4.1). Para el caso del tratamiento del agua las fuerzas externas asociadas son presión, succión (presión negativa) o potencial eléctrico. Un líquido después de atravesar la membrana se transforma en permeado mientras que el que no pasa se llama concentrado o rechazo. Resulta útil resaltar que las membranas son sistemas de separación de materiales, es decir, no se llevan a cabo reacciones químicas o transformaciones biológicas durante el proceso de filtrado. La selectividad de una membrana es variada por medio de la modificación del tamaño de los poros o bien por la alteración de las propiedades fisicoquímicas de los polímeros que componen la membrana, principalmente de los polímeros localizados en la superficie.

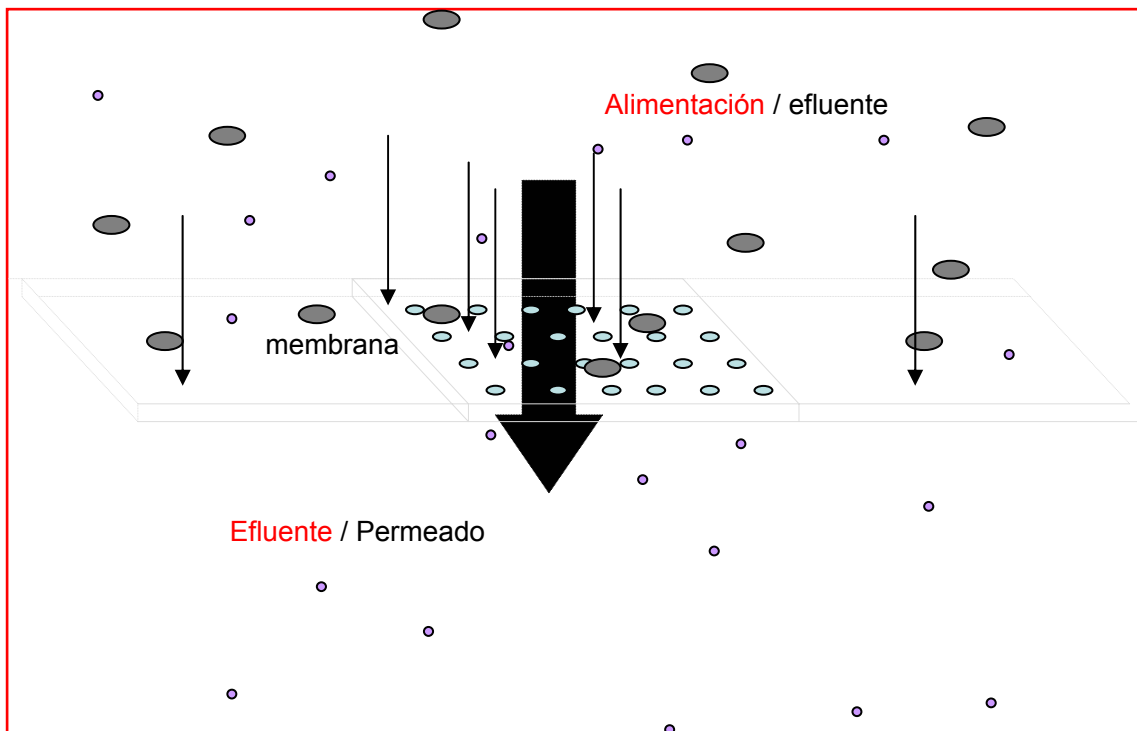


Figura 4.1. Esquema básico del funcionamiento de una membrana.

porosidad interno, es decir, la membrana forma una delgada película filtrante situada sobre una estructura más gruesa, porosa y resistente, responsable de la estabilidad mecánica del conjunto, estas membranas generalmente están constituidas de un mismo polímero; las membranas de tercera generación o compuestas son estructuras conformadas por dos o más tipos diferentes de polímeros en donde el material utilizado en la manufactura de la película filtrante difiere del polímero utilizado como soporte. Estas membranas propician una importante reducción en el costo de operación de los sistemas de UF, NF y OI tanto que son las que dominan el mercado. La resistencia a la filtración y la selectividad son determinadas por la película filtrante, cuyo grosor varía entre 0.1 y 0.5 μ m, que corresponde apenas al 1% del total del espesor de la membrana (Schneider y Tomoyuki, 2001).

4.2 *Bioreactores de Membrana*

La tecnología de bioreactores de membrana (BRM) combina la operación unitaria de filtración con el tratamiento biológico. Estos sistemas utilizan membranas de micro y/o ultrafiltración que permiten la retención de sólidos coloidales y suspendidos, lo que incluye a la biomasa, además de que han demostrado su utilidad en la remoción de microorganismos patógenos, huevos de helminto y de algunas macromoléculas solubles. En los últimos años se ha incrementado el interés sobre el uso de reactores con membranas en proyectos de tratamiento y reutilización de aguas residuales domésticas e industriales que incluyen irrigación agrícola, usos industriales como agua de enfriamiento, agua para parques de recreación y para protección contra incendios, entre otros. Los bioreactores de membrana tienen el potencial para subsanar las limitaciones que presentan los reactores biológicos convencionales en el tratamiento y reutilización de aguas residuales domésticas ya que:

- (1) Permiten tiempos de residencia de sólidos muy largos;
- (2) Tienen una alta capacidad para remover microorganismos patógenos;
- (3) Permiten separar a la biomasa del líquido mezclado sin utilizar la fuerza de gravedad, por lo que la sedimentación secundaria puede reemplazarse permitiendo un diseño de planta sumamente compacto;
- (4) Se obtiene un efluente sin materia en suspensión y,
- (5) Cierta tamaño de moléculas solubles de alto peso molecular son retenidas en la membrana contribuyendo con este proceso a la disminución de la DQO y la DBO.

No sólo existen múltiples y exitosos estudios a escala piloto que ilustran la capacidad de los BRM sino que también existen plantas que trabajan a escala real operando exitosamente en varias partes del mundo como en Europa Occidental, Japón, Corea del Sur, Canadá, y los EUA. Entre las aplicaciones industriales más frecuentes se encuentran, el reciclaje en edificios de oficinas (Yokomizo *et al.*, 1994), el tratamiento de efluentes municipales de pequeñas poblaciones (Buisson *et al.*, 1998), el tratamiento de efluentes industriales (Berube y Hall 2001), y la depuración de lixiviados de rellenos sanitarios (Wehrle *et al.*, 1997, 1998).

Entre las limitaciones asociadas a esta tecnología se encuentran los altos costos de instalación y operación así como la falta de experiencia en aplicaciones de estos materiales en el tratamiento del agua residual. No obstante, la tendencia actual en el mercado de membranas es la de incrementar el volumen de producción y por lo tanto abatir el costo en virtud de la creciente aceptación de estas tecnologías alrededor del mundo (Ben Aim, 2004).

Por otro lado, algunas características inherentes a los BRM los han convertido en una alternativa real a los tratamientos convencionales. Su cualidad más importante es que, debido a la retención de la totalidad de la materia suspendida y coloidal además de algunas sustancias solubles, el efluente de estos bioreactores es de excelente calidad y generalmente cumple con la normatividad permitiendo mayores posibilidades para la reutilización de aguas negras y grises. El más grande éxito de una planta de BRM se encuentra en Singapur operando con dos módulos de filtración (MF/OR), uno de cloración y uno de UV, y que es capaz de proporcionar agua de calidad potable, reutilizada en consumo industrial y en contacto indirecto en casas-habitación, a partir de aguas negras (Hoon Hyung *et al.*, 2004).

Es de interés comentar que, al utilizar membranas de UF y de MF, se garantiza la desinfección del agua tratada ya que son retenidos virus, bacterias patógenas y huevos de parásitos. Por otro lado, debido a que la concentración de sólidos suspendidos puede ser mejor controlada, al no depender de la sedimentación, es posible incrementar significativamente la población de microorganismos y el tiempo de retención celular (TRC) lo que además logra que el sistema cuente con una completa autonomía entre el tiempo de retención celular (TRC) y el tiempo de retención hidráulica (TRH), que le otorga flexibilidad a la operación. Además de retener la biomasa, la unidad de membrana también previene el escape de enzimas extracelulares y de algunos oxidantes solubles, por lo que el lodo biológico se torna más activo y por lo tanto, aumenta su capacidad de degradación.

Un sistema de BRM elimina las dificultades asociadas al proceso de sedimentación, muchas veces el cuello de botella del proceso de tratamiento de agua residual. Esto permite que la concentración de biomasa dentro del bioreactor alcance niveles elevados; esta característica ofrece la oportunidad de tratar agua residual con alta carga orgánica y, al mismo tiempo, obtener baja producción de biomasa. En esencia, es esta característica la que permite la construcción de plantas de tratamiento de un tamaño más compacto (y con mayor capacidad de depuración) que las de un tratamiento convencional. Los BRM permiten, por otro lado, la retención de compuestos orgánicos remanentes de alto peso molecular. Barker y Stuckley (1999) realizaron una revisión acerca del perfil de peso molecular de los compuestos solubles de origen microbiano retenidos en diversas membranas de UF encontrando que presentaban un amplio intervalo de pesos moleculares (tres fracciones: menor de 0.5, mayor de 50kDa y entre ambos tamaños) y que esta distribución se veía afectada por las condiciones de operación de los bioreactores; por ejemplo se reportó que predominan los compuestos de alto peso molecular cuando el TRC es alto (mayor a 15 días en sistemas anaerobios).

Hasta hace unos años, la principal desventaja asociada a estos sistemas radicaba en el costo, no obstante en este momento esa tendencia se ha revertido ya que nuevas empresas han comercializado masivamente membranas de materiales de bajo costo y se espera que en los próximos años se conviertan en el proceso más económico y de mayor efectividad. Los nuevos materiales de las membranas se han desarrollado para disminuir los costos relacionados con el gradiente de presión y se espera que en un futuro cercano estos precios se abatan aún más debido al incremento de la oferta (Ben Aim, 2004).

4.2.1 Configuraciones de los Sistemas de BRM

Los bioreactores de membrana están compuestos de dos partes: una es la unidad biológica responsable de la biodegradación de los contaminantes y la otra es un módulo que se encarga de la separación física del agua tratada y el licor de mezcla. De acuerdo a su configuración, los sistemas de BRM pueden ser clasificados en dos grandes grupos. El primer grupo recibe el

nombre de bioreactor de recirculación (o externo) la cual involucra la recirculación del licor mezclado a través de un módulo de membrana adyacente. La fuerza de filtración es proporcionada por la presión creada por la velocidad de flujo a lo largo de la superficie de la membrana (Figura 4.3a).

La segunda configuración comúnmente conocida como BRM integrado (sumergido, interno) consta de una unidad de membrana sumergida en el bioreactor de tipo aerobio (Figura 4.3b). La fuerza transversal a través de la membrana se logra presurizando el bioreactor o bien creando una presión negativa en el permeado, que es lo más común. El lavado de la unidad de membrana se lleva a cabo por retrolavados con el permeado y mediante un periódico lavado químico. Es muy común el uso de difusores, los cuales son colocados debajo del módulo de membrana para facilitar la limpieza de la superficie de filtración, de esta manera la aireación y el mezclado son llevados a cabo por la misma unidad. Se han desarrollado sistemas con compartimientos anóxicos y/o anaerobios que pueden trabajar de manera simultánea en la remoción de los nutrientes biológicos (Ergas *et al.*, 2001).

De acuerdo a una revisión publicada por Adham *et al.* (2001), la aparición de membranas poliméricas más baratas y elásticas que trabajan con bajos requerimientos de presión y grandes flujos de permeado han potenciado el uso de BRM sumergidos siendo esta la configuración más extensamente estudiada y vendida.

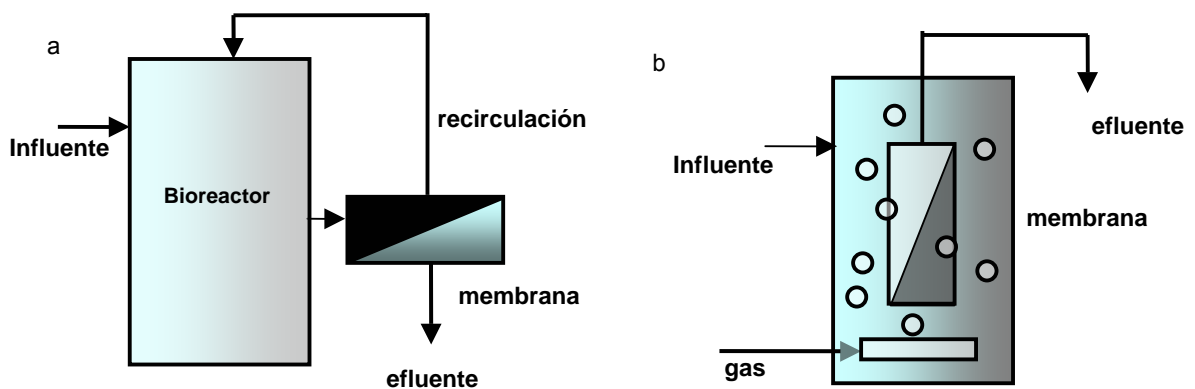


Figura 4.3. Esquemas que representan las dos principales configuraciones de bioreactores de membrana.
a) MBR en serie o de recirculación y, b) MBR integrado o sumergido.

Muchos tipos y configuraciones de membranas han sido usados en sistemas de BRM, se incluye las membranas tubulares, de plato, en espiral, de disco rotatorio, de fibra hueca; fabricadas de materiales orgánicos (polietileno, polietersulfona, polisulfona, poliolefina, poliamida, polivinilpirrolidona, etc), de cerámicas (inorgánicas) y también unidades metálicas de micro y ultrafiltración. El tamaño del poro oscila desde 0.01 hasta 0.4 μ m. El flux obtenido se encuentra en el rango de 0.05 y 10 $m^3mP^{-2}d^{-1}$ y depende en gran medida del material de la membrana, de la configuración en que es usada y del agua que recibe. Los valores típicos de las membranas de poro superficial se han reportado del orden de 0.5 a 2 $m^3m^{-2}d^{-1}$ y los de membranas de filtración interna oscilan entre 0.2 a 0.6 $m^3m^{-2}d^{-1}$ a 20°C. El intervalo de trabajo de presión transmembrana (PTM) es del orden de 20 a 500 kPa para membranas de poro superficial y de -10 a -80 kPa (presión negativa) para las membranas de filtración interna (Schneider y Tumuyuki, 1996).

La selección de la membrana en los sistemas de BRM es un proceso complejo y depende de las características del agua a depurar. Existen varios textos en donde se pueden revisar los criterios

de selección del material de la membrana y las configuraciones así como su impacto sobre los parámetros de operación del BRM (Schneider y Tomoyuki, 2001; Judd y Jefferson, 2003).

4.3 Taponamiento en BRM.

4.3.1 Mecanismo básico de retención de partículas: La Capa Eléctrica Dual.

Prácticamente todos los polímeros utilizados en la fabricación de membranas orgánicas tienen superficies con carga eléctrica negativa, eso mismo ocurre con la mayoría de las partículas disueltas y las partículas coloidales que contiene el agua natural o residual (Hunter & Liss, 1979). Todos los ambientes acuáticos son electrolitos, es decir, poseen diversas cantidades de iones disueltos. En estos medios, la atracción de cationes y la repulsión de aniones por la presencia de superficies con carga eléctrica negativa alteran el equilibrio iónico en el volumen de líquido que está en contacto con la superficie. Esta zona, en donde la distribución de los iones en el líquido es alterada por la presencia de los campos eléctricos de las superficies de la membrana o bien de las partículas, se llama capa eléctrica dual (CED) (Shaw, 1975).

La capa eléctrica dual posee dos zonas distintas: los iones adsorbidos directamente en la superficie del polímero forman la capa de Stern, cuyo grosor corresponde al volumen de hidratación de estos iones mientras que la capa difusa, adyacente a la capa de Stern, abarca toda la parte del líquido cuyo equilibrio iónico fue alterado por presencia de la membrana. La CED proyecta los planos de repulsión electrostática que provienen de las cargas eléctricas desde la superficie hasta el interior del medio líquido (Figura 4.4). El grosor de la CED depende de la concentración de iones en el medio; cuanto mayor sea la cantidad de iones la capa será más compacta, porque habrá más iones disponibles para compensar la carga eléctrica negativa de las superficies. En las superficies con potencial eléctrico por debajo de 25mV, que incluye a la mayoría de los polímeros utilizados en la fabricación de membranas, el espesor de la CED depende de la composición iónica de la solución y de la concentración de iones (Schneider y Tomoyuki, 2001).

En una membrana, las partículas con carga eléctrica igual a la de la membrana, son afectadas por la repulsión electrostática de la membrana a una distancia correspondiente a la suma de las CED de la membrana y de la partícula. Este efecto es reforzado en el interior de los poros, en donde la repulsión ocurre en las extremidades de la partícula y en las paredes de la membrana y por lo tanto, el diámetro efectivo de los poros disminuye. Sin embargo, la CED es sólo uno de los mecanismos que restringen el diámetro de los poros de una membrana. La formación de una capa de hidratación en la superficie de la membrana contribuye asimismo en la disminución del diámetro efectivo de los poros esto, debido a que el agua de la capa de hidratación se encuentra fuertemente enlazada por lo que se torna poco disponible para procesos de transporte provocando de esta manera la reducción del tamaño de los poros disponibles para el paso de agua en el interior del poro. La acción combinada de todos los efectos de reducción de diámetro efectivo de poros es interpretada por algunos autores como un incremento en la viscosidad del agua en la proximidad y en el interior de los poros (Wiesner y Aptel, 1996).

Una gran variedad de factores, la mayoría poco comprendida, influencia el rechazo de los solutos por membranas: las dimensiones del soluto (ión, molécula o partícula), morfología de los componentes retenidos, tamaño de los poros, carga eléctrica de la membrana y de los solutos, rugosidad y propiedades químicas de la superficie, propiedades fisicoquímicas de la solución a

filtrar así como la hidrodinámica de filtrado. La importancia relativa de cada factor depende del tipo de membrana, de la operación del módulo y de la naturaleza del soluto rechazado.

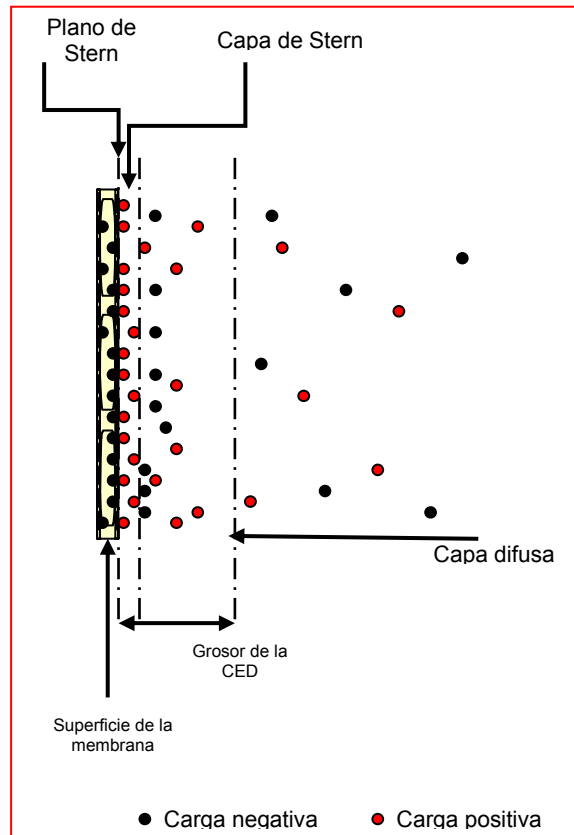


Figura 4.4. Estructura de la capa eléctrica dual (CED).

4.3.2 El modelo de resistencia para el análisis de factores que influyen el flujo de agua a través de las membranas. Postulado de Darcy

Existen varias maneras diferentes de modelar la influencia de factores externos sobre el flujo a través de membranas. El modelo más simple y de uso más extendido es el modelo de resistencia o ley de Darcy. En este modelo, el flujo (J) a través de la membrana depende de la presión de filtración o transmembrana (PTM , ΔP), de la viscosidad dinámica del agua ($\mu = [0.001 \text{ kg/m s}]$) y de la resistencia de la membrana (R_m expresada en m^{-1}):

$$J = \frac{PTM}{\mu R_m} = \left| \frac{\text{litros}}{\text{m}^2 \text{h}} \right| = [LMH] \text{ Abreviatura por convención}$$

La Tabla 4.2 muestra los valores típicos de resistencia de membrana y presiones de operación para las membranas más utilizadas en tratamiento de aguas.

TABLA 4.2. RESISTENCIA Y PRESIÓN DE OPERACIÓN DE MEMBRANAS UTILIZADAS EN DEPURACIÓN DE AGUA (WIESNER Y APTEL, 1996).

Proceso	Valores aproximados de Resistencia de membrana (m^{-1})	Presiones de operación (Atm)
MF	10^6	0.3-1.5
UF	10^7	0.5-1.5
NF	10^8	3.5-10
OI	10^{10}	8-80

Los principales mecanismos de rechazo en membranas de micro y ultrafiltración son (Schneider y Tomoyuki, 2001):

- Retención física de partículas, iones o moléculas con diámetro mayor que el de los poros en la superficie de la membrana;
- Bloqueo físico de poros por partículas o moléculas con diámetro semejante al de los poros;
- Adsorción de material en el interior de los poros, y
- Tasas reducidas o impedimento en la difusión de sustancias a través del polímero de la membrana.

En los procesos de depuración utilizados en el tratamiento de aguas residuales, este último punto es crítico ya que incluye factores determinantes en la disminución del flujo y en la resistencia de la membrana, tales como: 1) fenómenos operacionales como la formación de una capa de concentración/polarización; 2) la formación de aglomerados de material retenido en la superficie de la membrana; 3) el desarrollo de geles o capas de precipitados salinos (*fouling* químico) y; 4) la aparición de biopelículas debidas al desarrollo de especies microbianas y los componentes del agua residual (*biofouling*). El fenómeno de concentración/polarización se refiere al gradiente de concentración de materiales rechazados por la membrana, que se forma en la capa límite del medio, justo encima de la membrana o bien sobre el aglomerado de material retenido, cabe destacar que el flujo dentro de la zona de concentración/polarización es laminar (Figuras 4.5 y 4.6).

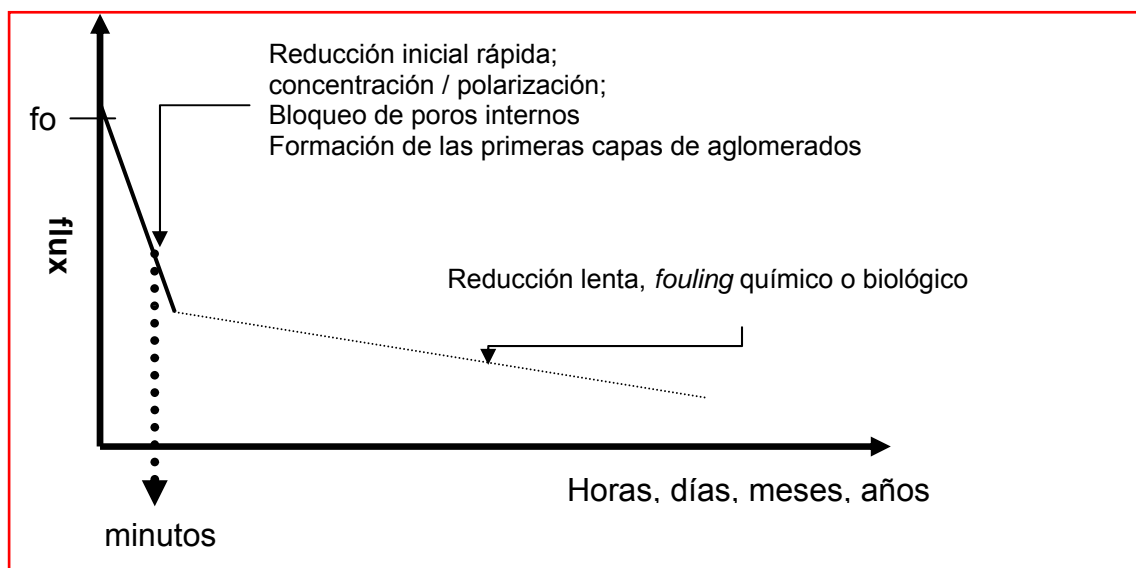


Figura 4.5. Importancia del fenómeno de concentración / polarización en la reducción del flujo de agua a través de una membrana; fo es el flujo a través de una membrana limpia.

La retención de solutos por la membrana hace que aumente su concentración en la capa límite hasta valores por encima de los que ocurren en la zona completamente mezclada del fluido alimentado. Consecuentemente se establece un gradiente de concentración que parte de la superficie de la membrana en dirección al flujo principal del agua en tratamiento. Este proceso es el principal responsable de la acumulación de partículas, macromoléculas y de iones en la superficie de la membrana. Aunque el fenómeno de concentración/polarización promueve la formación de aglomerados, geles y biopelículas, generalmente se estudian por separado (Schneider y Tomoyuki, 2001).

Los aglomerados de material filtrante, también llamados, tortas de filtro, están formados por material retenido en la superficie de la membrana. Su formación se inicia con la retención de partículas cuyo tamaño es mayor al tamaño medio de los poros de la membrana, posterior a la formación de la primera capa, la torta actúa como una membrana adicional; esta torta forma una membrana con estructura irregular y una dinámica de crecimiento independiente. Este aglomerado crece no sólo por la incorporación de material particulado con diámetro mayor que es el tamaño de sus poros, sino también por la incorporación de partículas coloidales y otras moléculas de tamaño menor, que son retenidos por una gran variedad de procesos (adsorción, retención física en canales tortuosos, etcétera). En procesos de separación de partículas, como lo son MF y UF, la formación de aglomerados tiene como consecuencia un rápido aumento de la resistencia de la membrana que se refleja en una fuerte reducción de la tasa de flujo en tiempos muy cortos (ver Figura 4.7).

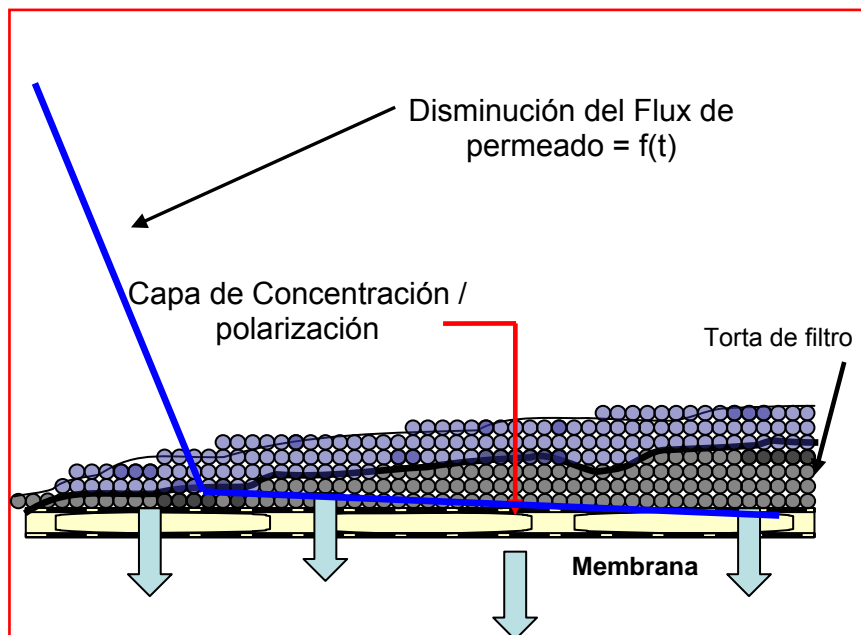


Figura 4.6 Acumulación de material en la superficie de una membrana. La capa de concentración / polarización forma una interfase entre la membrana (o la torta de filtro) y el medio.

La resistencia de un aglomerado depende del material incorporado a su estructura. Hodgson *et al.* (1993) encontraron que partículas regulares y rígidas (esferas de látex) producían aglomerados con resistencia mucho menor que los producidos por células biológicas.

La reducción drástica del flujo de filtración causado por el aglomerado representa una pérdida de eficiencia muy grande para un sistema de filtración o puede agravar problemas de *biofouling* en las membranas que se discutirán más adelante.

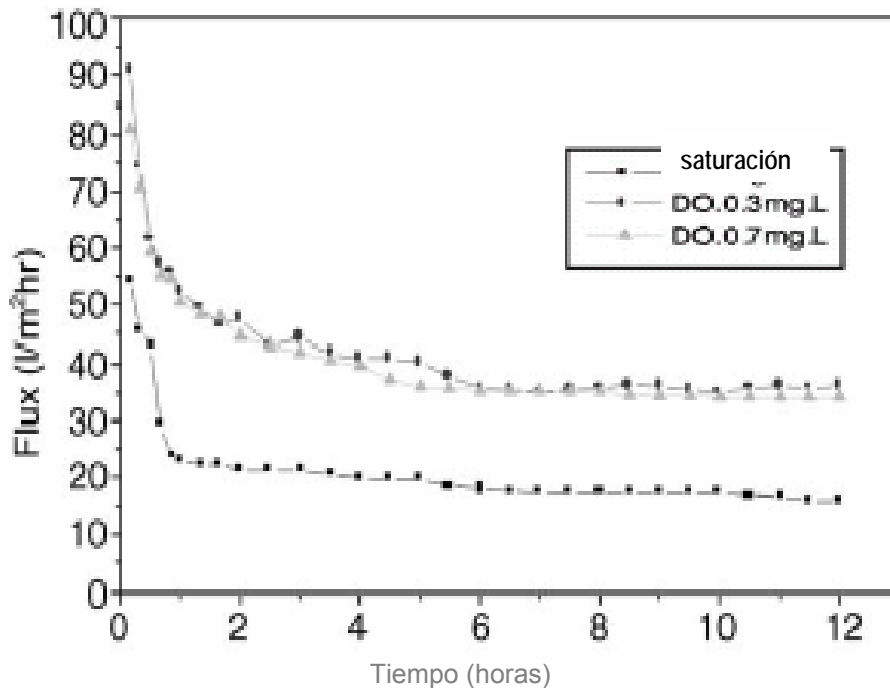


Figura 4.7. Disminución del flujo en la ultrafiltración de efluente de lodos activados en tres condiciones distintas de oxígeno disuelto a través de una membrana de polietersulfona (Choi *et al.*, 2002).

4.3.3 Flujo Crítico

Field y colaboradores (1995), postularon la existencia de un flujo bajo el cual la resistencia del aglomerado permanece estable y no ocurre reducción del flujo con el tiempo de uso del sistema y lo llamaron flujo crítico (J_c). Este flujo se determina en experimentos en donde la presión de filtración o flujo de filtración son aumentados en incrementos pequeños y regulares. Mientras el flujo del sistema permanece por debajo del flujo crítico, el incremento de la presión de operación resulta en un nuevo nivel de equilibrio, en donde el flujo permanece constante y la presión de filtración no aumenta. Cuando el flujo crítico es rebasado, la presión de filtración aumenta continuamente (Figura 4.8). El flujo crítico depende principalmente de factores que determinan las condiciones hidrodinámicas en la superficie de la membrana, como por ejemplo la velocidad del flujo en el canal de alimentación en el caso de las membranas tubulares.

4.3.4 Precipitación de solutos en superficies de membranas

La precipitación de sales en las superficies de membranas es un problema que ocurre con frecuencia en los sistemas de filtración de agua residual así como en la producción de agua potable mediante ósmosis inversa. Si la cantidad de sales dentro de la zona de concentración/polarización sobrepasa el límite de solubilidad las sales inevitablemente precipitan sobre la membrana. La precipitación de sales en los sistemas es un factor condicionante al evaluar cualquier proyecto de filtración.

Dentro de los compuestos que, dada su naturaleza química, ofrecen riesgo de formación de precipitados dentro de la superficie de una membrana destacan: carbonatos, bicarbonatos, hidróxidos y óxidos de metales del grupo II, derivados de silicio, fosfatos, sulfatos e incluso la presencia de ácido sulfhídrico.

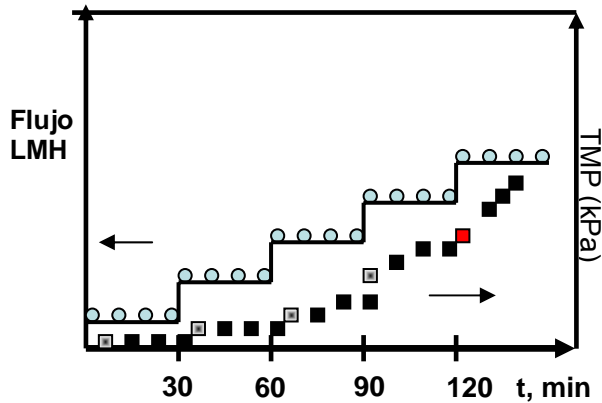


Figura 4.8. Determinación de flujo crítico en una membrana de microfiltración presurizada; el incremento en la presión transmembrana indica taponamiento, el flujo crítico se representa por el cuadro rojo (Madaeni *et al.*, 1999).

En los sistemas anaerobios se ha reportado la presencia de todos estos compuestos sin embargo el que, por su proporción e incidencia, es el más importante dado que en ocasiones causa problemas incluso en tuberías enteras, es el fosfato de amonio y magnesio hexahidratado también conocido por su nombre mineralógico de estruvita ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$).

4.3.4.1 *Características de la estruvita.*- El amoníaco es en buena medida resultado de las reacciones metabólicas propias de la digestión anaerobia mientras que los fosfatos y el magnesio son componentes comunes de las aguas residuales tanto industriales como municipales. Bajo ciertas condiciones, estos compuestos mayormente solubles (el magnesio puede precipitar como carbonato a pH superiores a 8) forman estruvita, compuesto completamente insoluble en agua. La Figura 4.9 ejemplifica la solubilidad de esta molécula en función del pH.

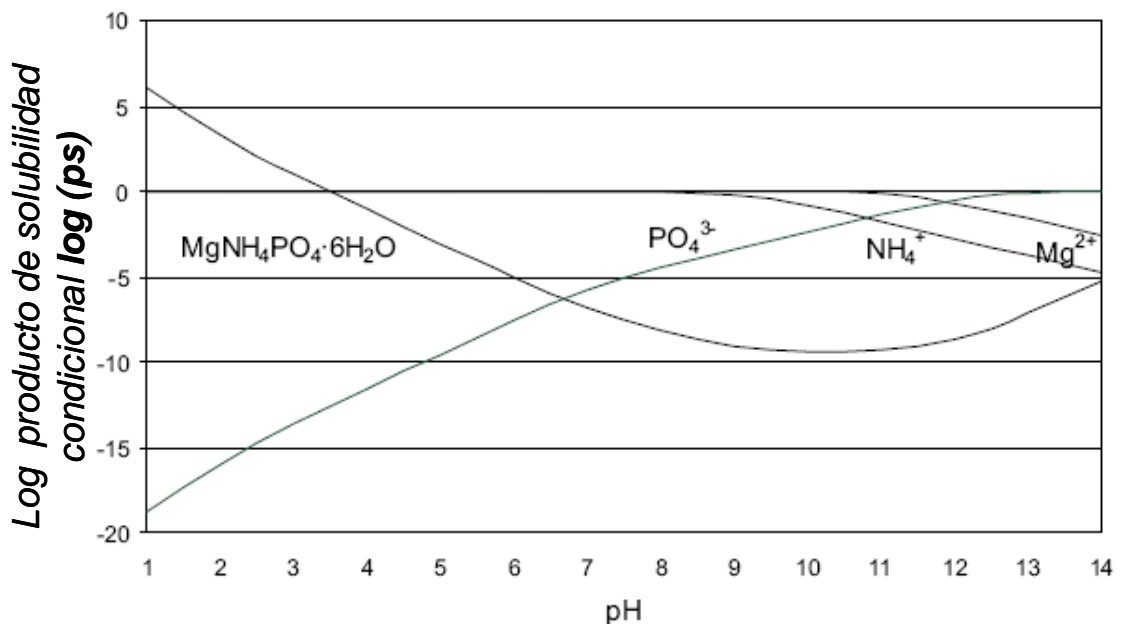


Figura 4.9. Solubilidad condicional de la estruvita vs. pH (Wu y Bishop, 2004)

La estruvita se ha encontrado en gran cantidad de lodos provenientes de digestión anaerobia, sobretodo los residuos líquidos provenientes del tratamiento de residuos de granjas de porcinos y de rastros (Booram *et al.*, 1975). La precipitación de estruvita es un problema de operación en muchas plantas anaerobias; por ejemplo, la planta de tratamiento *Hyperion* en la ciudad de Los Angeles, según reportes de Horestein y colaboradores (1990).

A partir de isoterma, Sarkar *et al.* (1991) reportaron que la estruvita se torna inestable en temperaturas por encima de 50°C. Este compuesto comienza a perder amoníaco o algunas de las moléculas de agua dependiendo de la combinación tiempo/temperatura para finalmente formar fosfato ácido de magnesio. Cuando la estruvita es calentada en exceso de agua pierde cinco de sus moléculas de agua de cristalización para formar un monohidrato, la dittmarita.

Las propiedades físicas y químicas de la estruvita se resumen a continuación (Wu y Bishop, 2004):

- Color: blanco, tonalidades paja incluso ámbar
- Densidad específica: 1.7g/cc
- Solubilidad: completamente insoluble en agua y alcohol; soluble en ácido.
- Peso molecular: 245.41g / mol
- ΔH°_f (kcal/mol) = -880.0
- $pK_{sp} = 12.6$ (25°C)
- Al calcinarse forma pirofosfato de magnesio ($Mg_2P_2O_7$)

La estruvita es un cristal piramidal-ortorómbico del tipo Pnm2_1 del cual se encuentra reportado su patrón de rayos X de polvos así como su espectroscopia IR/Raman (Ferraris *et al.*, 1986; Stefov *et al.*, 2004).

4.3.5 Biofouling y depósitos de materia orgánica en la superficie de la membrana

Los dos principales factores responsables de la disminución del flujo de operación en la mayoría de los procesos de membrana empleados en el tratamiento de efluentes, son la formación de depósitos de materia orgánica y el desarrollo de comunidades microbianas.

Esos dos mecanismos de reducción de flujo ocurren de manera simultánea y son controlados con las mismas técnicas de tratamiento. Como puede apreciarse en la Figura 4.10, durante etapas tempranas de operación de un sistema de membranas la reducción de flujo es exponencial. Como ya fue mencionado, la importante reducción inicial ocurre debido a una combinación de mecanismos, que incluyen concentración/polarización, bloqueo interno de los poros y la formación de una capa inicial de aglomerado. Después de 3 a 5 horas de operación, el rápido descenso inicial es sustituido es seguido por una caída gradual y lenta, pero continua, causada por la incorporación de materia orgánica sobre la película depositada sobre la membrana y por la colonización por microorganismos. La intensidad de la caída inicial en el flujo y la tasa de disminución en la fase de reducción gradual son consecuencia de las características de la membrana y de las propiedades del agua de alimentación. Entre los componentes orgánicos del agua de alimentación, las moléculas de la fracción hidrofóbica causan prácticamente la totalidad de la reducción del flujo (Schneider y Tomoyuki, 2001).

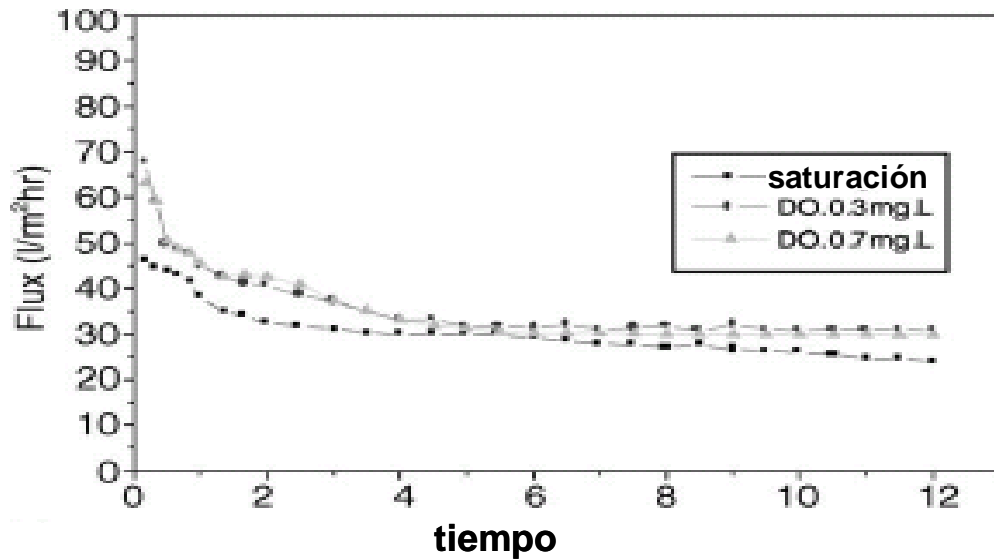


Figura 4.10. Disminución del flujo de ultrafiltración en una membrana de acetato de celulosa al evaluar tres diferentes condiciones de oxígeno disuelto de un proceso de lodos activados (Choi *et al.*, 2002).

El término *biofouling* (bio-taponamiento) define todas las situaciones en donde la formación de biopelículas microbianas interfiere con procesos tecnológicos. En membranas, el *biofouling* es uno de los principales factores que encarecen el proceso, debido a los siguientes factores (Ridgway y Flemming, 1996):

- Reducción del flujo de operación de las membranas, con lo que se incrementa el área de filtración necesaria para la producción de un mismo volumen de permeado.
- Necesidad de instalar sistemas de pretratamiento en UF, NF y OI.
- Interrupciones en el proceso debido al requerimiento de limpieza química.
- Reducción de la vida útil de las membranas
- Costos de la limpieza química.

El *biofouling* difiere de la acumulación pasiva de material en la superficie de membranas debido a la naturaleza dinámica de la biopelícula microbiana, en la cual ocurre una multiplicación de los microorganismos envueltos por un gel, constituido por polímeros extracelulares producidos por los propios organismos presentes en la biopelícula.

Los microorganismos producen biopolímeros adhesivos en las superficies de membranas e interfieren en el proceso de filtración por varias maneras (Schneider y Tomoyuki, 2001; Flemming y Wingender, 2001a y 2001b):

- La capa espesa y continua que es la biopelícula es además una capa filtrante adicional que ofrece una resistencia mayor (ver Figura 4.6).
- La acumulación de sales rechazadas (y concentradas) en la membrana debido a la viscosidad de la matriz de las biopelículas aumenta la intensidad del fenómeno de concentración/polarización.
- Los sitios de cristalización en el interior de la biopelícula pueden inducir la precipitación de sales minerales cuya solubilidad es pobre.
- Las biopelículas pueden obstruir los canales de alimentación e incluso los del concentrado.

- Las bacterias que constituyen las biopelículas son capaces de degradar algunos de los materiales de la membrana como por ejemplo el acetato de celulosa o las líneas de pegamento que separan los canales del concentrado y del permeado en módulos espirales.
- La formación de biopelículas en los canales de permeado pueden contaminar el efluente.

Las biopelículas son comunidades de bacterias adheridas a superficies sólidas o semisólidas, envueltas o no, por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares SPE (Characklis y Marshall, 1990). La primera etapa de formación consiste en la adhesión de microorganismos pioneros a la superficie de la membrana, la cual, debido a fenómenos de adsorción molecular, se encuentra cubierta de una tenue capa de material orgánico e inorgánico proveniente de la solución. En seguida, una subpoblación de organismos pioneros, capaz de convertir el carbono orgánico de la solución en biomasa y en una matriz de polisacáridos, comienza la formación de microcolonias. Estas colonias crecen por duplicación microbiana, por la formación de altas cantidades de SPE y por la incorporación de nuevos microorganismos del medio que colonizan los distintos nichos ecológicos mediante sinergismo y asociaciones interespecies. La diversidad de los nichos se debe a la gran variedad en el gradiente de nutrientes y metabolitos creada como consecuencia de la actividad fisiológica de los distintos grupos microbianos (Costerton *et al.*, 1994). Estos gradientes permiten, por ejemplo, la coexistencia de organismos aerobios y anaerobios en biopelículas establecidas en ambientes aerobios (Figura 4.11). El crecimiento de las colonias así como la incorporación de otros microorganismos, forma columnas, cuya adhesión crea una capa continua de biopelícula sobre la superficie de la membrana. La biopelícula generalmente presenta canales que permiten un intercambio de solutos con el medio acuoso (Fase III, Figura 4.11). La matriz de polisacáridos es responsable del anclaje mecánico de la biopelícula asimismo de la cohesión entre las células que la forman además de concentrar entre el 50 y el 90% del carbono orgánico de la biopelícula. Esta matriz funciona como un filtro debido a su consistencia gelatinosa y a sus propiedades viscoelásticas, por lo que no permite la penetración de partículas con diámetro mayor a 90nm al interior de la biopelícula además de evitar la salida de los microorganismos; es decir, las biopelículas son agentes protectores de los nichos microbianos (Schneider y Tomoyuki, 2001).

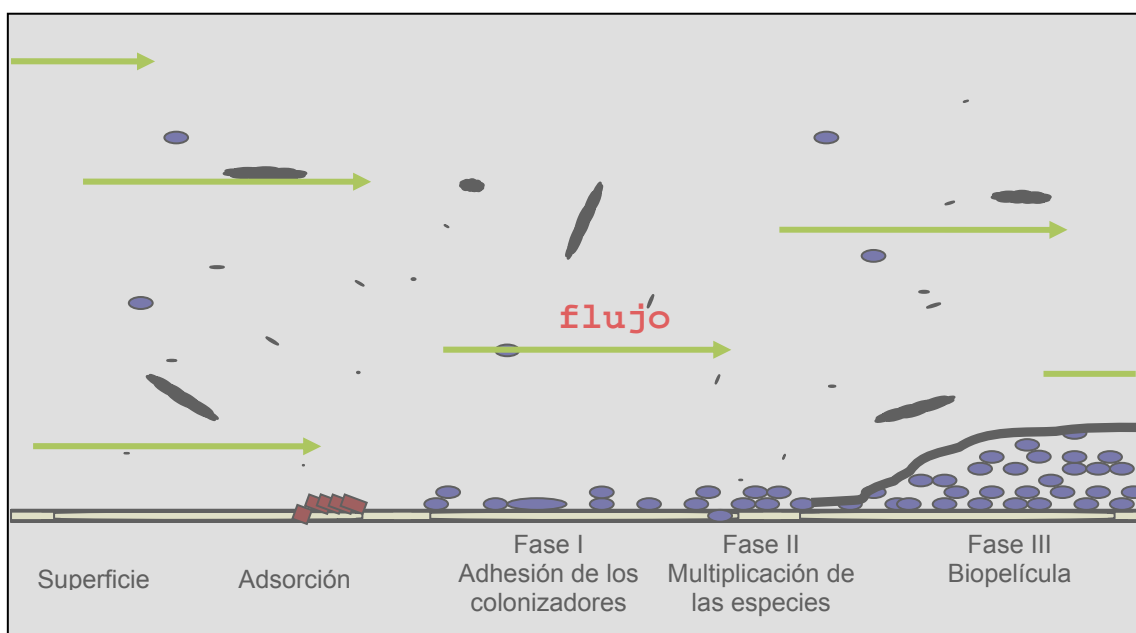


Figura 4.11. Representación esquemática que ejemplifica la secuencia de formación de una biopelícula en una membrana tubular.

Cuando una biopelícula es espesa, casi ninguna célula microbiana se encuentra directamente adherida a la superficie de la membrana; la cohesión de las SPE de la matriz garantiza la estabilidad mecánica de la estructura.

La formación de biopelículas sobre una superficie de filtración es un fenómeno de fácil detección y seguimiento y ha sido analizado de manera directa mediante distintas técnicas de microscopía y de manera indirecta mediante el análisis del material removido de la superficie de la membrana. La elección y aplicación de estas técnicas de análisis depende de las condiciones a las que fue sometida la capa filtrante, de la disponibilidad de los métodos instrumentales y es una operación restringida al taponamiento irreversible de la membrana (Schneider y Tumoyuki, 2001).

4.3.6 Biofouling en Membranas Acopladas a Bioreactores Anaerobios.

La aplicación de bioreactores de membrana (BRM) en el tratamiento de agua residual municipal e industrial, como se ha comentado, ha avanzado rápidamente alrededor del mundo. Aunque en un principio los BRM fueron desarrollados para producir agua de alta calidad para su reutilización a partir de aguas grises, recientemente han sido incorporados al tratamiento de agua residual municipal e industrial en virtud de cumplir con la cada vez más estricta normatividad que contempla valores muy bajos de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), sólidos suspendidos totales (SST) y el contenido de patógenos y parásitos.

A partir de 1990 las aplicaciones de los BRM comenzaron a divergir en direcciones cada vez más complejas como el tratamiento de agua contaminada con grasas y aceites, la depuración de agua residual del proceso de fabricación de explosivos además de exitosas experimentaciones en la degradación de sustancias que afectan el sistema endócrino y de otros fármacos complejos (Sutton, 2003; Zoh *et al.*, 2002 y Cicek, 2003).

En la actualidad, una dirección que ha tomado la investigación en estos sistemas ha sido la de la aplicación anaerobia, la cual consta de un reactor anaerobio acoplado a una unidad de filtración. Debido a la alta concentración de biomasa dentro del bioreactor, un BRM anaerobio es capaz de depurar agua residual con altas concentraciones de material orgánico e inorgánico además de ser capaz de producir energía a partir de biogás y así poder bajar los costos de operación en estos sistemas. Sin embargo los BRM anaerobios (BRAM) no cuentan aún con un sustento de investigación básica tan amplio como lo tienen los sistemas aerobios, esto es, no se cuentan con datos sólidos acerca de los fenómenos que se llevan a cabo en la filtración de efluentes anaerobios ni de los efectos de las condiciones de operación en el taponamiento de la membrana y mucho menos de las especies microbianas relacionadas con el taponamiento en estos sistemas.

El efluente de un reactor anaerobio contiene una gran variedad de biomasa como células, metabolitos solubles, insolubles e incluso coloidales además de compuestos inorgánicos. En sistemas BRAM el incremento en la presión transmembrana (ΔP) ha sido relacionado con el depósito de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) y la autopsia de la membrana plana revela que existe una distribución inconsistente pero significativa de la película taponante debido a SPE (Cho y Fane, 2002). También se ha observado que es importante considerar a los precipitados inorgánicos generados durante la digestión anaerobia ya que podrían jugar un papel importante en la formación de agregados en la superficie de la membrana teniendo como consecuencia una importante disminución en el flujo de permeado (Choo *et al.*, 1996). Mediante conclusiones teóricas Kwan Ho Choo y colaboradores (1998) sugieren que el flujo de operación

en BRAM debe ser menor que el flujo crítico para prevenir el taponamiento a largo plazo; Vallero, Lettinga y Lens (2005) concluyeron asimismo que la operación a flujos sustancialmente más bajos al crítico evitan el taponamiento y la consecuente limpieza química al evaluar un sistema anaerobio con membrana sumergida. Es también importante la operación intermitente del proceso de filtración así como el retrolavado de la membrana si se desea disminuir los efectos del taponamiento (He *et al.*, 2005).

Otros trabajos han demostrado también que las características de la membrana influyen de manera significativa la formación de biopelículas y la disminución del flux, por ejemplo las membranas con carga superficial negativa ofrecen menos disminución en el flujo de permeado que las que presentan carga positiva o neutra al trabajar en sistemas BRAM debido a la fuerte repulsión electrostática entre la membrana con carga negativa y los componentes coloidales del efluente anaerobio (He *et al.*, 2005). Al realizar una comparación de los patrones de filtración entre una membrana orgánica de polipropileno y una inorgánica de zirconio Kang y colab. (2002) concluyeron que existe precipitación de componentes inorgánicos (mineralización) en ambas superficies sin embargo presentan diferencias en cuanto al lugar y la forma de la deposición. En la membrana inorgánica las sales se encontraron en medio de los poros, mientras que en la orgánica se ubicaron en la superficie y posiblemente asociadas a microorganismos (biomineralización biológicamente inducida) por lo que el impacto de la composición de la membrana y su carga neta influyen directamente en las propiedades de la capa taponante.

4.4 *Biomíneralización.*

4.4.1 *La Biomíneralización y sus perspectivas de estudio.*

La biomíneralización estudia el proceso mediante el cual los organismos vivos forman sólidos inorgánicos, cristalinos o amorfos, en estrecha asociación con una matriz orgánica dentro de sistemas biológicos. Desde el nano-mundo de las proteínas acarreadoras de compases magnéticos en bacterias hasta las estructuras macroscópicas de los corales, el marfil, huesos, esmalte, conchas de ostras y cascarones de huevo, la biología se ha mezclado con un nuevo tipo de química que estudia tanto la síntesis como la construcción de materiales duros y suaves para el diseño de componentes orgánico-inorgánicos con características funcionales. El proceso que permite el crecimiento de esas pequeñas estructuras de base inorgánica constituye biomíneralización. La biomíneralización involucra la extracción selectiva y adaptación de elementos del medio ambiente local así como su incorporación hacia estructuras funcionales bajo un estricto control biológico (Mann, 2001).

Desde hace dos décadas, la atención de la bio-mineralización se ha enfocado desde una perspectiva química: primero como química bio-inorgánica y más recientemente, como química de bio-mimética de materiales. Para los químicos bio-inorgánicos, la mineralización biológica representa una extensión a gran escala de la interrelación entre los procesos biológicos y la química inorgánica, mientras que la química de bio-coordinación se enfoca principalmente en las atracciones entre átomos metálicos y sus ligandos a nivel de la esfera de coordinación. Por su parte, la bio-mineralización documenta la química entre átomos inorgánicos (sitios de inicio de nucleación, planos cristalográficos, etcétera) y los numerosos ligandos embebidos en superficies orgánicas como proteínas, lípidos y carbohidratos. La investigación en bio-mineralización en el contexto de la química bio-inorgánica incluye:

- La caracterización estructural y la composición de los bio-minerales.
- La comprensión de las propiedades funcionales de los bio-materiales.
- La elucidación del proceso mediante el cual macromoléculas y estructuras orgánicas controlan la síntesis, construcción y organización de materiales basados en componentes inorgánicos.

A un nivel más genérico, la bio-mineralización es de vital importancia –junto con otros campos de estudio como la química supramolecular- en el desarrollo de un paradigma moderno de la química basado en el concepto de que las interacciones moleculares pueden ser integradas en sistemas con muy altos niveles de organización y dinamismo.

4.4.2 Mineralización Biológicamente Inducida (MBI).

En la mineralización biológicamente inducida, los minerales inorgánicos son depositados mediante precipitación, la cual aumenta las interacciones secundarias entre varios procesos metabólicos y el medio ambiente circundante.

La extrusión de productos metabólicos a través o dentro de la pared celular de la bacteria puede resultar en una precipitación biológicamente inducida de varios minerales inorgánicos con la subsiguiente reacción con los iones metálicos exógenos.

Una característica distintiva de este tipo de biomineralización es que generalmente los minerales forman estructuras sobre la superficie de la célula en donde permanecen firmemente unidos a ella. En muchos casos, células completas permanecen totalmente incrustadas dentro de los depósitos minerales. Algunos componentes de la pared celular –como lípidos, proteínas y polisacáridos- pueden influenciar el proceso de mineralización al actuar como superficies generales de precipitación.

Los biominerales formados mediante MBI no tienen un estricto control celular, y como consecuencia de esto, el tamaño, la forma, la estructura, composición y organización de las partículas minerales son poco homogéneas y pobremente definidas. Un ejemplo de este fenómeno puede apreciarse en la figura 4.12.

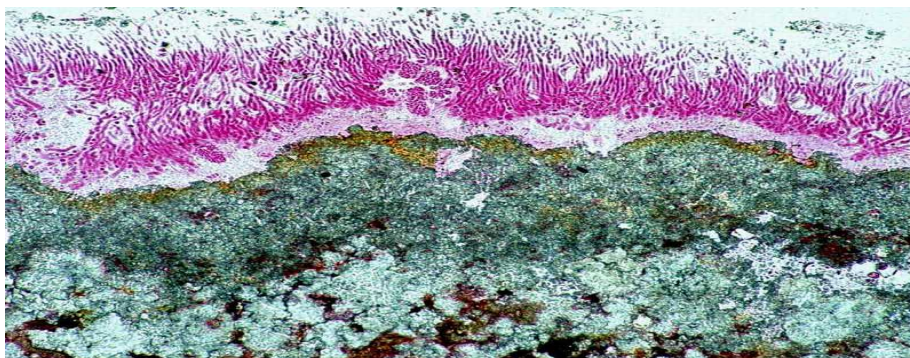


Figura 4.12 Biopelícula activa sobre una superficie de estromatolito en *Walter lake*, Nevada, EUA

4.4.3 Mineralización Biológicamente Controlada (MBC).

En contraste con la MBI, la mineralización biológicamente controlada es el resultado de un proceso altamente dirigido que produce huesos, caparazones, conchas, dientes y cascarones de huevo que tienen funciones biológicas específicas. Los materiales formados por este proceso,

son distinguidos por sus propiedades cristalográficas reproducibles y específicas, las cuales incluyen:

- uniformidad en el tamaño de partícula
- estructuras y composiciones bien definidas
- altos niveles de organización espacial
- morfologías complejas
- textura y agregación controladas
- orientación cristalográfica preferencial
- ensamblajes altamente ordenados sobre estructuras jerárquicas.

La MBC es rara en organismos unicelulares como algas y protozoarios pero extremadamente común en organismos multicelulares. La MBC involucra una regulación especializada de la deposición mineral y resulta en materiales funcionales con propiedades cristaloquímicas bien definidas y específicas. Las figuras 4.13A y 4.13B documentan estos procesos controlados en sistemas biológicos de especies evolucionadas.

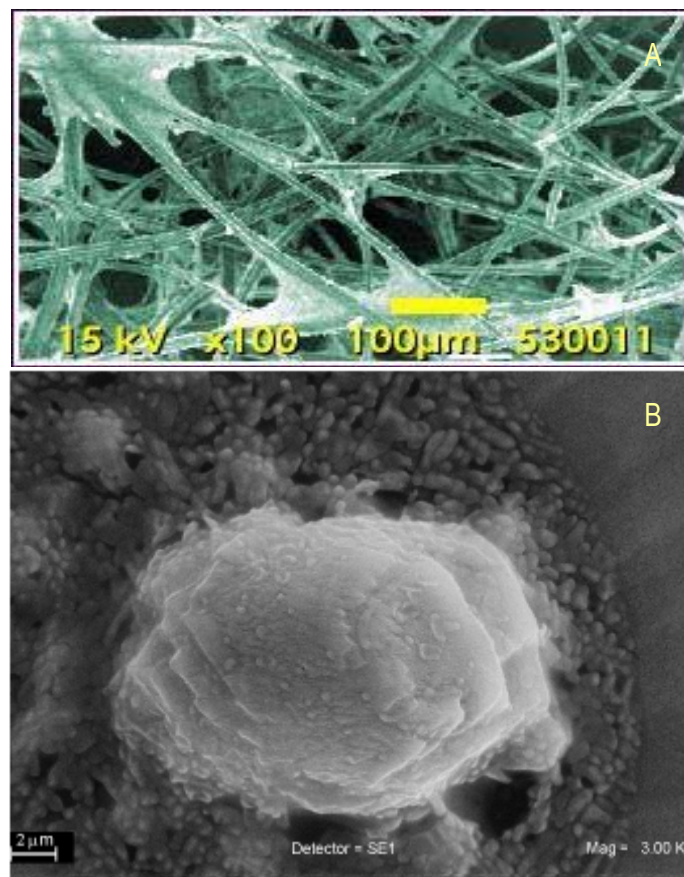


Figura 4.13 Biomimetalización. A Osteoblastos mineralizando tejido óseo *in Vitro* sobre una red de ácido poligalacturónico (PGA) B. Ensayos de Biomimetalización. Cristales de carbonato de calcio desarrollados en 48 horas a partir de una solución de carbonatos en presencia de 20ng/ml de la proteína llamada perlucina, extraída de la concha de *Halliotis fulgens*. (Villarreal, 2005).

Para el adecuado control biológico de la mineralización se requiere de una red compleja de macromoléculas además de una serie de factores fisicoquímicos que involucran delineación espacial, difusión limitada en el flujo iónico, regulación química y superficies orgánicas para regular la nucleación. Requiere además mecanismos de control morfológico y construccional para dar soporte mecánico al tejido mineralizado (Mann, 2001).

Los fenómenos de mineralización biológica son importantes en bio-películas ya que las redes formadas por sustancias poliméricas extracelulares presentan grupos funcionales con carga eléctrica definida. Al interactuar éstas con soluciones de compuestos inorgánicos cuya solubilidad es pobre, pueden cristalizar estos compuestos a través de fenómenos electrostáticos, que se ven favorecidos en situaciones de alta presión como los que se llevan a cabo en las unidades de filtración de los bio-reactores de membrana.

5 Planteamiento, Hipótesis y Objetivos

5.1 Planteamiento del Problema

Generalmente el efluente de los sistemas anaerobios usados en el tratamiento de agua residual no cumple con lo especificado en la normatividad debido principalmente a la elevada DQO y a la presencia de algunos contaminantes microbiológicos. El uso de barreras físicas de ultrafiltración acopladas a estos sistemas podría solucionar esta problemática; sin embargo, el uso de membranas presenta dificultades asociadas de taponamiento, generalmente atribuido a sólidos suspendidos y coloidales en general, así como a microorganismos presentes (biomasa) y a precipitados inorgánicos. El hecho de que el agua residual municipal sea un efluente relativamente menos complejo que los provenientes de actividades industriales, permite suponer que este taponamiento podría ser causado fundamentalmente por microorganismos y exopolímeros producto del metabolismo microbiano, asociados a sales minerales poco solubles como la estruvita ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en una compleja biopelícula híbrida orgánico / inorgánica.

A partir de este razonamiento se han planteado dos preguntas asociadas a esta problemática:

1. A partir de agua residual municipal, ¿Es posible obtener un efluente que cumpla con lo especificado en la norma NOM-003-SEMARNAT-1997 en cuanto a huevos de helmintos, microorganismos patógenos y DBO utilizando Reactores Biológicos de Membrana en condiciones de anaerobiosis?
2. ¿En que medida el taponamiento de membrana en el tratamiento de aguas residuales municipales es dependiente de la biomasa y no de precipitados inorgánicos como la estruvita?

5.2 Hipótesis

1. Un Bioreactor acoplado a una membrana de ultrafiltración es capaz de retener algunos microorganismos patógenos y la totalidad de huevos de helmintos además de ser capaz de operar a altos tiempos de retención celular que aseguran además la retención de compuestos solubles de alto peso molecular asociados a microorganismos, lo que permite que en un solo proceso, los contaminantes sean disminuídos hasta niveles que permitan el cumplimiento con la normatividad para la reutilización de agua.
2. El agua residual municipal presenta relativamente bajas concentraciones de sales inorgánicas, compuestos generalmente asociados con el taponamiento de membranas en tratamientos de efluentes industriales; debido a esta característica se espera que el taponamiento de las membranas a utilizar durante la investigación sea causado principalmente por la formación de una biopelícula híbrida orgánico / inorgánica.

5.3 Objetivos

Generales.

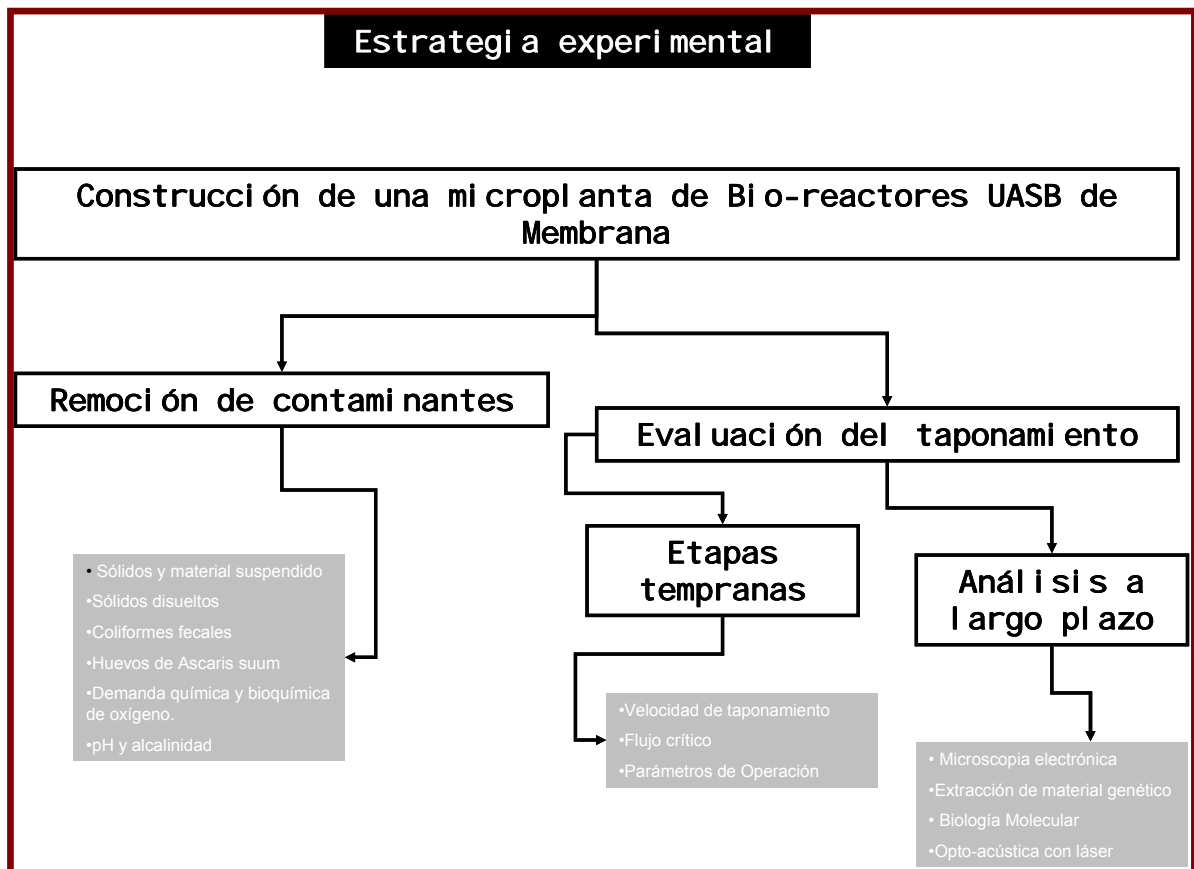
1. Evaluar la operación de dos Bioreactores de Membrana (BRM) que presentan combinaciones definidas de tiempos de retención hidráulica (TRH) y tiempo de retención celular (TRC) con el fin de determinar condiciones de operación adecuadas con base en la remoción de contaminantes, taponamiento, calidad del efluente y su concordancia con la normatividad oficial mexicana.
2. Determinar si existe contribución de sustancias de naturaleza microbiana en el taponamiento de la unidad de filtración a través de la caracterización de esta última mediante técnicas de biología molecular y otras técnicas físicas.

Específicos.

- 1.1 Evaluar el taponamiento de la unidad de ultrafiltración de acuerdo al flujo permeado y a la presión transmembrana.
- 1.2 Cuantificar la remoción de contaminantes (sólidos, DQO, coliformes fecales, huevos de helmintos) en las distintas operaciones unitarias que componen los BRM y determinar si el efluente de los BRM cumple con lo establecido en la normatividad oficial mexicana (NOM-003-SEMARNAT-1997)

- 2.1 Identificar a los microorganismos asociados al material taponante mediante el aislamiento, amplificación, secuenciación, comparación y alineamiento (*blast*) del ADN asociado a las membranas parcial o totalmente taponadas,
- 2.2 Caracterizar las membranas utilizadas por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) e identificar las propiedades mecánicas asociadas a la biopelícula mediante técnicas de optoacústica pulsada (OAP).

5.4 Estrategia general de trabajo



5.1 Planteamiento del Problema

Generalmente el efluente de los sistemas anaerobios usados en el tratamiento de agua residual no cumple con lo especificado en la normatividad debido principalmente a la elevada DQO y a la presencia de algunos contaminantes microbiológicos. El uso de barreras físicas de ultrafiltración acopladas a estos sistemas podría solucionar esta problemática; sin embargo, el uso de membranas presenta dificultades asociadas de taponamiento, generalmente atribuido a sólidos suspendidos y coloidales en general, así como a microorganismos presentes (biomasa) y a precipitados inorgánicos. El hecho de que el agua residual municipal sea un efluente relativamente menos complejo que los provenientes de actividades industriales, permite suponer que este taponamiento podría ser causado fundamentalmente por microorganismos y exopolímeros producto del metabolismo microbiano, asociados a sales minerales poco solubles como la estruvita ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en una compleja biopelícula híbrida orgánico / inorgánica.

A partir de este razonamiento se han planteado dos preguntas asociadas a esta problemática:

1. A partir de agua residual municipal, ¿Es posible obtener un efluente que cumpla con lo especificado en la norma NOM-003-SEMARNAT-1997 en cuanto a huevos de helmintos, microorganismos patógenos y DBO utilizando Reactores Biológicos de Membrana en condiciones de anaerobiosis?
2. ¿En que medida el taponamiento de membrana en el tratamiento de aguas residuales municipales es dependiente de la biomasa y no de precipitados inorgánicos como la estruvita?

6 Metodología Experimental

Se instalaron dos sistemas a nivel laboratorio que constan, cada uno, de un tanque de suministro común de agua residual, de un reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés), de un tanque de igualación de flujo, de una unidad de membrana y de las respectivas unidades de bombeo (Figura 6.1). Se trató agua residual de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria considerada como agua municipal. Ambos sistemas fueron operados en paralelo durante 103 días bajo distintos tiempos de retención celular (ver anexo A).

6.1 Características de las instalaciones

El tanque de alimentación de agua residual tenía un volumen de 19 L (diámetro de 0.26 m, altura de 0.39 m) el cual fue alimentado a diario en forma manual. Dos bombas peristálticas masterflex (cabezal No. 18) de Cole Parmer alimentaron con esta agua a los reactores anaerobios tipo UASB. Estos reactores fueron construidos de vidrio con un volumen neto de 1.0 L (diámetro sección de lodo 0.102m, altura sección de lodo 0.20m). El efluente de cada reactor fue colectado en un tanque de ecualización de flujo de 2.5 L netos (diámetro 0.20m, altura 0.45m) equipado con sensores de nivel (CEYSA, México) de agua para controlar el arranque y paro de la bomba desplazamiento progresivo (Moyno, EUA, serie 33201, potencia 1/2 HP) que alimentaba de agua a la membrana de ultrafiltración. Esta membrana fue extraída de un módulo de membranas (Membrana tubular de 40KDa de polietersulfona, Resistencia (R_t) de 10^{-07} m^{-1} , Aquatech, Corea del Sur) de tal forma que se tuvo un área de filtrado de $7.2 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ (Largo 0.29 m, diámetro 8.9 mm). La presión transmembrana fue medida con un manómetro (0-14 kPa, De Wit, México) y fue controlada mediante la velocidad de rotación de la bomba de desplazamiento progresivo y una válvula de globo ubicada en la descarga de la membrana. El rechazo o concentrado del módulo de la membrana fue retornado al tanque de ecualización de flujo; la tasa de recirculación observada fue del orden de 95-97%. El permeado era recolectado por un recipiente situado en la parte baja de la membrana.

La velocidad de recirculación en el módulo de membrana fue de 2.0 m/s. Los sistemas fueron operados con un flujo de agua residual de 7.2 L/d cada uno, lo que implicó un TRH en los reactores UASB de 3 horas; el sistema I trabajó con un tiempo de retención celular de 100d mientras que el sistema II lo hizo con 60d para lo cual se efectuó una purga de 5 mL de lodo/d. Los

reactores UASB fueron inoculados cada uno con 333 mL de lodo granular proveniente de un reactor anaerobio que depura residuos de la industria procesadora de jarabe de maíz (Actividad metanogénica=0.5351 gCH₄-DQO/g SSV d ; Índice volumétrico de lodos=27.41 mL /g SSV).

Debido a las condiciones experimentales de velocidad, se calculó el número de Reynolds (Re), siendo este de 20 000, es decir, las condiciones hidrodinámicas prevaecientes durante los experimentos son turbulentas [Re = (0.01 m de diámetro de membrana)(2 m/s velocidad de recirculación)(1000 kg/m³ densidad del agua) / (0.001 kg/m s de viscosidad)]

6.2 Control del sistema

El comportamiento de los bioreactores fue evaluado de manera periódica en los puntos 1,2 y 3 (Figura 6.1) de acuerdo a los *Métodos Estándar* (APHA, AWWA, WPCF ,1999), además de los propuestos por la norma Mexicana NMX-113-SCFI-1999. La frecuencia de estos análisis así como las técnicas utilizadas se resumen en la Tabla 6.1:

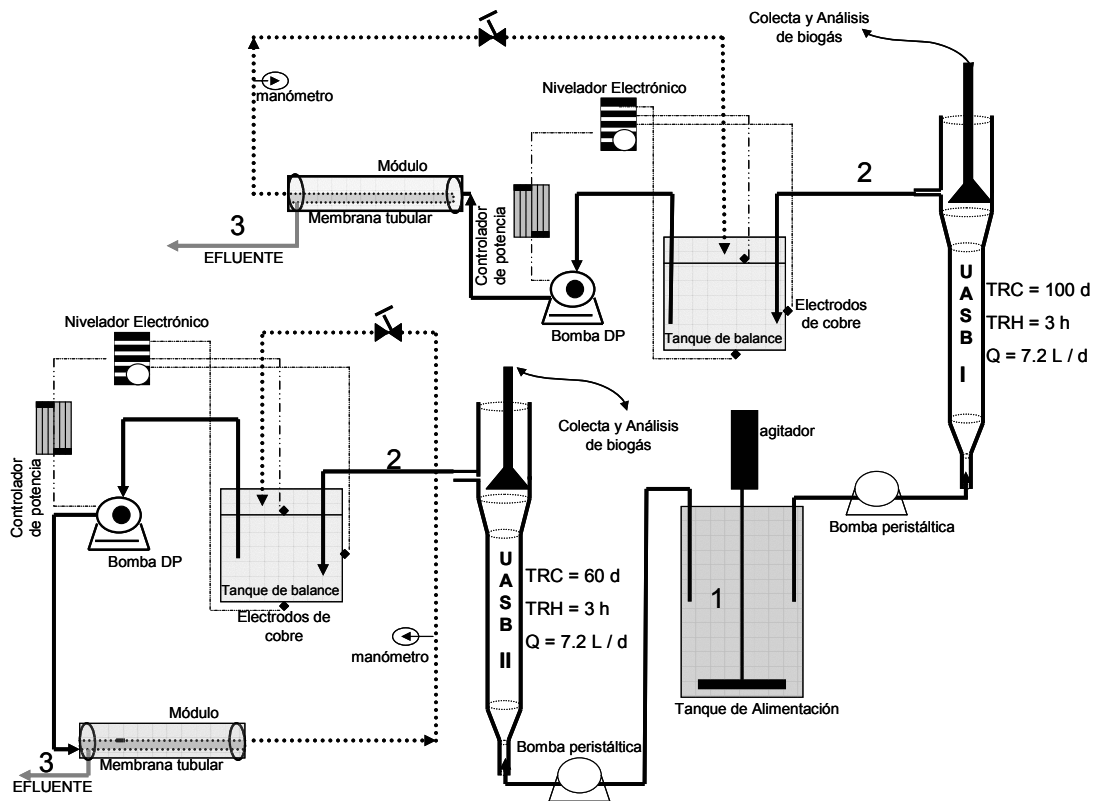


Figura 6.1 Esquema del Modelo experimental .

En la Figura 6.1 se presenta una fotografía del arreglo experimental arriba descrito.

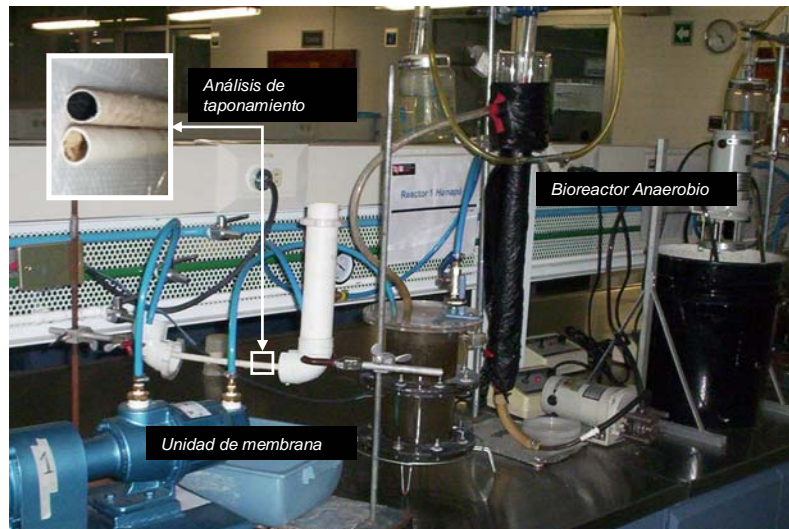


Figura 6.2 Arreglo experimental instalado en el laboratorio

TABLA 6.1. PARÁMETROS EVALUADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN.

Parámetro	Técnica	Frecuencia de medición y comentarios
pH	Potenciómetro	Diario
Alcalinidad	APHA, AWWA, WPCF (1999)	3 / semana
Sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos	APHA, AWWA, WPCF (1999)	3 / semana
Composición de biogás	Cromatografía de gas	Diario
DQO (total y soluble)	APHA, AWWA, WPCF (1999)	3/semana
DBO5	APHA, AWWA, WPCF (1999)	Semanal
Coliformes fecales	APHA, AWWA, WPCF (1999)	Determinaciones semanales en el efluente UASB y en el permeado de membrana. En el lodo de los reactores UASB al final de la experimentación.
Huevos de helminto	NMX-113-SCFI-1999	Una vez durante el arranque de los bio-reactores
Flujo crítico en la membrana	Field et al. (1995)	Una vez al final del experimento.
Determinación de material orgánico, inorgánico y humedad en la membrana	APHA, AWWA, WPCF (1999)	
Identificación de microorganismos	Aislamiento ADN (Mo Bio ultraclean soil DNA kit) - PCR estándar - Electroforesis con gradiente de temperatura (TGGE)- Ligación con vector pGEM@-T - Transformación en <i>E. coli</i> - Secuenciación-Blast.	Una vez al final de la operación a largo plazo. Ver texto

6.2.1 Inoculación de *Ascaris suum*.

Ante el bajo conteo de huevos de helminto obtenido en el agua residual que alimenta la planta de tratamiento de Ciudad Universitaria, se optó por aumentar ese número en forma artificial. Para ello, se decidió utilizar huevos de *A. suum*. El nemátodo *Ascaris suum*, parásito del ganado porcino, presenta morfología similar a la de *A. lumbricoides*, parásito habitual del ser humano, tan común que, algunos autores (Tay *et al.*, 1990), afirman que se encuentra presente en el 91% de la población rural de México. Organismos maduros de *A. suum* fueron obtenidos de las instalaciones del rastro municipal Tlalnepantla de Baz, Estado de México. La colecta se realizó después de la matanza del ganado porcino ya que estos organismos se desarrollan dentro del intestino del hospedero. Se seleccionaron los parásitos para almacenarlos en una solución salina

fisiológica para conservarse en refrigeración. La disección y el conteo de huevecillos se efectuaron siguiendo metodologías reportadas por Hernández (2006) y Capizzi et al (2001a y 2001b). Se realizaron cinco conteos de 100µL de la solución de huevos de *A. suum* mediante microscopia óptica utilizando una celda de conteo Duncaster y un microscopio óptico (Zeigen X52-G7). La muestra debe homogeneizarse mediante el uso intensivo del vórtex durante los 30 s posteriores a la toma de la alícuota para su conteo. Posterior al conteo se determinó la media aritmética de las cinco determinaciones obteniéndose en promedio 10HH/ µL. Se adicionó al tanque de alimentación (19L de capacidad) el volumen necesario para tener constantemente la concentración de 25HH/L en el influente.

6.3 Identificación de los microorganismos asociados a la biopelícula.

Para la amplificación del ADN extraído se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ver Tablas 6.2 y 6.3) sobre el gen ribosomal 16S, esta amplificación se llevó a cabo en condiciones estándar (desnaturalización a 94°C durante 45 s, alineamiento a 55°C por 55s y polimerización a 72°C durante un minuto) durante 30 ciclos, los amplicones de PCR presentaron un tamaño de aproximadamente 200pb. Mediante electroforesis con gradiente de temperatura (TGGE) fueron separados los fragmentos amplificados y se llevó a cabo por medio de un equipo de detección de mutaciones (Universal Mutation Detector-Biorad) utilizando geles de poliacrilamida (8% w/v) con un gradiente de 2° C por hora durante aproximadamente 5 horas (59-69°C). Los productos fueron identificados utilizando un fotodocumentador (Biorad) y cortados para purificarse utilizando el kit *gel extraction* (Stratagene). Con una relación inserto/vector de cinco, los fragmentos de ADN fueron ligados a vectores tipo Vec-T (*pGEM®-T*, Promega, USA, ver Figura 6.3) y posteriormente transformados en células competentes. Los plásmidos fueron separados de las células y su secuencia analizada (servicio proporcionado por el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM). La secuencia de bases fue dilucidada por el software *Chromas 1.45* y comparada en línea mediante BLAST en las bases de datos de la NCBI.

TABLA 6.2. REACCIÓN DE PCR

Reactivo	Volumen agregado	Concentración del reactivo
Agua desionizada	11.3µl	-
Tampón de reacción	2.5µl	-
Solución Q	5µl	-
Cebador de iniciación GC-338F	1.25µl	20mM
Cebador reverso 518R	1.25µl	20mM
ADN	3µl	30ng/ml
<i>Hot start</i> polimerasa	0.2µl	5U/µl

TABLA 6.3 SECUENCIA DE LOS CEBADORES.

cebador	Secuencia de bases
GC-338F	5'-cgc ccg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gcc tac ggg agg cag-3')

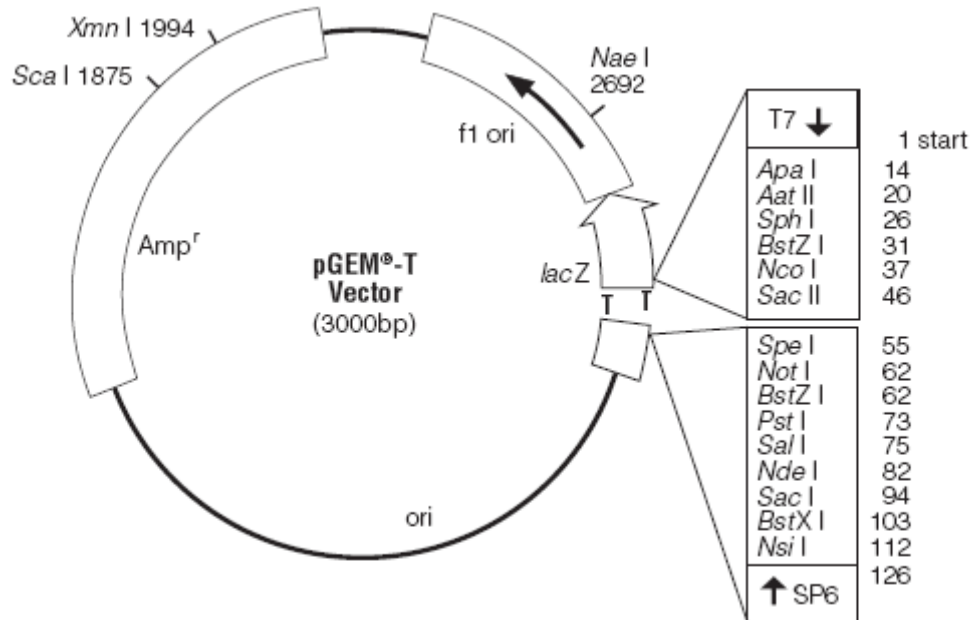


Figura 6.3. Mapa circular del vector de clonación y puntos de referencia en su secuencia.

6.4 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) sobre la membrana-Espectroscopia por Dispersión de Energía (EDS).

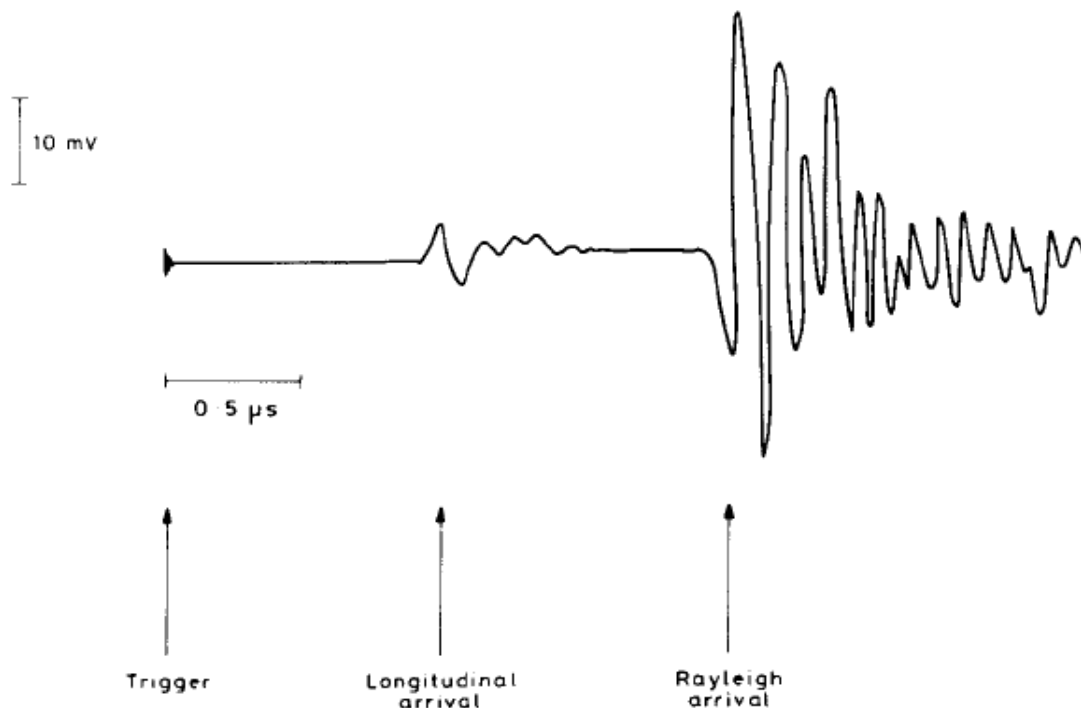
La estructura de la biopelícula desarrollada fue estudiada mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB) Cambridge/Leica modelo *Stereoscan 440* y las micrografías fueron analizadas mediante el software del equipo. Se realizó asimismo el microanálisis sobre superficies regulares de biopelícula (150 x 150 μm) mediante espectroscopia por dispersión de energía (EDS) acoplada al MEB a través de un detector de estado sólido (Si/Li); Marca Oxford, modelo *Pentafet* y analizadas con el software ISIS Link versión 1.04a.

La preparación de las muestras se llevo a cabo de la manera tradicional, es decir, las membranas fueron sometidas a un haz continuo de partículas de oro (proceso conocido como "dorado") durante tres minutos. Las micrografías obtenidas requirieron de la realización de diversos cortes transversales a temperaturas de nitrógeno líquido (TNL) con la finalidad de obtener mayor regularidad en los cortes.

6.5 Determinación de las propiedades mecánicas de la biopelícula mediante optoacústica pulsada (láser).

El estudio de las ondas ultrasónicas ha tenido un gran impacto en numerosas áreas desde el diagnóstico médico hasta el análisis no destructivo. Como resultado de trabajos pioneros en las décadas de 1960 y 1970 además de estudios más sistemáticos en los 1980s, las técnicas de láser se han consolidado como alternativa a los sensores pizo-eléctricos en pruebas de generación y recepción de ultrasonido. Una gran cantidad de investigaciones han medido las interacciones entre los campos de la óptica y el ultrasonido y se han detectado varias aplicaciones potenciales, algunas ya han demostrado su utilidad en pruebas de laboratorio.

Mientras tanto, ha crecido el interés por técnicas de diagnóstico en tiempo real en todas las áreas de la industria. Tanto el monitoreo de procesos, el control de calidad en línea, inspección *in situ* como el análisis no destructivo requiere de sensores. En el caso de determinaciones durante manufactura, la necesidad de sensores remotos que no interfieran con el proceso de investigación es muy deseable. Las técnicas ópticas son por tanto obvios candidatos para cumplir esta función. Sin embargo, sólo las ondas ultrasónicas pueden penetrar dentro de los materiales utilizados en la ingeniería, lo cual permitiría la realización de determinaciones de la calidad del material. Por esta razón, el sensor ideal sería aquel que utilice ondas ópticas afuera del espécimen y ultrasonido en el interior. La generación de ultrasonido por laser permite esta combinación (Scruby y Drain, 1990). La figura 6.4 muestra un esquema de las ondas ultrasónicas generadas en un material cualquiera.



.Figura 6.4. Geometría de una onda acústica generada por una fuente termoelástica y recibida en un transductor de 3MHz (Scruby y Drain, 1990)

Los objetivos fundamentales, en este punto, fueron, por un lado; determinar si la optoacústica con pulsos láser (OAP) puede ser aplicada para determinar el grado de taponamiento (paso de luz) en membranas de polietersulfona (40kDa corte molecular) utilizadas en el tratamiento de agua residual municipal a través bioreactores anaerobios de membrana (BRAM) y, por otro lado, la determinación de las propiedades mecánicas de las biopelícula generadas. Membranas parcial o totalmente taponadas fueron obtenidas de los bioreactores de membrana operados a escala laboratorio. Mediante mediciones micrométricas y determinación de masa se calculó la densidad de los materiales (10 muestras diferentes). Las muestras sometidas a análisis fueron tres: la membrana limpia, una parcialmente taponada (150 horas de filtración) y la del sistema I a 510 horas de filtración. El sistema experimental se representa en la Figura 6.5: Un rayo láser pulsado a 1024nm (*Lambdaphysik Scanmate*; matriz YAG, emisor Neodimio) es concentrado y dirigido a la membrana, soportada en un sensor piezoeléctrico de baja frecuencia y su respuesta optoacústica estudiada mediante gráficos de tiempo *versus* voltaje en un osciloscopio (*Tektronics 8800, USA*). Los datos fueron normalizados mediante el uso de MathLab (software) y los gráficos realizados y procesados mediante *Origin*.

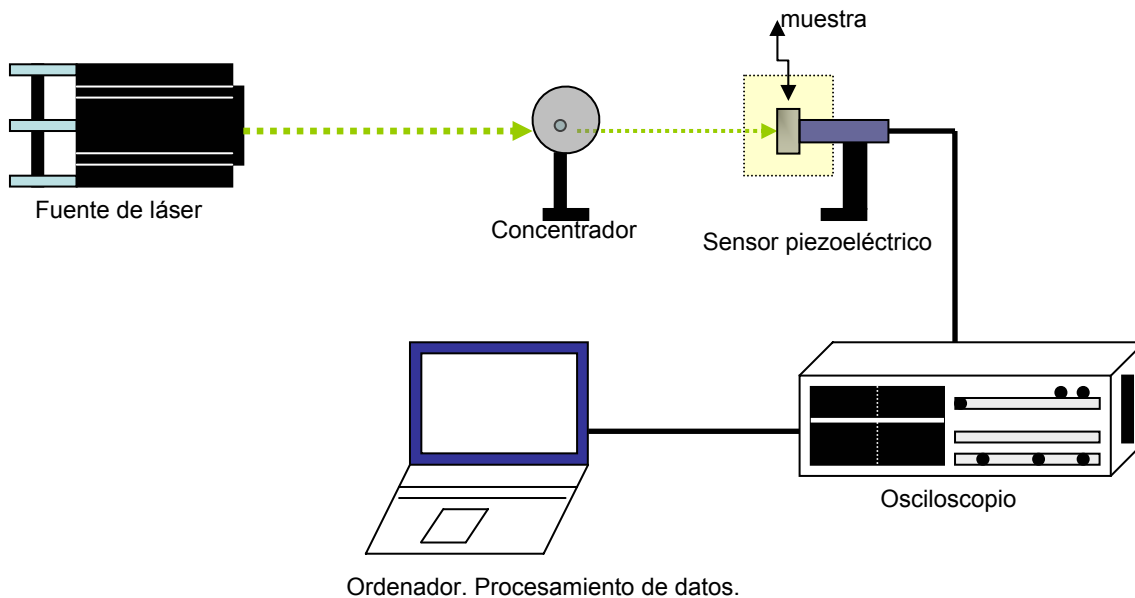


Figura 6.5. Esquema del Modelo experimental utilizado para las pruebas de Optoacústica. .

Bases de la experimentación.

Mediante un diseño de experimentos factorial (2³) y la determinación de las propiedades físicas (volumen, masa y densidad aparente) de las biopelículas soportadas en la membrana y de la membrana misma, se condujeron series de experimentaciones buscando la aparición de los tiempos de arribo del pulso y así identificar inicialmente la velocidad del pulso al interior del material (*velocidad del pulso = espesor biopelícula / tiempo de arribo del pulso*). Posteriormente, se calculó el módulo de elasticidad (E, flexibilidad y resistencia a la deformación), de la biopelícula, de acuerdo a la siguiente relación $E = \text{densidad del material} \times \text{velocidad}^2$.

Además de E, los materiales deben caracterizarse en cuanto a módulo de rigidez (G, deformación por fuerza de cizalla) y a módulo de Poisson (ν , tensión o deformación perpendicular); entre estos parámetros existen múltiples relaciones.

7 Resultados y Discusión

7.1 Flujo crítico y velocidad de taponamiento

Se determinó el flujo crítico en las membranas de UF que se utilizaron en el experimento. Para ello se trabajó con la metodología clásica de Field *et al.* (1995) corroborada por Madaeni *et al.*, (1999). Como primer paso, se realizaron incrementos discretos en la presión aplicada al sistema para observar la respuesta de filtración con tres diferentes fluidos: agua destilada, agua residual cruda y efluente UASB; a partir de estos gráficos (ver anexo D), se calcularon las velocidades de taponamiento (pendientes de los gráficos PTM vs t) correspondientes a cada PTM aplicada y se procedió a relacionar estas con el flujo de permeado teórico obtenido de la ley de Darcy o modelo de resistencia. Estos gráficos permiten, a través de la identificación de puntos de inflexión, determinar el flujo crítico. (Figura 7.1).

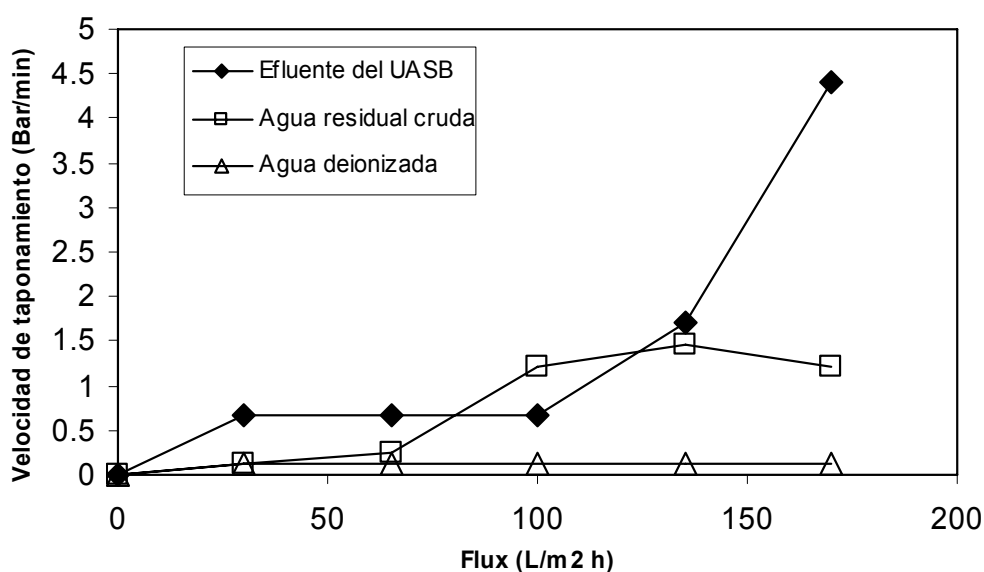


Figura 7.1. Determinación del flujo crítico del arreglo experimental para tres tipos de agua

De esta figura se desprende un flujo crítico propuesto para el efluente UASB de 145 L/m² h y para agua residual cruda de 75 L/m² h. La línea recta que describe el comportamiento de filtración con agua deionizada, corresponde a la ausencia de taponamiento.

La velocidad de taponamiento es consecuencia de la tasa de adición de partículas suspendidas sobre la superficie de una membrana cualquiera. Dicha tasa, al permanecer constante y cercana a cero en los experimentos realizados con agua deionizada, no sólo demuestra que no existe taponamiento de la membrana al filtrar agua pura sino que además confirma que existe una tasa de taponamiento intrínseca, es decir relacionada con las características físicas del material de la membrana, y que esta tasa sería de 0.12 bar/min durante los intervalos de presión experimentales. Este valor se encuentra también al analizar el comportamiento de la curva obtenida con agua residual cruda ya que con fluxes de 30 L /m² h (primer cuadro blanco) puede observarse que la tasa de taponamiento corresponde a la intrínseca, es decir es de 0.12 bar/min, de tal forma que puede afirmarse que antes de ese punto no se lleva a cabo taponamiento o bien este se lleva a cabo a tasas muy reducidas.

De acuerdo al comportamiento gráfico, las tasas iniciales de taponamiento relacionadas a los ensayos con efluente UASB son superiores a las correspondientes a agua residual cruda ya que con fluxes de 30 L/m² h la velocidad de taponamiento registrada fue de 0.68 bar/min, valor considerablemente más alto que el identificado como intrínseco. A partir de este punto de análisis pueden ubicarse dos situaciones contrapuestas: por un lado que el incremento lineal del taponamiento sea visto como flujo mayor al crítico o bien que ese incremento en la tasa de taponamiento se encuentre relacionado con los fenómenos de concentración-polarización. Después de realizar un análisis en conjunto de todos los cambios en la velocidad de taponamiento se confirma que la segunda opción es la más viable ya que no pueden dejarse de lado los cambios abruptos observados a partir de fluxes de 100 L/m²h. En efecto, tales incrementos describen rectas cuya pendiente se incrementa gradualmente señalando un taponamiento cada vez más intenso, en particular para el caso del efluente del reactor UASB. Por tales elementos, se estableció el intervalo de flujo crítico en valores por encima de 100 L/m²h considerando al fenómeno de concentración-polarización como agente causal del incremento en las tasas de taponamiento durante los primeros minutos de filtración.

Las curvas de taponamiento descritas por el efluente UASB y el agua residual cruda, aparentemente contrapuestas, pueden ser comparadas e interpretadas en relación a su contenido e incidencia de material taponante, medido como índice de taponamiento o SDI, de *Silt Density Index* (Tabla 7.1 y Anexo B).

TABLA 7.1 ÍNDICE DE TAPONAMIENTO EN DIVERSOS FLUIDOS A 20° CELSIUS

Fluido	SDI ₁₀
Agua Deionizada	0.16
Agua residual Cruda	2.13
Efluente UASB (TRH =3)	7.1

TRH =tiempo de retención hidráulica

Ambas curvas en la Figura 7.1 presentan dos puntos de inflexión: en el caso del agua residual cruda, cuya tendencia al taponamiento es baja (SDI₁₀ = 2.13), denota un incremento tenue pero sostenido hasta alcanzar el valor de la tasa de taponamiento intrínseco y posteriormente registrar incrementos claros a fluxes más altos que terminan en una meseta en los que la tasa de taponamiento no cambia debido a que el proceso de filtración se estabiliza, probablemente porque la velocidad de recirculación, se encuentre removiendo constantemente las pocas

deposiciones de sólidos que ocurre en la membrana dado el bajo SDI_{10} que presenta el agua residual. Por otro lado, la curva del efluente UASB, de alta capacidad taponante ($SDI_{10} = 7$) muestra un taponamiento claro desde el primer punto experimental de filtración rebasando incluso el límite de la velocidad de taponamiento intrínseco. Sin embargo, durante un largo intervalo de flux se mantiene constante para que, de manera abrupta, la velocidad se incremente taponando cada vez más poros de membrana. Debido a los tiempos de experimentación y a la capacidad taponante del efluente UASB, no se logra consolidar la etapa de meseta, es decir, la consolidación de una capa taponante.

Con base en este análisis, se propuso el trabajar en condiciones subcríticas (3.5 Bar de presión transmembrana que corresponde, de acuerdo con la ley de Darcy a un flux de 127 L/m² h) para que el taponamiento se llevara a cabo a tasas reducidas.

7.2 Taponamiento en Operación a largo plazo

En las Figuras 7.2 y 7.3 se muestra el flux en un tiempo prolongado de operación de la membrana para ambos sistemas. En ella se identifican dos etapas: la primera, que ocurre durante las primeras cinco horas de filtración, corresponde a la etapa de taponamiento inicial rápido y una segunda etapa de gran amplitud, la fase de taponamiento progresivo.

Al parecer no existe diferencia entre el taponamiento, la velocidad de colmataje y los tiempos de retención celular (TRC) a los que operaron los bio-reactores de membrana durante las primeras 55 horas de filtración, ya que las curvas de filtración son prácticamente idénticas y las velocidades de taponamiento son del mismo orden (Sistema I, 14.5 y Sistema II, 17.7 L/m²h/h). Al cabo de 55 horas de operación, los sistemas I y II presentan fluxes de 6.9 y 8.2 L/m²h que al compararse con el flux inicial de 48.1 L/m²h, representa una reducción entre el 83 y el 86% del mismo.

La existencia de un flujo debajo del cual no existe taponamiento (flujo subcrítico) propuesto por Field *et al.* (1995) no corresponde con lo encontrado en estos experimentos ya que, aun trabajando en condiciones subcríticas, se llevó a cabo el colmataje de la superficie de filtración presentando ello un comportamiento típicamente logarítmico. Otros autores (Cho y Fane, 2002; Brookes *et al.*, 2003; Judd, 2005) han refutado la hipótesis del flujo subcrítico, afirmando que es un concepto limitado a sistemas que operan con bajas presiones y con agua residual muy diluida. La caída del flux en forma logarítmica durante las primeras cinco horas de operación se ha explicado por medio del fenómeno de concentración-polarización en medio acuoso (Schneider y Tomoyuki, 2001; Shaw, 1975) donde el taponamiento es inducido básicamente por atracción electroestática.

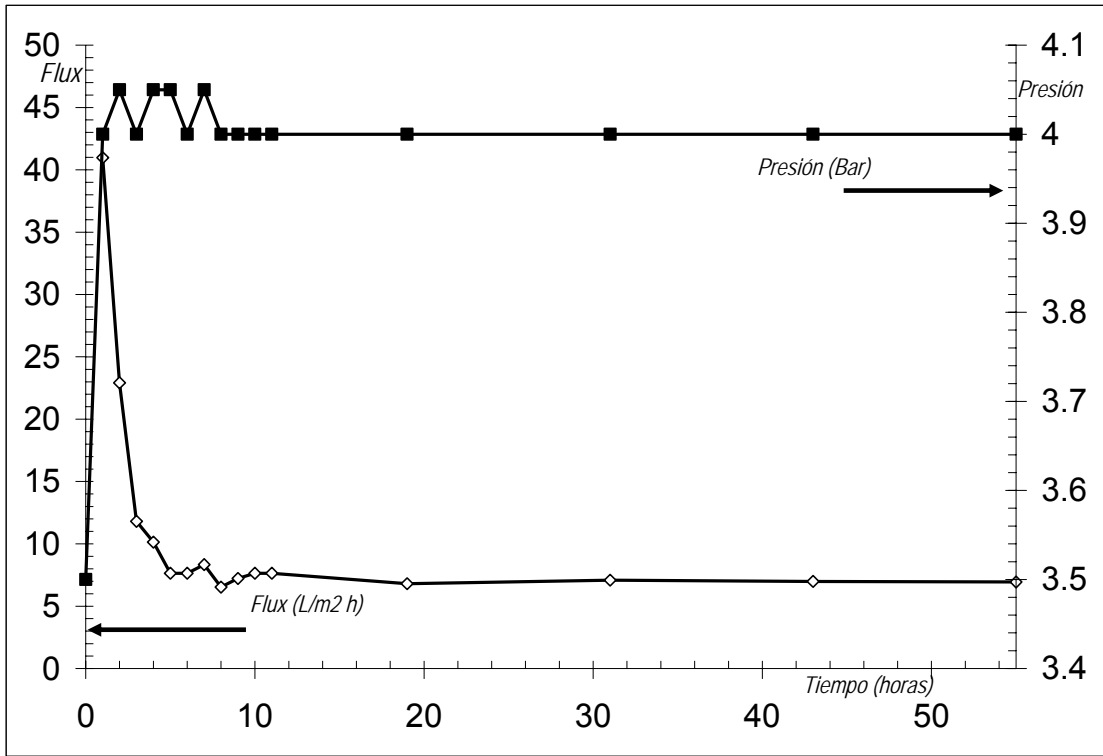


Figura 7.2. Comportamiento de filtración/taponamiento del sistema I.

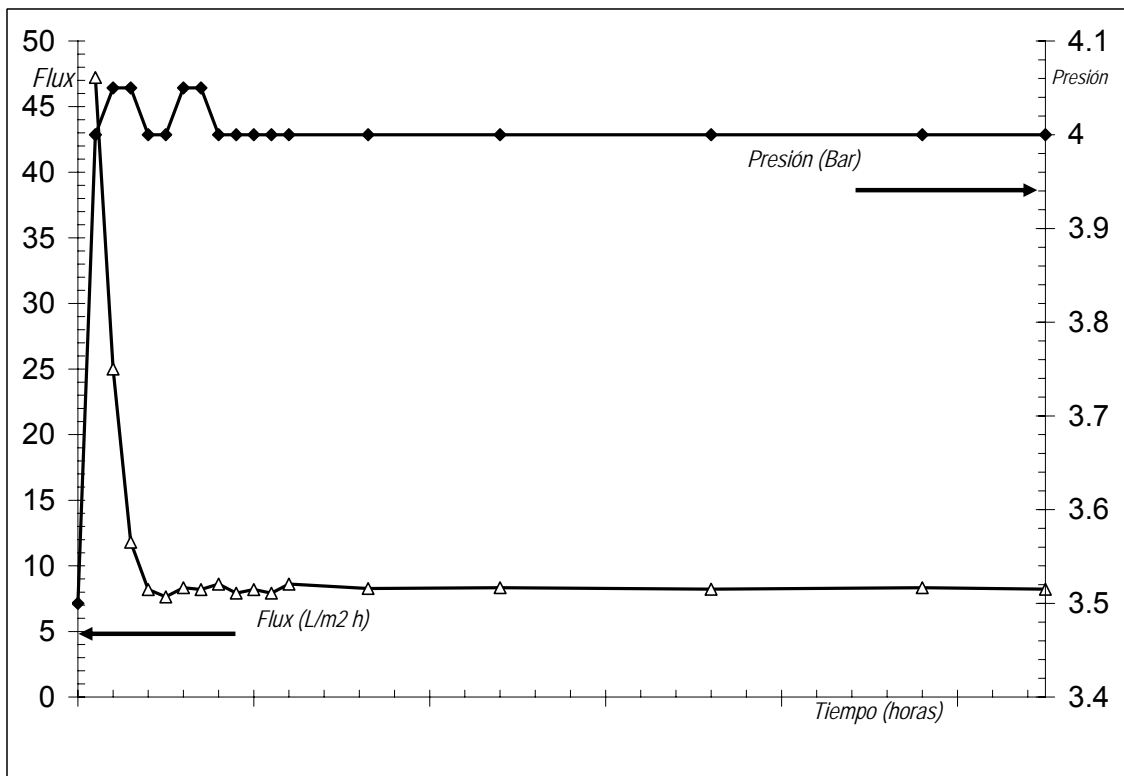


Figura 6.3. Comportamiento de filtración/taponamiento del sistema II.

7.3 Remoción de contaminantes

La depuración de contaminantes en los sistemas estudiados fue efectiva en lo que respecta a la contaminación biológica: En ambos sistemas se logró la completa retención de huevos de *A. Suum*, además de la remoción de coliformes fecales (Tabla 7.2) hasta niveles que permiten el cumplimiento de la normatividad mexicana para reúso con contacto directo de agua tratada (NOM-003-SEMARNAT-1997). En cuanto a la remoción de huevos de helminto, debe destacarse el papel del reactor UASB, ya que en ambos bio-reactores se lleva a cabo la retención de más del 60% de los huevos adicionados. Después de la operación a largo plazo (100 d), el lodo de cada reactor fue analizado obteniendo que el reactor del sistema I presentó una concentración de 27 HH/ g lodo seco mientras que el del sistema II tuvo 16 HH/ g lodo seco. La remoción de DQO fue la esperada en ambos sistemas (alrededor del 50%) considerando que el tiempo de retención hidráulica (TRH) de los reactores UASB fue bajo (3 h). Aún considerando esto, el efluente de la membrana de ultrafiltración logró alcanzar una concentración de DBO y SST que permite alcanzar los límites máximos permisibles de la norma antes referida.

TABLA 7.2 EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS Y EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE LOS SISTEMAS EXPERIMENTALES.

Sistema I	agua cruda (σ)	UASB (σ)	UF (σ)	% remoción global
DQOt <i>mg O₂/L</i>	646 (103)	300 (69.1)	104 (11.6)	87
DQOs <i>mg O₂/L</i>	385(63.2)	198 (55.2)	No determinado	--
DBO ₅ <i>mg O₂/L</i>	No determinado	No determinado	32 (5.1)	--
STT <i>mg/L</i>	681 (75.5)	612 (76.1)	317 (124)	50
STV <i>mg/L</i>	277 (42.5)	225 (22.8)	158 (49)	43
STF <i>mg/L</i>	404 (37.9)	387 (66.1)	159 (109.7)	60
SST <i>mg/L</i>	140 (17.9)	77 (17.2)	<1	100
SSV <i>mg/L</i>	120 (13)	69 (15)	<1	100
SSF <i>mg/L</i>	20 (6.8)	8 (2.8)	<1	100
SDT <i>mg/L</i>	541	535	315	41
SDV <i>mg/L</i>	157	156	157	0
SDF <i>mg/L</i>	384	379	158	63
HH <i>HH/L</i>	25 (0)	10 (3.5)	0 (0.85)	100
CF (NMP/100ml)	10 ⁴	No determinado	100	2 log

Sistema II	Agua cruda (σ)	UASB (σ)	UF (σ)	% remoción global
DQOt <i>mg O₂/L</i>	646 (103.7)	318 (41.4)	106 (13.9)	86
DQOs <i>mg O₂/L</i>	385(63.2)	226 (39.8)	No determinado	--
DBO ₅ <i>mg O₂/L</i>	No determinado	No determinado	31 (6.3)	--
STT <i>mg/L</i>	681 (75.5)	601 (68.1)	301 (161.1)	56
STV <i>mg/L</i>	277 (42.5)	201 (91)	142 (44.9)	49
STF <i>mg/L</i>	404 (37.9)	400 (61.9)	159 (109.7)	60
SST <i>mg/L</i>	140 (17.9)	68 (12.7)	<1	100
SSV <i>mg/L</i>	120 (13)	58 (10.6)	<1	100
SSF <i>mg/L</i>	20 (6.8)	10 (2.6)	<1	100
SDT <i>mg/L</i>	541	533	299	45
SDV <i>mg/L</i>	157	143	141	11
SDF <i>mg/L</i>	384	390	158	59
HH <i>HH/L</i>	25 (0)	10 (1.67)	0 (0.6)	100
CF (NMP/100ml)	10 ⁴	No determinado	100	2 log

Llama la atención la baja remoción de sólidos disueltos en ambos sistemas (menor al 50%) y en particular de los disueltos volátiles. Tal resultado indica que la remoción biológica en el reactor anaerobio es muy limitada y en la membrana es prácticamente nula. Debe señalarse que una fracción no cuantificada de sólidos suspendidos volátiles del influente se hidroliza dentro de la cama de lodos del reactor UASB, lo que contribuye internamente con los sólidos disueltos volátiles. La baja remoción del sustrato soluble, expresado como SDV, está relacionada con la naturaleza y alta dilución del sustrato que limita la actividad de los microorganismos metanogénicos del reactor UASB. Este efecto se ve aumentado por la temperatura de operación, alrededor de los 20°C. Al disminuir la actividad microbiana se acumulan productos intermedios del metabolismo, en su mayoría solubles. Por otro lado, es de notar la alta remoción de sólidos disueltos fijos en la membrana (del orden del 60%), aspecto que conduce a pensar en fenómenos de floculación o cristalización a nivel de la biopelícula. Este aspecto será abordado con mayor detalle más adelante.

En otros procesos anaerobios, algunos autores han reportado que los pesos moleculares de estas sustancias varían desde 0.5 a 200 kDa y que, en TRC altos (mayores a 15 días), predominan las de alto peso molecular (Barber y Stuckley, 1999). Como era esperado, la membrana de ultrafiltración utilizada no alcanzó a retener la totalidad de las sustancias solubles reteniendo únicamente las sustancias cuyo peso molecular era mayor a 40 kDa (Por ejemplo ácidos fúlvicos y húmicos). Si el efluente de los reactores UASB presenta una elevada concentración de compuestos solubles (del orden de 500 mg/ L en los reactores evaluados) es posible que su retención en las membranas ocurra de manera parcial dejando pasar todos aquellos que tengan un peso molecular por debajo del corte molecular de la membrana. Aunque la remoción global de contaminantes solubles es casi cero esto no significa que una degradación no se haya llevado a cabo, más bien se alcanza un equilibrio entre las sustancias solubles producidas por los grupos microbianos y las producidas/consumidas para la producción de biogás. De igual forma la cantidad de sólidos orgánicos disueltos podría indicar una baja eficiencia de los Bio-reactores UASB debido, como ya se explicó, a la alta dilución del sustrato. Debe destacarse que ocurre una marcada disminución de material inorgánico (sólidos fijos) durante la ultrafiltración lo cual podría indicar que algunos minerales o bien sales de estos, pueden enlazarse con los compuestos que constituyen las biopelículas. Ya sea conoce la capacidad de las SPE para quelar metales o bien favorecer la bio-floculación de algunos inorgánicos (Flemming y Wigender, 2001a y 2001b). Estudios posteriores deberán caracterizar tanto el perfil molecular como los grupos químicos presentes en las SPE por un lado y, por el otro, elucidar el papel quelante de SPE con algunos metales presentes en el agua residual para así comprobar estas hipótesis.

7.4 Formación y superposición de biopelículas durante la filtración a largo plazo.

7.4.1 Taponamiento en función del tiempo. Hipótesis de colapso / compresión.

Se estudió el fenómeno de taponamiento a mayor plazo para lo cual las membranas utilizadas no fueron sometidas a limpieza química durante 510 horas de operación. En la Tabla 7.3 se presenta el análisis de material volátil y fijo en las biopelículas para los sistemas I y II. Se

observa que en ambas membranas taponadas existen incrementos en la cantidad de biomasa (material volátil) así como acumulación de sales inorgánicas. Es decir, según estos resultados, el material que constituye las biopelículas es un material híbrido orgánico-inorgánico que posee una estructura compacta debido a las intensas presiones en las que fue construido en el interior de la membrana tubular. Como es posible observar, la biopelícula está constituida básicamente por material orgánico volátil en un 85% y en 15% de material inorgánico. Algunos autores ya han discutido la estructura de biopelículas generadas en tratamiento de agua residual revelando que las sustancias poliméricas extracelulares (SPE), secretadas por microorganismos en condiciones de estrés biológico y/o mecánico (Yun *et al.*, 2006), son determinantes en la conformación y propiedades de los biofilmes (Flemming *et al.*, 2000).

TABLA 7.3 DETERMINACIONES GRAVIMÉTRICAS EN LAS MEMBRANAS CON 510 HORAS DE OPERACIÓN.

	Base seca	material orgánico	material inorgánico	incremento ST	incremento SV	incremento SF
	mg/cm ²	mg/cm ²	mg/cm ²	mg/cm ²	mg/cm ²	mg/cm ²
membrana limpia	33.6	31.6	2	NA	NA	NA
sistema I	36.4	33.9	2.5	2.8	2.3	0.5
sistema II	36.2	33.8	2.4	2.6	2.2	0.4

En las Figuras 7.4 y 7.5, se presentan las curvas de presión y flux contra tiempo en donde es posible identificar puntos de inflexión. El sistema I presentó, después de la caída exponencial del flux en las primeras 55 horas relacionada con el desarrollo de una biopelícula, tres comportamientos semejantes, aunque de menor magnitud, que bien podrían relacionarse con la formación de tres capas de biopelícula en tiempos de filtración elevados. Los tiempos de formación de cada capa fueron cada vez menores, por lo que puede ser válido establecer que después de la formación de la primera capa taponante, la adhesión de una biopelícula sobre la otra se ve favorecida en cuanto a su formación. El mismo comportamiento se presentó para el sistema II en donde únicamente varían los tiempos de formación de las capas subsecuentes.

La Tabla 7.4 resume los tiempos propuestos para la formación de biopelícula obtenidos a partir de las Figuras 7.4 y 7.5; la diferencia de tiempo determinada entre los datos de ambas sistemas es nula en relación a las primeras etapas de filtración (170-180 horas) se incrementa progresivamente. El taponamiento en una membrana depende de varios factores como el material de la membrana, las condiciones hidrodinámicas y de operación además de las características del agua a filtrar (Rosenberger *et al.*, 2002). De esta manera, al ser el tiempo de retención celular (TRC) la variable que diferencia ambos sistemas, la variación en el tiempo de formación de las biopelículas posiblemente se encuentren relacionadas con esa variable. Algunos autores (Barber y Stuckley, 2001) han demostrado que existen diferencias cualitativas y cuantitativas en cuanto a biosólidos en efluentes anaerobios operados a diferentes TRC.

TABLA 7.4 TIEMPOS PROPUESTOS EN LA FORMACIÓN DE CAPAS DE BIOPELÍCULA

	Sistema I	Sistema II	Diferencia
Formación de la 1 ^a Capa (horas)	9	9	0
Formación de la 2 ^a Capa (horas)	199	180	19
Formación de la 3 ^a Capa (horas)	174	205	31
Formación de la 4 ^a Capa (horas)	122	78	44

De acuerdo con el análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), se determinó el espesor de las biopelículas observándose diferencias. La medida fue de 15.03 micrómetros para la desarrollada en el sistema I y de 17.34 micrómetros para el sistema II, ambos correspondientes a un lapso de operación de 510 horas.

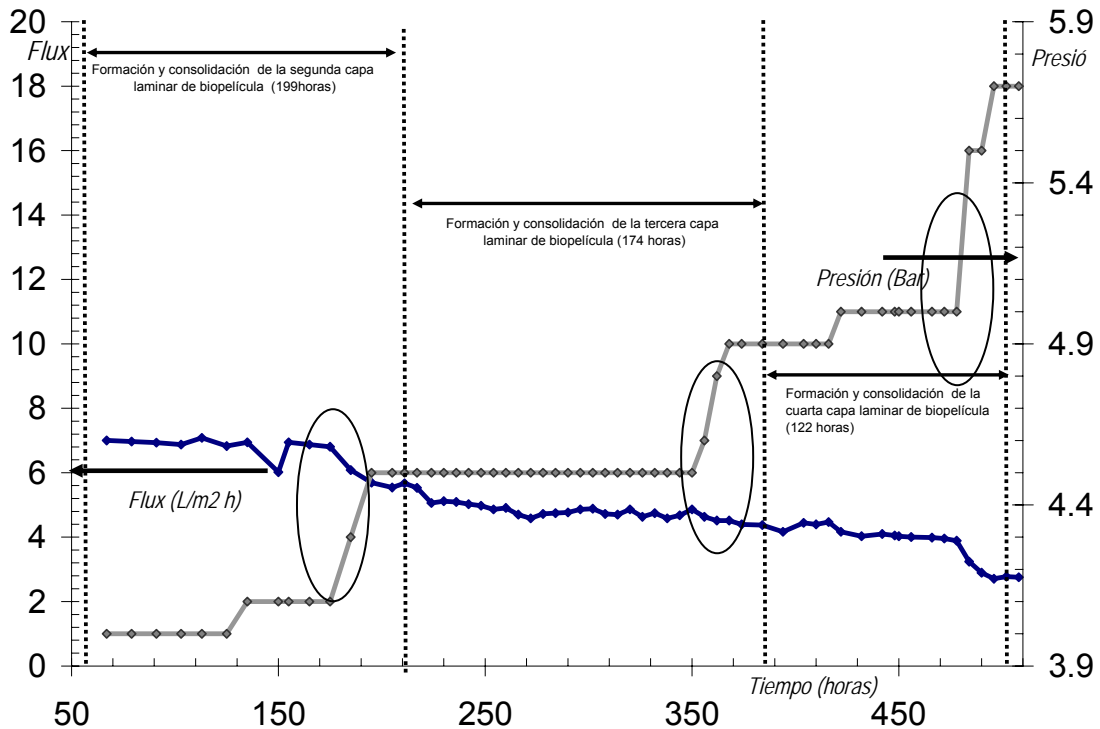


Figura 7.4. Taponamiento progresivo en la membrana utilizada en esta investigación en el sistema I.

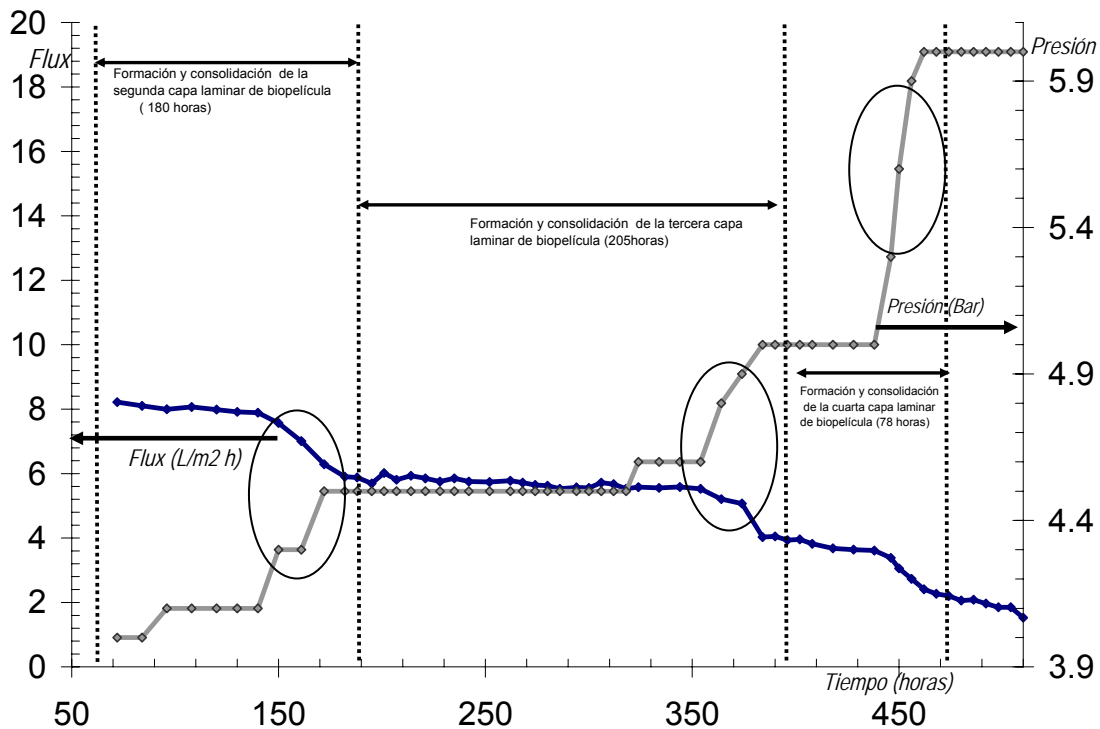
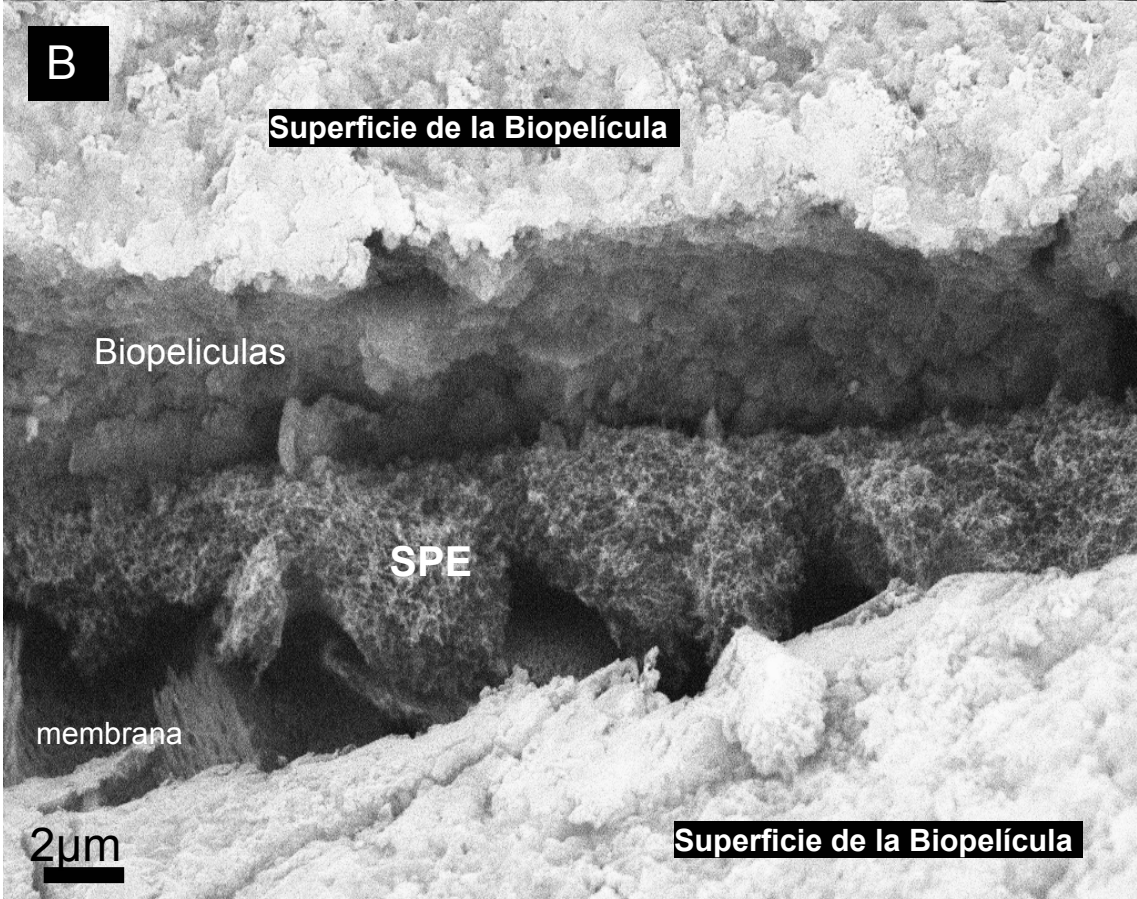
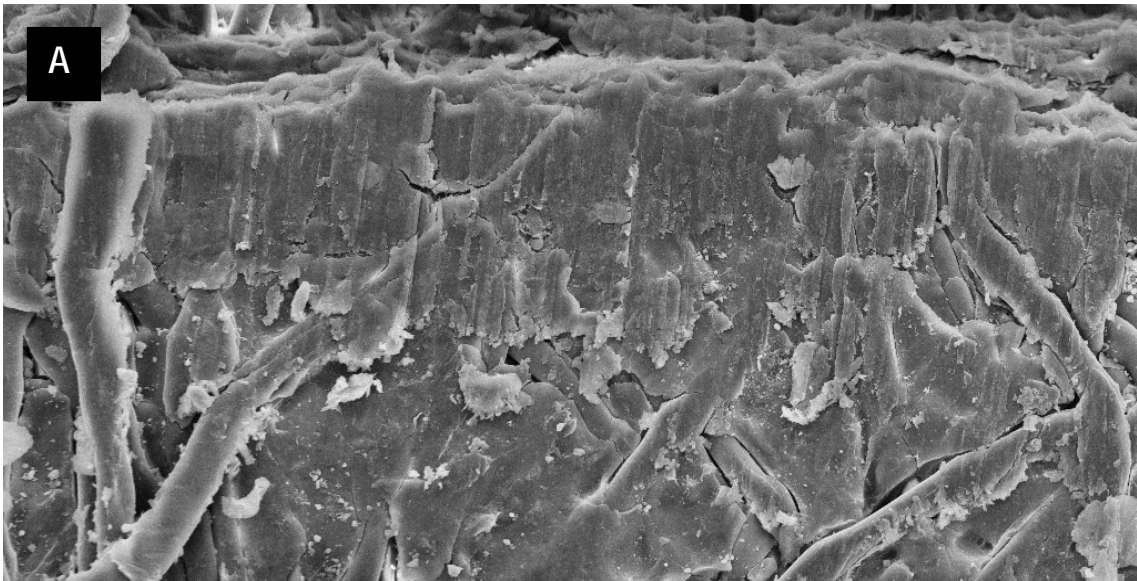


Figura 7.5. Taponamiento progresivo en la membrana utilizada en esta investigación en el sistema II.



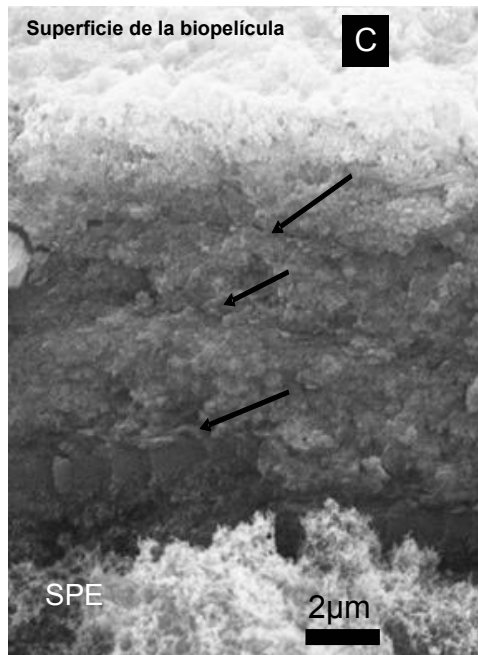


Figura 7.6 Imágenes de microscopio electrónico de barrido. A) Detalle transversal de la membrana limpia con 250x ; B) Corte transversal a 2500x de la biopelícula del sistema II donde se aprecia la base de la membrana y la biopelícula formada sobre ella así como los SPE generados; C) corte transversal a 5000x de la biopelícula del sistema I donde se aprecian capas superpuestas de biopelícula señaladas con las flechas negras de espesor aproximado de 2 a 4 micrómetros.

Aunque en función del tiempo el flux disminuye por la acumulación de biopelículas, el flux en los tiempos de estudio de estos sistemas nunca cesó. Flemming *et al.* (2000) aseguran que en biopelículas multicapa, como las desarrolladas en los sistemas aquí analizados, las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) actúan como barrera de difusión para moléculas de mayor tamaño. Ello lleva a pensar que dentro de la estructura de la biopelícula existe una red irregular de canales de flujo, formados por SPE, células, sales minerales, materia coloidal diversa. En este sentido, el micro-análisis EDS realizado sobre las biopelículas logró identificar Ca, Fe, Na, Mg, Si y P como componentes inorgánicos del bio-material. Las condiciones de filtración (elevada presión, flujo turbulento, variación en la concentración de nutrientes y minerales) conducen a suponer que la formación de la biopelícula sea una consecuencia de un proceso de mineralización biológicamente inducida (MBI) revisado por Mann (2001), en el cual, ciertos compuestos (en este caso carbonatos, hidróxidos, fosfatos, de Mg, Ca o Fe) son depositados sobre la matriz de SPE mediante precipitación, lo cual aumenta las interacciones entre varios procesos metabólicos y el medio ambiente circundante favoreciendo con esto la consolidación de nichos microbianos, estructurados fundamentalmente en las SPE.

La intrincada red de polímeros extracelulares es secretada como estrategia de los microorganismos para captar nutrientes en condiciones de estrés (Yun *et al.*, 2006) mientras que por sus propiedades fisicoquímicas (distribución de carga eléctrica, por ejemplo) provee de numerosos sitios de inicio de mineralización denominados sitios de epitaxia. Textos recientes sobre biopelículas (Curt-Flemming *et al.*, 2000) afirman que las SPE son el esqueleto de la arquitectura de las biopelículas y que en función de sus características fisicoquímicas (interacciones van der Waals, electroestáticas y puentes de hidrógeno) influyen las propiedades mecánicas y de cohesión en las mismas. Por otra parte, y en apoyo a la idea anterior, Sylin-Roberts y Sharp (1986) mencionan que las proteínas de una matriz biológica pueden influenciar las propiedades mecánicas de un material cristalino mediante la construcción de una intrincada red fibrosa similar a la de un esqueleto de acero en concreto reforzado; la serie

de biopelículas desarrolladas son bio-materiales cuya formación sería dirigida, aunque no de manera ordenada, por un esqueleto de SPE que además de funcionar como soporte estructural podría proveer de sitios activos de cristalización de sales inorgánicas. La estabilidad de los agregados celulares comprimidos en las biopelículas se ve favorecida por la presencia de iones divalentes como calcio, magnesio o hierro los cuales pueden formar puentes de enlace entre cadenas de polisacáridos posibilitando la formación de una matriz gelatinosa, medio biogénico por excelencia (Körstgens *et al.*, 2001). Es dentro de la matriz gelatinosa en donde comienza la bio-mineralización que se ve favorecida por las condiciones microambientales de alta presión, presencia de nutrientes y micronutrientes además del estrés osmótico y mecánico asociado a condiciones hidrodinámicas turbulentas.

Los cambios discontinuos de presión observados en las figuras 7.4 y 7.5, relacionados con el cambio discontinuo de flux en función del tiempo de operación, y mediante la evidencia que otorgan las micrografías (Figura 7.6) pueden ser explicados mediante una hipótesis de colapso y compresión de la estructura biomineralizada antes mencionada y que se propone en este trabajo. Esta sugiere que, en las condiciones propias de la experimentación realizada (presión 4-6KPa, flujo turbulento, saturación de sólidos), se lleva a cabo una concentración masiva de sólidos en la matriz de SPE que provoca en primera instancia la ruptura de las fuerzas de estabilización de la red polimérica seguida de constricción en los canales de flujo presentes dentro de ella. Este efecto se ve reflejado en el incremento exponencial de la presión de filtración, que colapsa y compacta la estructura, y en consecuencia, lleva al decremento, también exponencial, del flujo de permeado. La superficie comprimida se convierte en una nueva superficie de filtración en la que se desarrollan nuevas estructuras taponantes derivadas de la actividad de consorcios microbianos y su inherente capacidad de secreción de biopolímeros. Ello genera la delimitación entre una capa de biopelícula y otra mostrada en las micrografías (Figura 7.6).

7.4.2 Optoacústica Pulsada y Propiedades Mecánicas de las Biopelículas.

El control de las biopelículas es importante en el área del tratamiento de aguas residuales, ya que su formación contribuye al aumento de los costos de mantenimiento y operación de bio-reactores de membrana. Para comprender los mecanismos involucrados en su formación, sería importante hacer crecer de manera controlada estos bio-materiales ya que debido a su naturaleza orgánico-inorgánica podrían presentar propiedades mecánicas de interés. Como antecedente, se ha reportado que algunas biopelículas alcanzan módulos de elasticidad (E) de hasta 40 N/m² y con la adición de metales alcalino-térreos y de transición, esta propiedad se potencia hasta 300 N/m² (Stoodley *et al.*, 2001).

Se han descrito varias metodologías para determinar las propiedades de biopelículas (Körstgens *et al.*, 2001; Stoodley *et al.*, 1999 y 2001; Ohashi *et al.*, 1994 y 1999) que confirman la estabilidad mecánica de estos materiales frente a diferentes esfuerzos aplicados. Ya se ha demostrado que las biopelículas generadas en los sistemas estudiados se encuentran conformadas por superposición de capas que, debido a las condiciones de presión, son continuamente comprimidas sobre el material de soporte generando bio-materiales; en el interior de esa estructura compacta se llevarían a cabo, con una alta probabilidad, enlaces entre los compuestos orgánicos y los inorgánicos provocando que las propiedades mecánicas de estos compuestos sean potenciadas. La membrana utilizada en estos experimentos es del tipo tubular, con la biopelícula adherida (y compactada) sobre su superficie. Para determinar las propiedades de la biopelícula se deben desarrollar métodos analíticos que permitieran cuantificar de manera

adecuada estas propiedades. Como primer intento en este sentido, se decidió trabajar con optoacústica pulsada para determinar las propiedades de las biopelículas compactas.

Los datos de este apartado se documentan en la Tabla 7.5. Las muestras sometidas a análisis fueron tres: la membrana limpia, una parcialmente taponada (150 horas de filtración) y la del sistema I a 510 horas de filtración.

TABLA 7.5. DENSIDAD APARENTE DE MEMBRANAS

Membrana	Horas de operación (horas)	Densidad Aparente (kg/m ³)
Limpia	0	557.64 ± 83.28
Parcialmente taponada	150	582.21 ± 41.88
Sistema Experimental I	510	928.91 ± 65.28

De acuerdo a la tendencia mostrada en la tabla 7.5, la densidad del material analizado se incrementa en función del tiempo, es decir, la biopelícula generada se hace más gruesa y compacta conforme aumenta el tiempo de filtración. Mediciones de espesor (micrografías SEM) sugieren que la membrana se compacta debido a la acción de la presión por lo que es lógico pensar que la biopelícula se comprima debido a la acción de la presión aplicada al sistema (4-6bar). La densidad aparente del material se ve incrementada por la acumulación de materiales orgánicos e inorgánicos sobre ella.

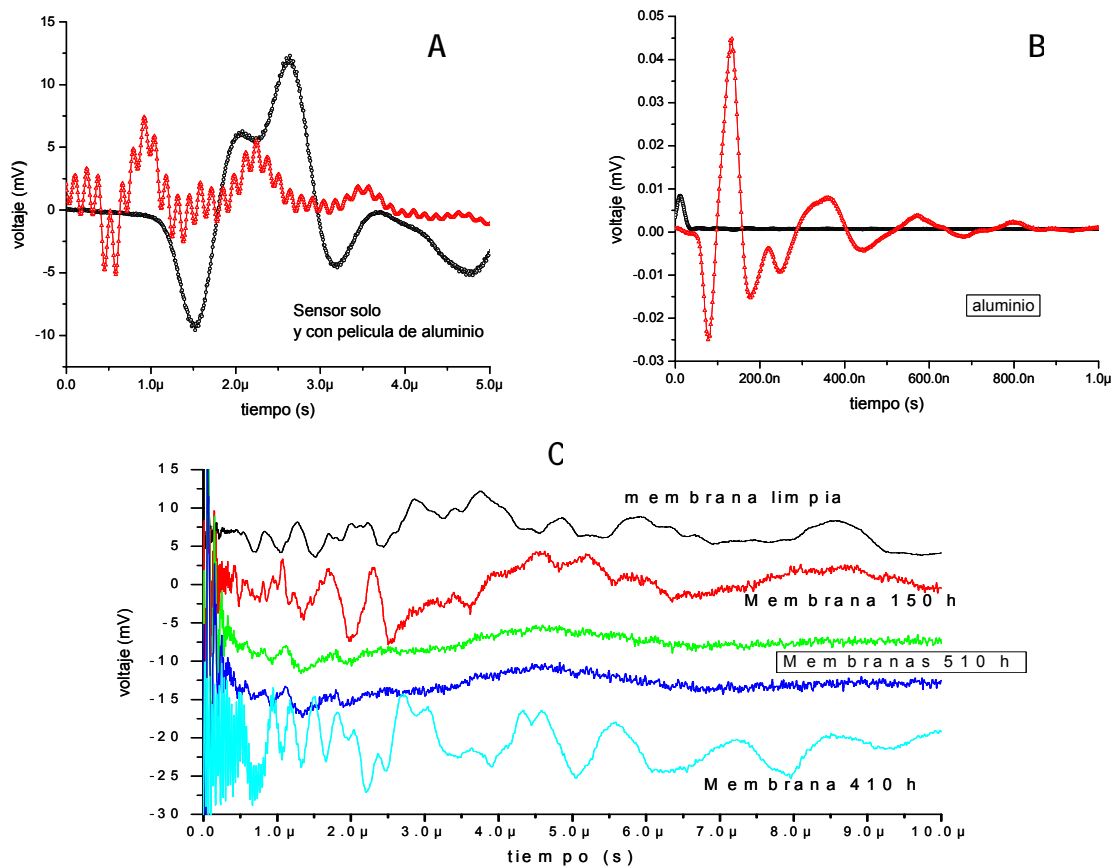


Figura 7.8. A Respuestas fotoacústicas del sensor piezoeléctrico (8MHz) y del mismo sensor recubierto de una película de aluminio. B Respuesta fotoacústica de una placa de aluminio y C. Efecto fotoacústico en las membranas de polietersulfona (experimentos por triplicado de la membrana del sistema I)

En la figura 7.8 se presentan los efectos optoacústicos del sensor, los materiales complementarios (sensores, capa aluminio) y las membranas total o parcialmente taponadas comparadas con una membrana limpia. Los gráficos 6.8a y 6.8b se realizaron como calibración y para identificar la influencia de estos sobre las determinaciones en las membranas; en ambos casos las curvas son típicas (picos L, T, y R) ya que ambos materiales son sólidos metálicos y por ende poseen una estructura regular, laminar y bien definida. Para materiales como el aluminio, el coeficiente de deformación E es cercano a 0.3 (Cristian Zaldo, Instituto de Ciencia de Materiales, Universidad Complutense de Madrid, comunicación personal 2006), que es indicativo de alta fuerza de cohesión y correspondencia estructural entre átomos vecinos. Para el caso del sensor, se identifica que el pico L, correspondiente a la luz, pasa a través de él en $0.5\mu\text{s}$ aunque con una capa de aluminio el tiempo de arribo se retarda hasta $1.5\mu\text{s}$. Buscando simular el grosor de la membrana con biopelícula, se analizó el paso del pulso láser en una capa gruesa de aluminio (5mm de espesor) y se encontraron t_a (tiempos de arribo de laser), muy bajos y cercanos a 100ns; esto es, la poca luz que pasa a través del material lo hace a grandes velocidades porque la estructura del metal es altamente ordenada y bien definida. De estos experimentos es posible concluir que la luz se transporta a través del sensor y la capa de aluminio en tiempos que oscilan entre 200-1500ns, por lo tanto, se puede esperar que las señales correspondientes a las membranas taponadas se encontraran en este intervalo de tiempo. Sin embargo, todas las membranas, incluso la limpia, no ofrecieron señales consistentes en cuanto al pico L, cuya agudeza normalmente es notable en relación con los otros picos. Esto se puede explicar por dos situaciones: la biopelícula generada en el seno de la membrana es un biomaterial heterogéneo cuya estructura es irregular presentando además canales tortuosos (ver Figura 7.9) y, por otro lado, no se descarta que el polímero (PES) que conforma las membranas experimente deformaciones en su estructura debidas a la energía térmica del láser, provocando que el proceso de filtración de la luz no sea transversal. La luz láser encuentra, al hacer contacto con la biopelícula soportada en la membrana, una gran diversidad de rutas al dispersarse en los innumerables canales que la ultraestructura de la biopelícula presenta, provocando que el efecto optoacústico se torne irregular y por lo tanto, las señales típicas se vuelvan difusas o se retarden. Las diferencias entre los efectos optoacústicos de la capa de aluminio y las biopelículas demuestran la importancia de la regularidad y la definición de los sólidos cuando se desea realizar su caracterización mediante pulsos láser. Con sólidos metálicos dicho efecto es regular y sin desviaciones de luz, mientras que con sólidos de poca homogeneidad como lo son las biopelículas estudiadas, el efecto se torna multidimensional y las señales difusas. No debe descartarse como importante el efecto de los biominales en la absorción y desviación del pulso láser.

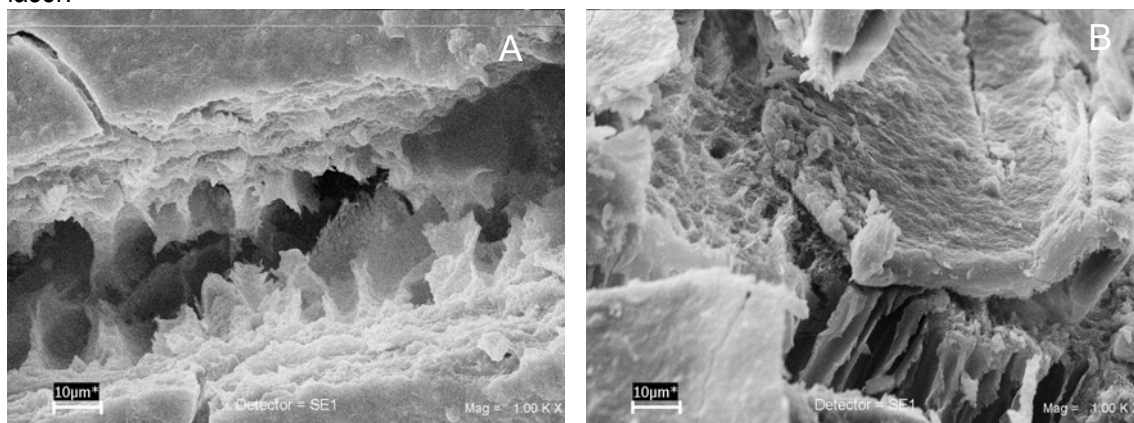


Figura 7.9. Micrografías de las membranas utilizadas en esta investigación. En ellas se puede apreciar la superposición de las estructuras taponantes que mediante metodologías más finas (EDS y PCR) se identificó como material híbrido.

Aunque la técnica optoacústica demostró no ser útil en la determinación de las propiedades viscoelásticas y de porosidad de las biopelículas desarrolladas, principalmente por la heterogeneidad de su estructura compactada (y la existencia de *hoyos de tuza* que desvían los pulsos hasta difuminarlo), existe la posibilidad que esta metodología pueda ser útil para determinar propiedades mecánicas de sólidos más regulares como las estructuras metálicas y materiales nanoestructurados.

7.5 Identificación de Microorganismos asociados a la biopelícula.

7.5.1 Identificación de los microorganismos.

Debido a la complejidad de las biopelículas se eligió un método indirecto para estimar la concentración de microorganismos dentro de ellas. Como primer paso, se extrajo el material genético de la película adherida a la membrana. Para esta operación se utilizó un kit de MO BIO diseñado para extraer ADN de suelos salinos. Un centímetro de membrana fue colocado en tubo eppendorf de reacción y sometido a agitación con un material abrasivo para remover el material celular de la superficie filtrante, posteriormente y, siguiendo las indicaciones de los fabricantes, se logró extraer el material genético. Este extracto se cuantificó mediante espectroscopia observándose una concentración similar en ambas membranas (5.488 μg ADN / cm^2 para Sistema I y 5.722 μg ADN / cm^2 para el Sistema II) y se evaluó la integridad del ADN mediante electroforesis. Flemming *et al.*, (2001) presentan una relación para estimar la cantidad de microorganismos en biopelículas referida a *Pseudomonas putida* (μg ADN \times 16.6 = μg de biomasa celular) por lo que, haciendo válida esta relación, se estima que hay 91.1 μg de biomasa celular por cm^2 en la membrana del sistema I mientras que para el Sistema II es de 94.98. Con ello, y comparando con los sólidos volátiles (SV) reportados en la tabla 6.3, es posible concluir que la biopelícula formada en los sistemas I y II está constituida básicamente por sustancias extracelulares (material acelular de origen microbiano) y que la presencia de minerales como Ca, Mg, Si, P y Fe sugieren la presencia de sales inorgánicas como carbonatos e hidróxidos. Los microorganismos como tales representan menos del 5% de la biopelícula, lo que demuestra el papel de los SPE como parte fundamental de la estructura de las biopelículas.

Posteriormente, el gen ribosomal 16S fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obteniéndose amplicones de aproximadamente 200pb que fueron separados utilizando electroforesis con gradiente de temperatura (TGGE). El perfil electroforético observado (Figura 7.8) demuestra que no hay diferencia (intensidad y presencia de bandas) en cuanto a la microbiota existente en ambas biopelículas de tal forma que se corrobora la poca o nula influencia de los TRC probados en la operación de ambos bioreactores de membrana.

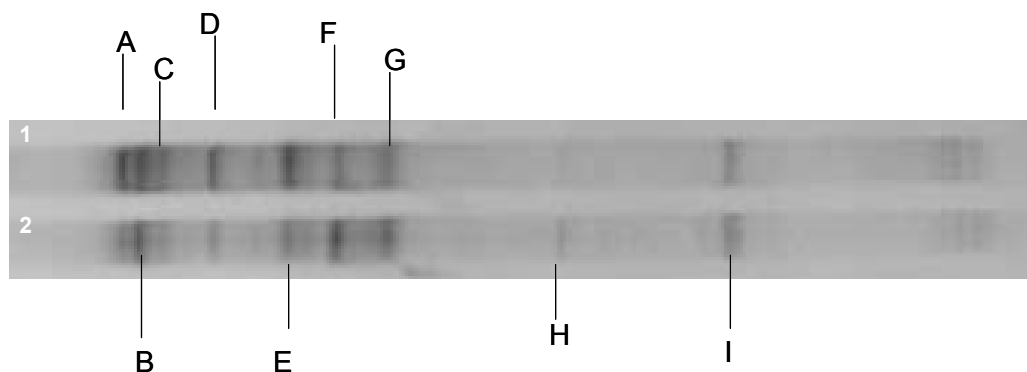


Figura 7.8. Gel de electroforésis con gradiente de temperatura. (voltaje: 130 volts, 5.0 horas de corrimiento con tasa de 2°por hora (59 a 69°C). Para la identificación de bandas ver Tabla 6.5

Las bandas más intensas, identificadas con literales en la Figura 7.8, fueron purificadas y ligadas a plásmidos del tipo Vec-T para posteriormente ser transformadas dentro de células competentes de *E. coli*. Los plásmidos fueron separados y purificados para ser enviados a secuenciación capilar. La secuenciación se llevó a cabo en un aparato ABI PRISM 3100 en el laboratorio de secuenciación del Instituto de Fisiología de la UNAM. Las secuencias de ADN fueron analizadas y comparadas *en línea* con las bases de datos de la NCBI. La Tabla 7.5 muestra los microorganismos identificados en la biopelícula. Es preciso documentar que dos de los nueve insertos comparados, no tienen correspondencia con los reportes de las bases de datos consultadas en el NCBI por lo que se tienen dos opciones: la secuencia de reacciones fue fallida o los insertos sufrieron daños que afectaron su análisis. En adelante la discusión se enfocará sobre los siete genomas identificados. Debe precisarse que no se descarta la presencia de organismos del dominio *archaea* ya que no fueron utilizados cebadores para estos microorganismos. La Tabla 7.5 documenta los microorganismos identificados a partir de los insertos y en el anexo E se muestran los resultados del BLAST.

TABLA 7.5 ALGUNOS MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS EN LAS BIOPELÍCULAS

Banda	Microorganismo identificado (Reporte de NCBI)	Espectancia	% identidad
A	<i>Bosea sp.</i> (s145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	1e-68	99
B	<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> (cepa US6-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	3e-74	99
C	Genoma no identificado en NCBI	NA	NA
D	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (isolate RI56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	7e-26	99
E	<i>Acinetobacter sp. HPC1339</i> (16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	2e-84	99
F	Genoma no identificado en NCBI	NA	NA
G	<i>Sphingomonadaceae bacterium</i> clon no cultivado (SIMO-586 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)	3e-71	99
H	<i>Alpha proteobacterium</i> no cultivada (partial 16S rRNA gene, clone JG35-K2-AG66)	5e-79	99
I	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Phaseolicola</i> (1448A, complete genome)	2..7	--

Como ya fue presentado, se determinó que el porcentaje de microorganismos (medidos de manera indirecta a partir de la relación ADN/biomasa) en las biopelículas es casi cinco por ciento del material volátil, que a su vez representó el 85% del total de la masa de la película. De estos datos, se infiere que el 80 % del material adherido a la membrana son sustancias orgánicas circunvecinas a las células, es decir, sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Esta cantidad, debe decirse, no sólo se encuentra relacionada a metabolitos insolubles de origen microbiano sino también corresponde a la acumulación o precipitación de otros compuestos a través de la filtración o bien por atracciones electrostáticas entre los grupos funcionales de sólidos orgánicos y los presentes en las SPE (Curt-Flemming y J. Wingender, 2001a).

7.5.2 Papel de los microorganismos identificados en la biopelícula.

De acuerdo a los reportes del NCBI, la proteobacteria *N. pentaromativorans* fue aislada de sedimentos marinos de la Bahía de Ulsan en Corea (2004). Es decir, habitat similar al de estos experimentos (ambientes anaerobios sometidos a presiones superiores a la atmosférica). De este análisis se partió para determinar su elección sobre otros genes de micro-organismos con coeficientes de espectancia similares (Anexo E). Esta bacteria se encuentra involucrada en la degradación de un amplio espectro de aromáticos policíclicos, entre ellos el Benzo[a]pireno por lo que no se descarta que la presencia de estos tóxicos en el agua residual tratada.

Por otra parte, debe recalcarse que aunque el coeficiente de espectancia para el microorganismo I es muy alto (2.7). Que este valor de sea tan alto se puede deber a la presencia de un alto número de bases no determinadas en la secuencia. No obstante se decidió relacionarlo con *Pseudomonas. syringae* ya que es microorganismo común en biopelículas (Flemming et al, 2000).

De manera general, y de acuerdo con las bases de datos NCBI, las células procariontes identificados en la biopelícula pueden ser clasificados en dos géneros del grupo de las proteobacterias: *Proteobacterium* (microorganismos representados por las bandas A, B, G y H) y *Pseudomonadae* (D, I y E) organismos cuya capacidad de secreción de SPE se encuentra ampliamente reportada (Flemming et al., 2000; Körstgens et al., 2001, Flemming y Wingender, 2001a). Además, ambas especies sobresalen en varios reportes sobre dinámica de poblaciones en biopelículas generadas en soportes hidrófobos. Estudios de Inmuno-fluorescencia *in situ* (FISH) determinaron que el 80% de la microbiota asociada a la biopelícula desarrollada en soportes de polietileno era la correspondiente a las sub-clases ALPHA, BETTA y GAMMA de *Proteobacterium* (Flemming et al., 2000). Otros estudios con proteobacterias han desarrollado modelos de relación SPE- biomasa celular a partir del desarrollo de biopelículas en organismos del género *Sphingomonadaceae*, una ALPHA proteobacteria, en los que se documenta la cinética de producción de SPE, que durante las primeras horas de crecimiento de biopelículas alcanzan concentraciones máximas demostrando con esto la importancia estructural de los SPE durante la colonización (Kuehn et al., 2001). Por otro lado, *Pseumonadae*, aerobios no fermentativos, se ha convertido en el modelo para estudios con biopelículas ya que secreta una gran cantidad de metabolitos extracelulares, varios de los cuales han sido identificados como dextranos, alginatos y quitina (Stoodley et al., 2001; Körstgens et al., 2001; Flemming y Wingender, 2001b). Debemos precisar que las SPE secretadas por estos microorganismos no sólo son polisacáridos sino que también glicoproteínas, proteínas, ácidos nucleicos, fosfo-lípidos y lipo-polisacáridos y que por lo tanto, las funciones biológicas de la matriz no son solamente estructurales o mecánicas sino que además tienen implicaciones metabólicas de mayor complejidad al fungir como instrumentos de co-metabolismo, transferencia de protones, de transporte y enlace de nutrientes y micronutrientes (Flemming et al, 2000). En bacterias gram-

negativas se han identificado diversas exo-proteínas con capacidad de enlazar nutrientes en condiciones de estrés osmótico (Purdy y Koch, 1976; Morita *et al*, 1982). En *Pseudomonadae* en particular se han reportado los mecanismos extracelulares de captación de aminoácidos esenciales como la fenilalanina (Krajewska y Szer, 1967). En este sentido la función biológica de las SPE en las bio-películas estudiadas sería múltiple: protección, alimento, soporte y posiblemente involucradas en procesos evolutivos.

Dentro del ambiente sintrófico desarrollado en el interior de las biopelículas (recordar que hasta antes de su colapso la estructura de la matriz SPE se supone como un gel reticular y adhesivo), se favorece el intercambio genético inter-especies, de tal forma que es posible que los genes involucrados en las llamadas *islas de patogenicidad* y otros genes estructurales o de resistencia, puedan ser transmitidos entre los grupos involucrados en el sintrofismo (Flemming y Wingender, 2001a). Se han reportado intercambios de plásmidos de resistencia a antibióticos entre *Bosea* y *Sphingomonas* (De Gelder *et al*, 2005). La capacidad de intercambio genético de *S. maltophilia* ha sido estudiada y se encontró que una SPE, el peptidoglucano, sirve de mediador del comensalismo entre esta especie y *B. cereus* (Peterson *et al*, 2006). Otros de los microorganismos aislados son patógenos: algunos para plantas, como *P. Syringae* y otros para el hombre, como *S. maltophilia* y *Acinetobacter spp*, por lo que no se descarta que dentro de las bio-películas estudiadas puedan ocurrir intercambios de material genético. Se clasifica a *Acinetobacter* (microorganismo E) como *Pseudomonadae* por la similitud fisiológica y de patogenicidad entre ambos géneros, discutida por algunos autores (Ferrero, 2005).

Como se reporta en el micro-análisis de EDS, las biopelículas estudiadas presentan compuestos inorgánicos relacionados con Fe, Mg, Si, Ca, P y otros metales. Se ha reportado que la adición de metales di- y trivalentes fortalece las propiedades mecánicas de biopelículas desarrolladas por cultivos puros de *Pseudomonas* debido a que los numerosos grupos carboxilo presentes en las SPE se enlazan de manera covalente con los iones metálicos (Stoodley *et al.*, 2001). Esta unión química otorga estabilidad mecánica provocando menor movimiento en el agua atrapada en medio de la red de las SPE-mineralizadas, lo que podría favorecer el colapso de las biopelículas. El hecho que el sistema se encuentre en flujo turbulento permite que las bacterias y los nutrientes sean transportados aún más cerca del soporte que en los experimentos con flujo laminar permite que aumente la probabilidad de que coaliciones al azar se conviertan en uniones químicas estables (Porcival S., *et al* 2000).

La presencia de organismos capaces de secretar en forma masiva SPE (estrategia de colonización de la superficie filtrante) corrobora las ideas básicas de la discusión general de resultados: por un lado se sustenta el origen de las SPE que, como se ha visto, son puntos nodales en la precipitación de compuestos inorgánicos y por tanto en el fortalecimiento de la estructura reticular que constituyen las biopelículas mientras que, por otro lado, la hipótesis de colapso-compresión de las biopelículas, basada en gran medida en las propiedades funcionales de las SPE, se ve fortalecida.

7.6 Integración: Perspectiva Biológica.

La autopsia realizada a las membranas al finalizar el intervalo propuesto para el análisis (510 horas de filtración) incluyó determinaciones microscópicas, microanálisis EDS, identificación de los microorganismos colonizadores mediante técnicas de biología molecular [extracción ADN –

amplificación PCR - separación electroforética (TTGE) – clonación en vectores tipo T- Transformación en células competentes – purificación/aislamiento plásmidos - secuenciación capilar – *Blas*], análisis de taponamiento mediante láser (opstoacústica pulsada) y determinaciones gravimétricas. Todos estos análisis tuvieron como fin identificar los componentes biológicos y fisico-químicos involucrados en el taponamiento y así dar bases biológico-estructurales para elucidar los mecanismos de consolidación de las capas taponantes.

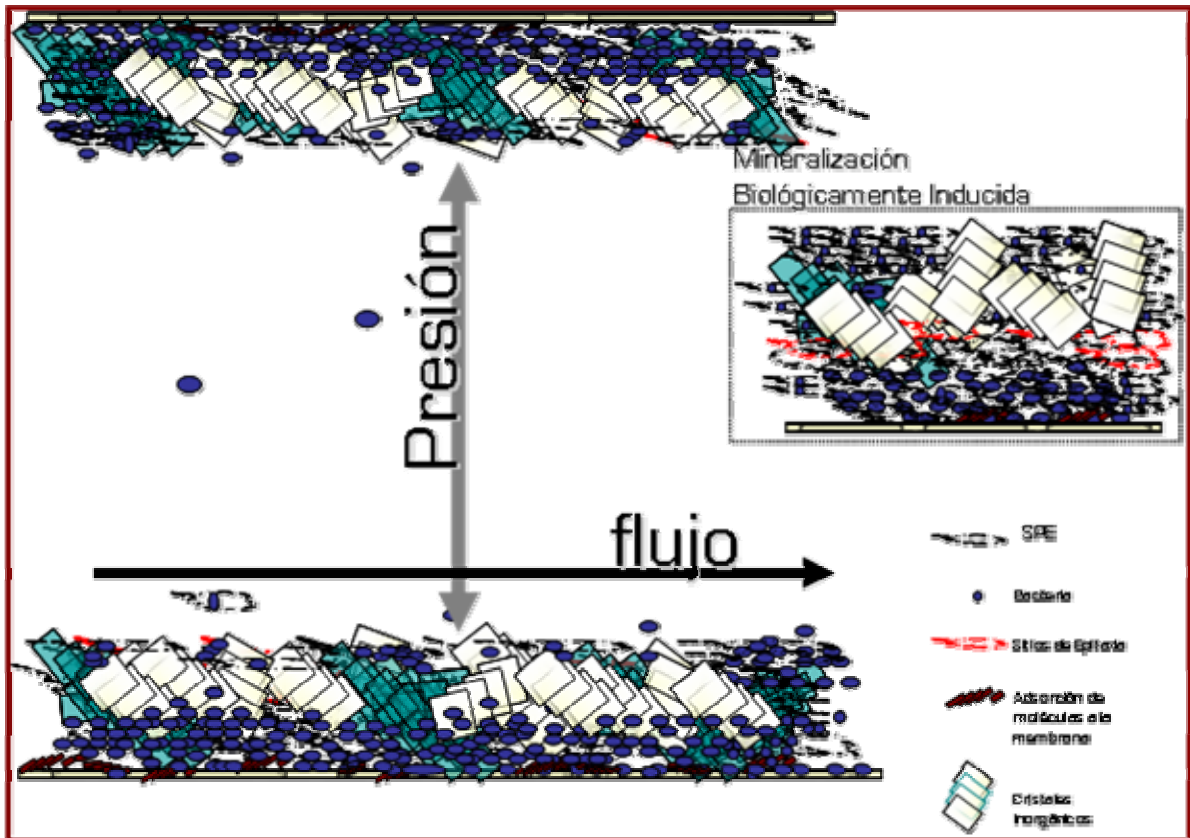


Figura 7.9. Mineralización Biológicamente Inducida (MBI). La red de SPE presenta sitios con carga eléctrica bien definida que favorecerían la precipitación de varios compuestos, entre ellos algunos inorgánicos.

Después de analizar los cambios intermitentes en la presión y el flux en los sistemas estudiados y de relacionarlos con las evidencias elucidadas con los análisis instrumentales, se planteó una hipótesis que relaciona la formación de las bio-capas taponantes con los cambios físicos a los que el sistema de filtración responde. La hipótesis de colapso y compresión de bio-películas se basa fundamentalmente en las propiedades de la red de sustancias poliméricas extracelulares que, después de ser secretadas por los microorganismos del género *Pseudomonadae* y *Proteobacterium* identificadas en este trabajo, taponan paulatinamente los poros del material filtrante. Estas sustancias presentan sitios con carga eléctrica definida que sirven como centros de epitaxia o de comienzo de nucleación mineral de las sales pobremente solubles presentes en el agua residual, esto es: los fenómenos de mineralización biológicamente inducida fortalecen la estructura confiriéndole mayor resistencia que le permite soportar la presión a la que el sistema esta sometido. En un momento no determinado esta red de SPE-mineralizada se colapsa cambiando su estructura mediante un proceso descrito como redistribución de poro que se refleja en incrementos exponenciales en la presión del sistema de filtración que conducen a la estructura taponante hacia la compresión continua reflejada en los largos estados estacionarios que el sistema experimenta tanto en flux como en presión.

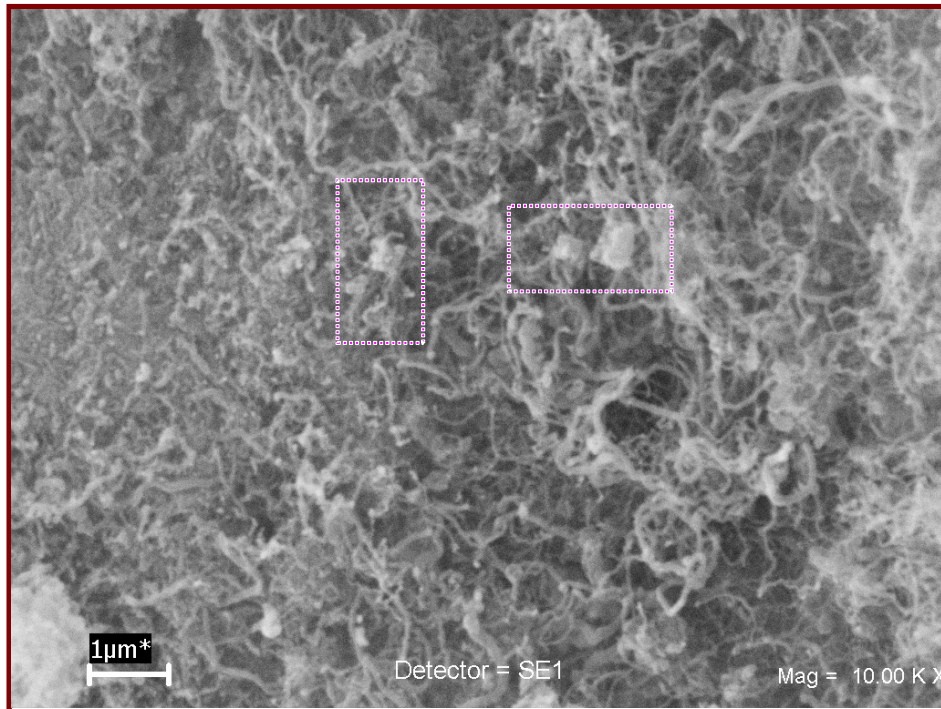


Figura 7.10. Micrografía SEM que muestra la posibilidad que el fenómeno de Mineralización Biológicamente Inducida (MBI) se lleve a cabo en la biopelícula. La red de SPE presenta sitios con carga eléctrica bien definida que favorecerían la precipitación de varios compuestos, entre ellos algunos inorgánicos (recuadros interiores).

En términos conceptuales, la evidencia de superposición de biopelículas -identificada en micrografías de *MEB*- podría encontrarse relacionada con la asociación de dos mecanismos de química supra-molecular: uno es *la consolidación de micro-construcciones tridimensionales de origen microbiano* a través de mineralización biológicamente inducida (MBI) (ver Figura 7.9) atribuida a la red de compuestos extracelulares compactados en la parte estructural de la biopelícula y el otro ocurre con un abrupto *colapso/compresión* de la estructura debido inicialmente al colapso de la matriz ocasionada por incrementos en la cantidad de sólidos (los enlaces de SPE y otras moléculas se debilitan) seguida de una completa hipersaturación de sólidos en su interior (aunada a las condiciones de presión a la que está sometido el sistema de filtración), provocando con esto la compactación del material, que al mismo tiempo se convierte en una nueva superficie de filtración o prefiltro, que experimentará, bajo mecanismos no comprendidos, taponamiento continuo.

Una evidencia más de MBI puede apreciarse en la figura 7.10. En esta micrografía de *MEB* se observa a detalle la matriz de SPE desarrollada en las biopelículas; las SPE (polímeros), aparentemente logran cristalizar estructuras más regulares y ordenadas que podrían ser cristales inorgánicos. Es posible, sin olvidar las condiciones microambientales imperantes, que los grupos carboxilos, abundantes en las SPE, logren cristalizar compuestos de baja solubilidad como carbonatos y/o fosfatos de Ca, Fe, Mg o bien ayudar a la deposición ordenada de sales de sílice (Mann, 2001)

8 Conclusiones

Los sistemas BRAM demostraron su capacidad en la depuración de agua residual municipal ya que el efluente de estos sistemas cumple con la normatividad mexicana para reutilización directa de agua residual de acuerdo con la NOM-003-SEMARNAT-1997.

No se observó influencia del tiempo de retención celular (de 60 hasta 100 días) sobre el comportamiento de filtración.

Pese a que se decidió trabajar en un flujo subcrítico para minimizar el taponamiento, este fenómeno se presentó desde las primeras horas refutando con esto la idea de Field y colaboradores respecto a ese concepto. En las condiciones de operación del sistema ensayado, el flujo crítico no existió, lo que apoya lo propuesto por Judd y otros investigadores en el sentido que este concepto solo puede aplicarse para módulos que operan a bajas presiones o bien con soluciones muy diluidas.

La capa taponante fue estudiada a través de técnicas moleculares, microscópicas y de espectroscopía después de 510 horas de filtración intermitente y se encontró evidencia de micro-construcciones de origen biológico las cuales se encuentran superpuestas. El material taponante se encuentra compuesto, en base seca, por 85% de material orgánico y un 15% de material inorgánico (sales de Fe, Mg, Ca, P, Na y Si). El cinco por ciento del material orgánico se relacionó con biomasa bacteriana. No debe descartarse la ocurrencia de fenómenos de transferencia genética y de captación de nutrientes en las biopelículas ya que los principales grupos microbianos involucrados en la sintropia corresponden al género *Pseudomonadae* y *Proteobacterium*, microorganismos conocidos por su extensiva secreción de SPE. El porcentaje restante corresponde a material extracelular y se presume que es una red de sustancias poliméricas debido a la ultraestructura observada en microscopía electrónica.

Con base en los cambios abruptos e intermitentes en la presión transmembrana y del flujo perneado y de relacionar éstos con los análisis instrumentales, se planteó una hipótesis que relaciona la formación de las bio-capas taponantes con aquellos cambios. Esta hipótesis, presentada como colapso y compresión, se basa fundamentalmente en las propiedades de la red de sustancias poliméricas extracelulares que, después de ser secretadas, taponan paulatinamente los poros del material filtrante, aunado al fenómeno de mineralización

biológicamente inducida que fortalece la estructura y le permite soportar mayor presión. En cierto momento, esta red de SPE-mineralizadas se colapsa, cambiando su estructura e incrementa la presión del sistema. Esta serie de fenómenos se repetiría creando pseudo estados estacionarios a lo largo de la operación.

Aunque en este trabajo se avanza en el conocimiento de los mecanismos de taponamiento en bio-reactores anaerobios de membrana, queda de manifiesto que es un fenómeno complejo en donde intervienen una gran cantidad de factores que no es posible analizar de manera específica en las condiciones experimentales probadas. Es menester recurrir a metodologías más poderosas como la microscopia confocal o la inmunofluorescencia *in situ* para identificar las interacciones que se llevan a cabo en la formación de una biopelícula.

Perspectivas.

- Comprobación de la Hipótesis de Colapso y Compresión (HCC) en la formación de biopelículas.
- Desarrollo de membranas nanoestructuradas con bajo potencial de taponamiento.
- Ensayos con nanopartículas de plata para evitar desarrollo de bio-películas.
- Desarrollo de procesos híbridos (membrana-nanopartículas) para el control de contaminantes persistentes.

9 Bibliografía

1. Adham, S., P. Gagliardo, L. Boulos, J. Oppenheimer, and R. Trussell (2001) *Feasibility of the membrane bioreactor process for water reclamation*. Water Science & Technology, 43(10):203-209.
2. APHA, AWWA, WEF (1999) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition*, American Public Health Association, Washington, DC
3. Barber, W.P. and Stuckey, D.C. (1999) *The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: A review*. Water Research 33:1559-1578.
4. Barker, D.J., Mannucchi, G.A., Salvi, S.M.L., and Stuckey, D.C. (1999) *Characterization of soluble residual chemical oxygen demand (COD) in anaerobic wastewater treatment effluents*, Water Research. 33(11):2499-2510.
5. Barker, D.J., and Stuckey, D.C. (1999) *A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems*, Water Research, 33(14):3063-3082.
6. Ben Aim R. (2004), *Memorias del Curso: Tratamiento de agua residual con bioreactores de membrana con fines de reuso*. Impartido en el Instituto de Ingeniería UNAM en abril 2004.
7. Berube, P.R. and E.R. Hall. 2001. *Fate and removal kinetics of contaminants contained in evaporator condensate during treatment for reuse using a high-temperature membrane bioreactor*. Journal of Pulp and Paper Science 27(2): 41-45.
8. Beal L. J. et al (1999), *Effect of Anaerobic digestion on estruvite production for nutrient removal from swine waste prior to land application*. Presentado en la "1999 ASAE International Meeting" realizada en Toronto, Canada. Artículo No. 904042. ASAE, St. Joseph, MI.
9. Booram, C.V., Smith, R.J., and Hazen, T.E. 1975. Crystalline phosphate precipitation from anaerobic animal waste treatment lagoon liquors. ASAE Trans. 18: 340-343.
10. Brock, T.D. and M.T. Madigan (1991) *Biology of Microorganisms*. 6th Edition, Prentice Hall.
11. Brookes et al, (2003), *The fate of organics during treatment of produced water MBR*. En: *Proceedings of the 5th IMSTEC*, Universidad de Nueva Gales del Sur, Australia, 10-14 noviembre 2003.
12. Buisson, H., P. Cote, M. Praderie and H. Paillard. 1998. *The use of immersed membranes for upgrading wastewater treatment plants*. Water Science and Technology 37(9): 89-95.
13. Capizzi S y Schwartzbrod J (2001a) *Surface properties of Ascaris suum eggs: hydrophobic potential and Lewis acid-base interactions*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Volume 22, Issue 2, pp 99-105.
14. Capizzi S y Schwartzbrod J (2001b) *Irradiation of Ascaris ova in sludge using an electron beam accelerator*, Water Research, Volume 35, Issue 9, June 2001, Pp 2256-2260.
15. Cicek, N, (2003), *A review of membrane bioreactors and their potential application in the treatment of agricultural wastewater*, CANADIAN BIOSYSTEMS ENGINEERING 45:6-19
16. Characklis W. G y Marshall K (1990), *Biofilms*, Jhon Wiley, Nueva York.

17. Charles, A.J. (1995), Collapse-Compression of fills on Inundation, International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences and Geomechanics Abstracts, 32:3, 111A.
18. Cho B. y Fane A., G., (2002), *Fouling Transients in nominal sub-critical flux operation of a Membrane bioreactor*. Journal of Membrane Science 209:391-403.
19. Choo, K.-H., Lee, C.-H., (1998). Hydrodynamic behavior of anaerobic biosolids during crossflow filtration in the membrane anaerobic bioreactor. Water Res. 32 (11),3387–3397.
20. Choo, K.-H., Lee, C.-H., (1996). Membrane fouling mechanisms in the membrane-coupled anaerobic bioreactor. Water Res.30, 1771–1780.
21. Costerton, Lewandosky, DeBeer, Caldwell, Korber y James, (1994), *Biofilms the customized microniche*. Journal of Bacteriology, 176:2137-2142
22. Comisión Nacional del Agua (estadísticas 2006). (www.cna.org.mx)
23. De Gelder, L., Vandecasteele, F.P., Brown, C.J., Forney, L.J. y Top, E.M. (2005) *Plasmid Donor Affects Host Range of Promiscuous IncP-1beta Plasmid pB10 in an Activated-Sludge Microbial Community*, Appl. Environ. Microbiol. 71 (9), 5309-5317.
24. Ergas, S.J. and A. Reuss (2001) *Hydrogenotrophic denitrification of drinking water using a hollow fiber membrane bioreactor*. Aqua, 50(3):161-171.
25. Fan, X.J., V. Urbain, Y. Qian and J. Manem. 1996. *Nitrification and mass balance with a membrane bioreactor for municipal wastewater treatment*. Water Science and Technology 34(1-2): 129-136.
26. Fan, Y.B., J.S. Wang and Z.C. Jiang. 1998. *Test of membrane bioreactor for wastewater treatment of a petrochemical complex*. Journal of Environmental Sciences 10(3): 269-275.
27. Ferraris, H. Fuess, W. Joswig, (1986) Acta Crystallogr. B42 253.
28. Ferrero, Susana, (2005), *Incidencia y Resistencia de bacilos gramnegativos no fermentadores*, Resumen M-136, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, República Argentina.
29. Flemming H. C. y J. Wingender (2001a), *Relevance of Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPSs) Part 1: Structural and Ecological Aspects*, Water Science and Technology 43:6 1-8
30. Flemming H.C, y J. Wingender (2001b), *Relevance of Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPSs) Part 2: Technical Aspects*, Water Science and Technology 43:6 9-16
31. Flemming H.C, U. Szewzyk y T. Griebe (Eds.), (2000), *BIOFILMS: Investigative Methods and Applications*, TECHNOMIC, Lancaster PA, USA.
32. Field, Wu, Howell y Gupta, (1995), *Critical Flux Concept for microfiltration fouling*, Journal of Membrane Science, 100:259-272.
33. He, Y, Xu, P, Chunjie L, Zhang Bo, (2005) High concentration food wastewater treatment by an anaerobic membrane bioreactor, Water Research 39: 4110-4118.
34. Hernández Uresti Alejandro (2005), *Persistencia de huevos de helmintos en lodos Anaerobios*. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultades de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
35. Hodgson, Leslie, Schneider, Fane, Fell y Marshall, (1993), *Cake resistance and solute rejection in bacterial filtration: the role of extracellular matrix*, Journal of Membrane Science, 79:35-53.
36. Hoon Hyung (2004), *Case study: The pilot test of CSM Fouling resistance R/O Membranes in Singapore NEWater Project*, IWA Newsletter may 2004, 5-10.

37. Horenstein, B.K., Hernandez, G.L., Rasberry, G., and Grosse, J. 1990. Successful dewatering experience at Hyperion wastewater treatment plant. *Water Sci. Technol.* **22**: 183–191.
38. Hu, L.F. Song, S.L. Ong, E.T. Phua, W.J. Ng, (2005), *Biofiltration pretreatment for reverse osmosis (RO) membrane in a water reclamation system*, *Chemosphere* 59:127–133.
39. Hunter K. A & Lis P.S. (1979), *The surface charge of suspended particles in estuarine and coastal waters*, *Nature*, 282:823-825.
40. Judd, S, (2005), *Fouling Control in submerged membrane bioreactors*, *Water Science and Technology*, 51 (6-7):27-34.
41. Juud S. y Jefferson B. (2003), *Membrana Bioreactors*, TECHNOMICS, USA, 345pp.
42. Jung-Goo Choi, Tae-Hyun Bae, Jung-Hak Kim, Tae-Moon Tak, A.A. Randall, (2002), *The behavior of membrane fouling initiation on the crossflow membrane bioreactor system*, *Journal of Membrane Science* 203:103–113.
43. Kang, I.-J., Yoon, S.-H., Lee, C.-H., 2002. Comparison of the filtration characteristics of organic and inorganic membranes in a membrane-coupled anaerobic bioreactor. *Water Res.* **36**, 1803–1813.
44. Kobayashi, H.A., Stenstrom, M.K., and Mah, R.A. (1983) *Treatment of low strength domestic wastewater using the anaerobic filter*. *Water Research* 8: 903
45. Körstgens V, H. C. Flemming, J. Wingender y W. Bochard (2001), *Influence of Calcium ions on the mechanical Properties of a model Biofilm of mucoïd Pseudomonas aeruginosa*, *Water Science and Technology* 43:6 49-58
46. Kuehn M, M. Mehl, M. Hausner, H. J. Bungartz y S. Wuertz (2001), *Time-resolved study of biofilm architecture and transport processes using experimental and simulation techniques: the role of EPS*, *Water Science and Technology* 43:6 143-50.
47. Krajewska, E. Y Szer, W.,(1967), *Comparative studies of amino-acid incorporation in a cell free system from psychrophilic Pseudomonas Species*, 412, *European Journal of Biochemistry*, 2, 165-171.
48. Kuo, W.C. and Parkin, G.F. (1996) *Characterization of soluble microbial products from anaerobic treatment by molecular weight distribution and nickel-chelating properties*, *Water Research*, 30(4):915-922.
49. Kuo, W.C., Sneve, M.A., and Parkin, G.F. (1996) *Formation of soluble microbial products during anerobic treatment*, *Water Environment Research*, 68:279-285.
50. Madaeni, S.I. S, Fane, A.G, & Wiley D.E, (1999), *Factors influencing critical flux in membrane filtration of activated sludge*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**:549-553.
51. Mann, S, (2001), *Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press, Reino Unido.
52. Morita, R.Y (1982). *Starvation-Survival of heterotrophs in the marine environment*. *Advances in Microbial Ecology* **6**, 171-198.
53. Nagano, A., Arikawa, E. and Kobayashi, H. (1992) *The treatment of liquor wastewater containing high-strength suspended solids by membrane bioreactor system*. *Water Science and Technology*, 26(3-4):887-895.
54. Ognier S et al. (2004) *Membrane Bioreactor fouling in sub-critical filtration conditions: a local critical flux concept*, *Journal of Membrane Science*, 229:171-177.
55. Ogoshi, Y. Suzuki and T. Asano, 2001, *Water reuse in Japan*, *Water Science and Technology* 43(10): 17–23

56. Ohashi, A. y H. Harada, (1994), *Adhesión strength of biofilm development in an attached-growth reactor*, Water Science and Technology 29:6 281-288.
57. Ohashi, A. T. Kuyama, K. Syutsubo y H. Harada, (1999), *A novel method for evaluation of biofilm tensile strength resisting erosion*, Water Science and Technology 39:7 261-268.
58. Purdy, D. R y Koch, A.L, (1976), *Energy cost of galactoside transport to Escherichia coli*, Journal of Bacteriology 131, 505-511.
59. Porcival, Steren L, Walker J, T, Hunter P, (2000), *Microbial Aspects of Biofilms and Drinking Water*, CRC Press, WA, EUA.
60. Ridgway y Flemming (1996), *Membrane Biofouling in Water treatment* Manem, J.A.S. 1996. *Membrane bioreactors. In Water Treatment Membrane Processes*, ed. J. Mallevalle, P.E. Odendaal and M.R. Wiesner, 17.1-17.31. New York, NY: McGraw Hill.
61. Rosenberger, S., U. Kruger, R. Witzig, W. Manz, U. Szewzyk and M. Kraume. 2002. *Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water*. Water Research 36(2): 413-420.
62. Rosenberger et al (2006), *Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment*, Water research, 40:710-720.
63. Rui Lui et al, *Operational Performance of a Submerged membrane bioreactor for reclamation of bath wastewater*, Process Biochemistry, EN PRENSA.
64. Sarkar, A.K. 1991. Hydration/dehydration characteristics of struvite and dittmarite pertaining to magnesium ammonium phosphate cement systems. J. Mater. Sci. 26: 2514–2518.
65. Schiener, P., Nachaiyasit, S., and Stuckey, D.C. (1998) *Production of soluble microbial products (SMP) in an anaerobic baffled reactor: composition, biodegradability and the effect of process parameters*, Environ. Technol., 19:391-400.
66. Schneider, R. P. y Tomoyuki-Tsutiya M, (2001), *Membranas Filtrantes para o Tratamento de Água, Esgoto e Água de Reuso*. 1ª edición ABES, São Paulo, Brasil.
67. Shaw, D.J, (1975), *Introducción a la química de los coloides y superficies*, Editorial Edgar Blücher, 185pp (en Portugués).
68. Scruby, C.,B. Y Drain, L.E, (1990), *Laser Ultrasonics: Techniques and Applications*, Adam Hilger ed, Phidalephia, EUA.
69. Stefov, V, B. S`optrajanova, F. Spirovski, I. Kuzmanovski, H.D. Lutz, B. Engelen (2004), *Infrared and Raman spectra of magnesium ammonium phosphate hexahydrate (struvite) and its isomorphous analogues.I. Spectra of protiated and partially deuterated magnesium potassium phosphate hexahydrate*, Journal of Molecular Structure 689 1–10
70. Stoodley P, A. Jacobsen, B.C. Dunsmore, B. Purevdorj, S. Wilson, H.M. Lappin-Scott y J.W. Costerton, (2001), *The influence of fluid shear and AICI3 on the material properties os Pseudomonas aeruginosa PAO1 and Desulfovibrio sp. EX265 biofilms*, Water Science and Technology 43:6 113-120.
71. Stoodley, P, Z. Lewandowsky, J.D. Boyle, M.H. Lappin-Scott, (1999), *Structural deformation of bacterial biofilms caused by short term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology*, Biotech. and Bioeng. 65 83-92.

72. Sutton et al (2003), *Membrane Bioreactors for industrial wastewater treatment: the state of the art based in full-scale commercial applications. En: Proceedings of the 2003 Annual symposium of Water Environmental Federation*, 11-15 noviembre.
73. Silyn-Roberts, H. & Sharp, R.M. 1986. *Crystal growth and the role of the organic network in eggshell biomineralization*, Proc. Roy. Soc. London B. 227, 303-324.
74. Tchobanoglous, G., F.L. Burton and H.D. Stensel. 2003. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th edition. Boston, MA: McGraw Hill Inc.
75. Tay et al (1990), *Parasitología Médica*, Editorial Prensa Médica, México.
76. Vallero , (2005), *High rate sulfate reduction in submerged anaerobic membrane bioreactor(SAMBaR) at high salinity*, Journal of Membrane Science, 252(1-2):217-232.
77. Villarreal, Eduardo, (2005) Estudios de la matriz orgánica de la concha nacar del abulón (*Halotis fulgens*), Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias UNAM.
78. Wehrle. 1997. *MBR Case Study: EAL-Scheinberg Treatment Plant*. <http://www.wehrle-env.co.uk/pdf/EAL%20.pdf>. (2003/05/21).
79. Wehrle. 1998. *MBR Case Study: Trienekens GmbH*. <http://www.wehrle-env.co.uk/pdf/Trienekens%20.pdf>. (2003/05/21). Yiliang He et al (2005), *High concentration food wastewater treatment by anaerobic bioreactor*, Water Research 39:4110-4118.
80. Wiesner y Aptel, (1996), *Mass Transport and permeate flux and fouling in pressure-driven processes en Water treatment membrane processes (Mallevalle et al. Eds.)*, pp 5.1-5.16, McGrawHill, Nueva York.
81. Wu Q. y Bishop P. (2004), *Enhancing estruvite crystallization from anaerobic supernatant*, J. Environ. Eng. Sci. 3: 21–29.
82. Yokomizo, T. 1994. *Ultrafiltration membrane technology for regeneration of building wastewater for reuse*. Desalination 98: 319-326.
83. Yun M., Lee, B, Choo,O. (2006), *Characterization of biofilm structure and its effect on membrane permeability in MBR for Dye wastewater treatment*, Water research 40:45-52.
84. Zaldo, Cristian, Comunicación personal (2006). Investigador en Ciencia de Materiales de la Universidad Complutense de Madrid.
85. Zoh, K.-D., Stenstrom, M.K., 2002. *Application of a membrane bioreactor for treating explosive process wastewater*. Water Res. 36 (4), 1018–1024.

ANEXOS



A Tiempo de Retención Celular (TRC) y volumen de lodo purgado en los Bio-Reactores

Para establecer el tiempo de retención celular (TRC) en los reactores UASB se realizaron proyecciones gráficas de la ecuación I:

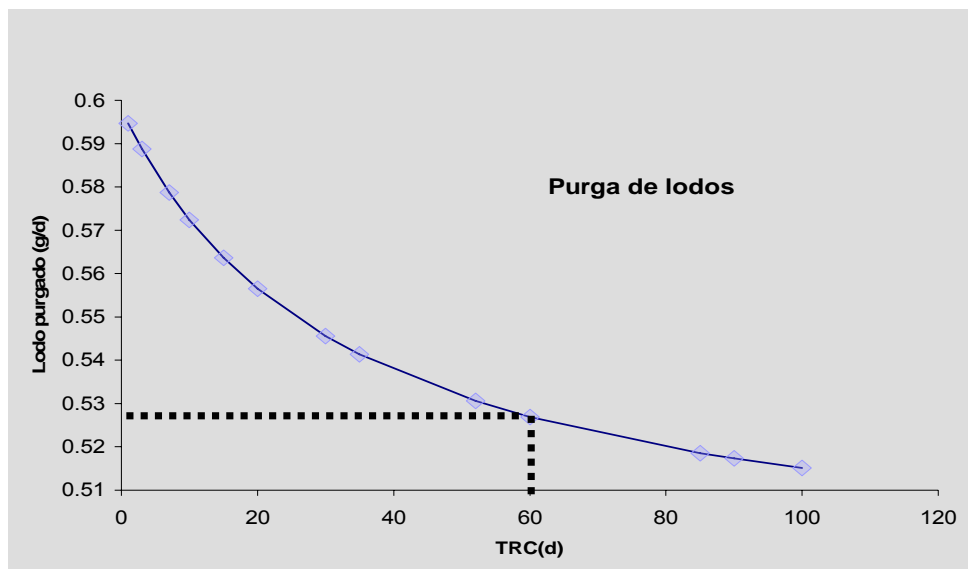
$$P_{x, ssv} = \frac{QY(S_o - S)}{1 + (kd)TRC} + \frac{(fd)(kd)QY(S_o - S)TRC}{1 + (kd)TRC} \dots\dots\dots (I)$$

En donde:

Literal		Valor de diseño	unidades
P _{x, VSS}	producción de lodos		
Q	Caudal	0.0072	m ³ /d
Y	Rendimiento	0.08*	VSS/gCOD
S _o	sutrato inicial	267.5	g/m ³
S	sutrato final	42	g/m ³
kd	coeficiente de decaimiento	0.03*	g VSS/ g VSS d
fd	restos de biomasa	0.15*	g VSS restos celulares / g VSS biomasa muerta
ndVSS	material no biodegradable	65	g/m ³
TRC	tiempo de retención celular	60/100	1/d

* Valores cinéticos para Bioreactores tomados de Tchobanoglus et al, 2003.

La proyección gráfica más ilustrativa se muestra a continuación:



B Índice de Taponamiento (*Silt Density Index, SDI*)

1. Generalidades

El Índice de taponamiento o SDI es una prueba utilizada para determinar el potencial de taponamiento de cualquier solución en condiciones bien determinadas. Esta prueba se encuentra documentada en los Estándares Norteamericanos ASTM con la clave D-4189.

Debe destacarse que esta metodología no proporciona una medición absoluta de la cantidad de materia particulada debido a la amplia distribución de forma, tamaño y naturaleza del material particulado presente en el agua y otros efluentes. De tal forma esta técnica se limita a comparar el taponamiento de varias soluciones en condiciones predeterminadas.

2. Resumen del método

- 2.1 El agua se hace pasar a través de membranas con corte molecular de 0.45 μm mediante la aplicación de una presión constante de 207kPa (30psi) y se mide la velocidad de taponamiento.
- 2.2 El SDI se calcula a partir de la velocidad de taponamiento.

3. Significado y valor de esta prueba.

- 3.1 El SDI puede servir como un indicador de la cantidad de material particulado en agua.
- 3.2 El SDI puede ser utilizado para determinar la efectividad de varias operaciones unitarias como la filtración o la clarificación, generalmente utilizados para remover material suspendido.
- 3.3 Este Índice ha sido correlacionado de manera empírica con la tendencia de taponamiento (*fouling tendency*) en equipo utilizado en el tratamiento de agua como módulos de micro y ultrafiltración además de los de ósmosis inversa.
- 3.4 El SDI presenta variaciones en función de la temperatura del agua por lo que valores obtenidos a diferentes temperaturas no son necesariamente comparables.
- 3.5 El SDI presenta variaciones al utilizar membranas de diferente manufactura por lo que se recomienda utilizar membranas de la misma naturaleza.

4. Instalación Experimental

Para la realización de la prueba se utilizó una celda de filtración marca AMICON con capacidad de 400ml que se muestra en el diagrama del experimento (Figura I). Así mismo se utilizaron filtros Millipore de 47mm de diámetro con un tamaño de poro de 0.45 μm . El permeado de la unidad de filtración se colectó en una probeta de 250ml y se utilizó un cronómetro TIMEX para medir los tiempos de filtración. Es importante recalcar que el gas que se utilice como agente presurizador sea inerte, en este trabajo se utilizó nitrógeno con 99.99% de pureza, proveído por

INFRA dosificado mediante válvulas de compuerta, la presión del sistema fue documentada mediante un manómetro en línea.

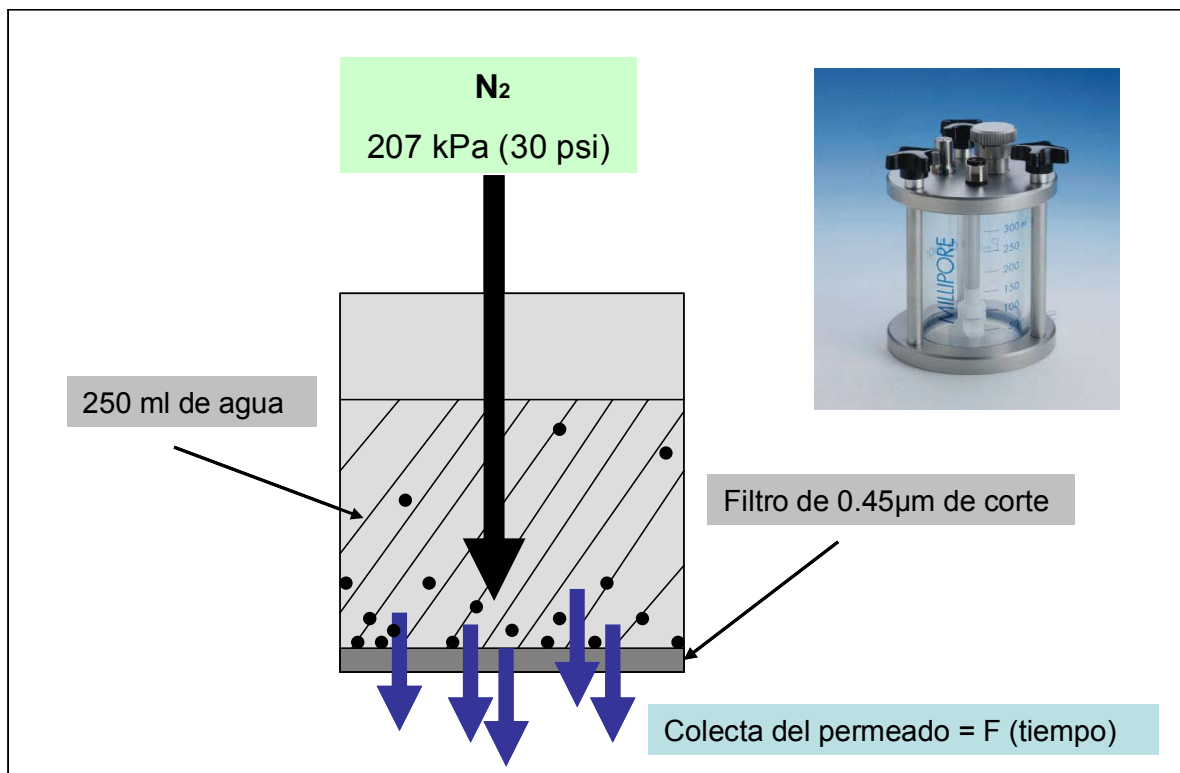


Figura I. Diagrama del experimento para determinar SDI.

5. Procedimiento

- 5.1 Se ensambla el sistema descrito en la figura I a la fuente de nitrógeno y se procede a revisar si se alcanza la presión de trabajo: 207kPa (30psi).
- 5.2 Antes de la instalación de la membrana revisar que la conexiones se encuentren aseguradas y enjuagar el aparato con el agua a determinar para remover contaminantes adheridos al aparato AMICON.
- 5.3 Se mide y registra la temperatura del agua.
- 5.4 Con cuidado de no tocar con las manos la membrana, se coloca en el AMICON.
- 5.5 Asegurarse que el empaque del AMICON se encuentre en buen estado.
- 5.5 Se vierte el agua previamente medida dentro del AMICON.
- 5.6 El aparato AMICON se conecta a la línea de gas, sin abrir la válvula.
- 5.7 Se abre la válvula. De manera simultánea, utilizando un cronómetro, se comienza a medir el tiempo que se requiere para coleccionar 100ml de permeado. Se registra este tiempo como t_i . Se deja la válvula abierta.
- 5.8 Se mide y registra el tiempo como t_f , después de la colecta de los primeros 100ml, para coleccionar "otros" 100ml de permeado, comenzando de manera arbitraria (*ad hoc*) a los 5, 10 o 15 minutos del tiempo total del ensayo (dependiendo del taponamiento). Se debe medir la temperatura y revisar la presión de manera rutinaria.
- 5.9 Al terminar de coleccionar los "nuevos" 100ml, la membrana debe almacenarse como futura referencia.

6. Cálculos.

6.1 El SDI_T se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$SDI_T = \frac{[1 - (t_i / t_f)]100}{T}$$

En donde:

T = tiempo predeterminado para la prueba (si se colecta el volumen en 3 minutos, se tomaría T como 5; si se colecta en 7, T sería 10; si los 100ml se colectan en 11-14 minutos, T sería 15).

t_i = tiempo inicial para colectar 100ml de permeado

t_f = tiempo requerido para colectar 100ml después del tiempo T.

7. Reporte.

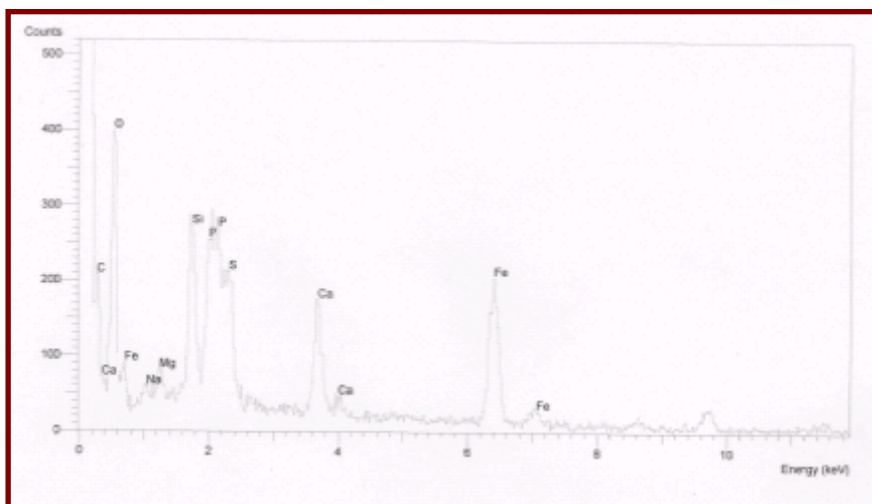
7.1 El SDI_T se reporta con subíndice que indique el tiempo de prueba en minutos.

7.2 También debe incluir la temperatura del agua, la marca y proveedor del filtro de 0.45 micras.

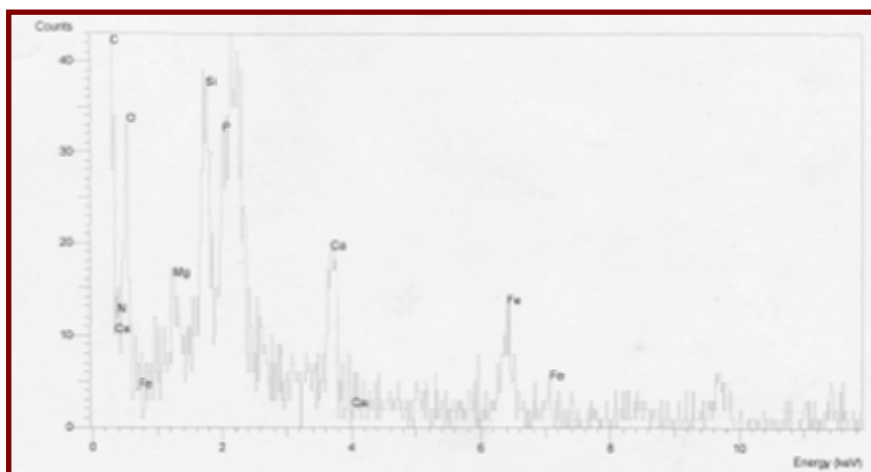
C Difractogramas del Microanálisis mediante Espectroscopia por Dispersión de Energía (EDS).

Se muestran a continuación los microanálisis realizados sobre las membranas examinadas en el presente trabajo.

1. Membrana del Bio-reactor Anaerobio, Sistema I.



2. Membrana del Bio-reactor Anaerobio, Sistema II.



D Determinación de Flujo crítico.

1. Incrementos discretos en la presión transmembrana (PTM) aplicada al sistema.
 - 1.1 La experimentación comienza con 1 bar de presión (101 kPa) y se mantiene así durante 30 minutos.
 - 1.2 Se calcula el flux correspondiente de acuerdo a la ley de Darcy (flujo directamente proporcional a la PTM):

$$J = \frac{PTM}{\mu Rm}$$

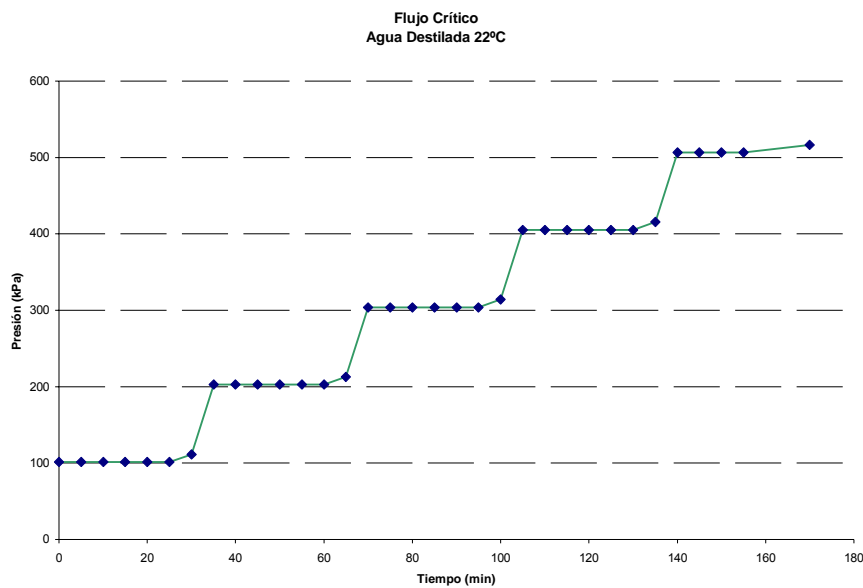
donde J es el flujo a través de la unidad de superficie de la membrana (flux), expresado en l/m².h o LMH.

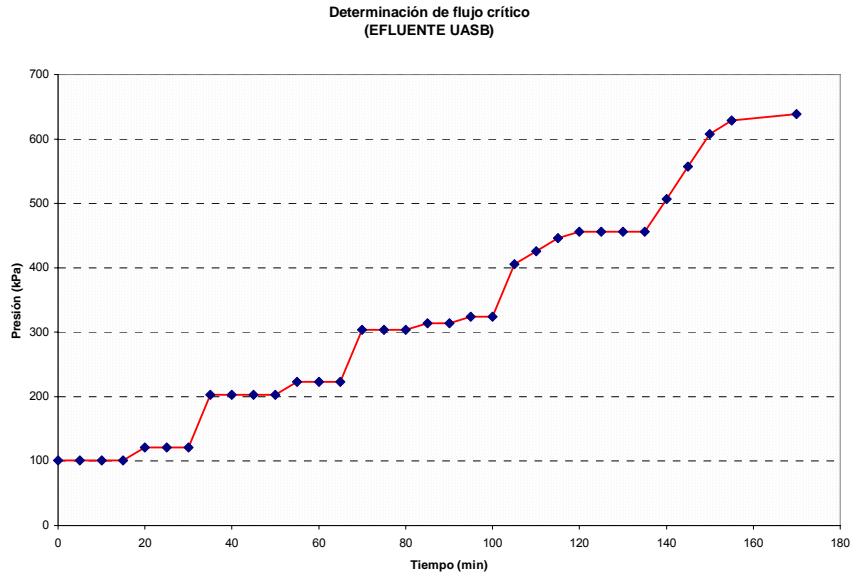
PTM es la presión transmembrana, expresada en bar.

μ es la viscosidad dinámica del agua, expresada en 0.001 kg/m s

Rm es la resistencia al flujo de la membrana, expresada en m⁻¹.

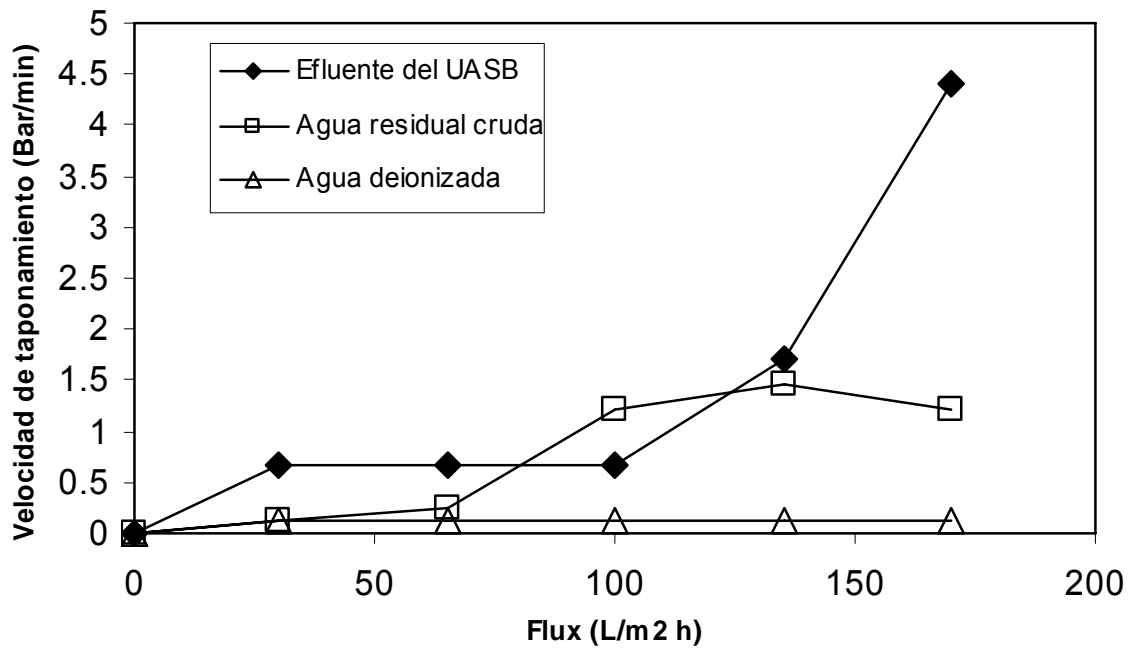
- 1.3 Después de 30 minutos la presión se aumenta un bar y así progresivamente.
 - 1.4 Una pendiente igual a cero en cada incremento indica ausencia de taponamiento (ver gráfico de agua deionizada)





2. Calculo de la velocidad de taponamiento y determinación gráfica del flujo crítico.

- 2.1 Se determina el cambio de presión en cada intervalo (Presión Final –Presión inicial)
- 2.2 Se calculan las pendientes de cada intervalo (PTM/h).
- 2.3 Se construyen gráficos de la tasa de taponamiento (pendientes) contra el flujo (calculado por ley de Darcy en cada PTM aplicada).
- 2.4 De manera gráfica, se puede observar el flujo crítico mediante la identificación de puntos de inflexión. Se puede recurrir a métodos estadísticos como líneas de tendencia para facilitar la identificación. En la figura siguiente, para el efluente UASB, el flujo crítico se situaría entre 140 y 145 LMH (l/m².h).



E Blast.

- Secuencia banda A: *Bosea* sp.

TGGGGAATCTTGCGCAATGGGGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGG
CCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTTGTCCGGGAAGATAATGACTGTACCGGAAGAATAAGCCC
CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAATCGAATTCGCCGCGCCGCGCCATGGCGG
CCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATT

Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
gi 62465814 gb AY972385.1 	Bosea sp. s145 16S ribosomal RNA gene	264	1e-68
gi 62465805 gb AY972376.1 	Bosea sp. s136 16S ribosomal RNA gene	264	1e-68
gi 62465796 gb AY972367.1 	Bosea sp. s125 16S ribosomal RNA gene	264	1e-68
gi 62465791 gb AY972362.1 	Bosea sp. s119 16S ribosomal RNA gene	264	1e-68
gi 13346479 gb AF352563.1 	Bradyrhizobium sp. SJSa1 16S ribos...	264	1e-68
gi 38567576 emb AJ536690.1 	BAC536690 Bacterium RRP-E4 16S rRNA g	264	1e-68
gi 18250907 emb AJ300771.1 	ASP300771 Afipia sp. LMG 19832 partia	264	1e-68
gi 46371361 gb AY466769.1 	Uncultured Bradyrhizobiaceae bacte...	256	3e-66
gi 46371350 gb AY466758.1 	Uncultured Bosea sp. clone 52C 16S...	256	3e-66
gi 46371329 gb AY466737.1 	Uncultured Bosea sp. clone 22E 16S...	256	3e-66
gi 46371326 gb AY466734.1 	Uncultured Bosea sp. clone 21A 16S...	256	3e-66
gi 68685423 gb DQ088793.1 	Uncultured bacterium clone MP104-S...	256	3e-66
gi 68685413 gb DQ088783.1 	Uncultured bacterium clone MP104-S...	256	3e-66
gi 30576032 gb AY268226.1 	Uncultured bacterium clone B2 16S ...	256	3e-66
gi 64966567 emb AJ876657.1 	Bosea sp. R2_10 partial 16S rRNA gen	256	3e-66
gi 20530853 gb AY094498.1 	Uncultured alpha proteobacterium c...	256	3e-66
gi 24464499 gb AF531764.2 	Bosea sp. 7F 16S ribosomal RNA gene,	256	3e-66
gi 75993056 gb DQ190122.1 	Uncultured bacterium clone BF1F3 1...	256	3e-66
gi 90297238 gb DQ404891.1 	Uncultured bacterium clone 654963 ...	256	3e-66
gi 62465802 gb AY972373.1 	Bosea sp. s131 16S ribosomal RNA gene	256	3e-66

- Secuencia banda B: *N. pentaromativorans*.

TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGAAG
GCCTTAGGGTTGTAAGCTCTTTTACCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGAGAATAAGCT
CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAATCGAATTCGCCGCGCCGCGCCATGGCG
GCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAAT

Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
gi 38489137 gb AF502400.2 	Novosphingobium pentaromativorans ...	285	3e-74
gi 84626050 gb DQ335249.1 	Uncultured bacterium clone 2RCSB1-...	285	3e-74
gi 38564740 gb AY461443.1 	Erythrobacter aquimaris strain SW-...	285	3e-74
gi 38564739 gb AY461442.1 	Erythrobacter aquimaris strain SW-...	285	3e-74
gi 38564738 gb AY461441.1 	Erythrobacter aquimaris strain SW-...	285	3e-74
gi 53774009 gb AY712535.1 	Uncultured Erythrobacter sp. clone...	285	3e-74
gi 53773851 gb AY712377.1 	Uncultured Erythrobacter sp. clone...	285	3e-74
gi 53772646 gb AY711171.1 	Uncultured Novosphingobium sp. clo...	285	3e-74
gi 53772593 gb AY711118.1 	Uncultured Sphingomonadaceae bacte...	285	3e-74
gi 50957203 gb AY584572.1 	Sphingomonas sp. HTCC503 16S ribos...	285	3e-74
gi 50957202 gb AY584571.1 	Sphingomonas sp. HTCC500 16S ribos...	285	3e-74
gi 110451929 gb DQ675506.1 	Uncultured bacterium clone L-1-42...	285	3e-74
gi 110451926 gb DQ675503.1 	Uncultured bacterium clone L-3-30...	285	3e-74
gi 37959959 gb AY254960.1 	Uncultured alpha proteobacterium c...	285	3e-74
gi 48479120 gb AY622260.1 	Uncultured alpha proteobacterium c...	285	3e-74

gi 78058271 gb DQ228401.1	Uncultured bacterium clone JEG.d7 ...	285	3e-74
gi 52423905 gb AY726907.1	Uncultured Erythrobacter sp. clone...	285	3e-74
gi 37725359 gb AY162145.1	Sphingomonas sp. D31C2 16S ribosomal	285	3e-74
gi 73761644 gb DQ107388.1	Erythrobacter sp. Fun-120 16S ribo...	285	3e-74
gi 27497648 gb AY167828.1	Novosphingobium subarcticum strain...	285	3e-74

- Secuencia banda C: *Desconocida*.
- Secuencia banda D: *Stenotrophomonas maltophilia*

CGGACGNNAGCATNCGTNGTTNNCCACCNNTTNGNCNTNATNNGCNCCGTNTNAAGAGCT
TTACAACCCGAAGGCCTTCTTACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTG
CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGATGA

Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
gi 83367133 gb DQ298779.1	Bacterium 7B3 16S ribosomal RNA gene,	133	3e-28
gi 50404776 gb AY649334.1	Uncultured bacterium DGGE band b 1...	127	2e-26
gi 55976057 gb AY820633.1	Uncultured bacterium clone CCSD_RK...	127	2e-26
gi 110630338 gb DQ787671.1	Uncultured bacterium clone SLB16 ...	125	7e-26
gi 104478984 gb DQ530153.1	Stenotrophomonas maltophilia isol...	125	7e-26
gi 104478975 gb DQ530144.1	Stenotrophomonas maltophilia isol...	125	7e-26
gi 104478971 gb DQ530140.1	Stenotrophomonas maltophilia isol...	125	7e-26
gi 104478969 gb DQ530138.1	Stenotrophomonas maltophilia isol...	125	7e-26
gi 104478968 gb DQ530137.1	Stenotrophomonas sp. RI47 16S rib...	125	7e-26
gi 104478961 gb DQ530130.1	Stenotrophomonas maltophilia isol...	125	7e-26
gi 104478949 gb DQ530118.1	Stenotrophomonas maltophilia isol...	125	7e-26
gi 104478947 gb DQ530116.1	Stenotrophomonas maltophilia isol...	125	7e-26
gi 104478915 gb DQ530084.1	Stenotrophomonas maltophilia isol...	125	7e-26
gi 71034223 gb DQ113454.1	Stenotrophomonas maltophilia strai...	125	7e-26
gi 110826452 gb DQ825777.1	Uncultured Stenotrophomonas sp. c...	125	7e-26
gi 82622455 gb DQ279602.1	Uncultured bacterium clone h110b1 ...	125	7e-26
gi 110750784 gb DQ821577.1	Stenotrophomonas sp. JNW12 16S ri...	125	7e-26
gi 110726044 gb DQ673366.1	Uncultured bacterium isolate DGGE...	125	7e-26
gi 110725191 gb DQ784545.1	Stenotrophomonas sp. LZ-1 16S rib...	125	7e-26

- Secuencia banda E: *Acinetobacter spp.*

CACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGGTAACGTCCACTTAGCCCAGGTATTAACCAGG
TAAGCCTCCTCCCACCTAAAGTGCTTTACAACCAAAGGCCTTCTTACACACGCGGCAT
GGCTGGATCAGGGTTCCCCCATTGTCCAATATTCCCAGGGCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGAATATTGGACAATGGNAGAAANCNTGATNCAGCAACGCCGC

Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
gi 68160538 gb DQ083490.1	Acinetobacter sp. HPC1339 16S ribo...	319	2e-84
gi 68160536 gb DQ083488.1	Acinetobacter sp. HPC1335 16S ribo...	319	2e-84
gi 68160528 gb DQ083480.1	Acinetobacter sp. HPC1322 16S ribo...	319	2e-84
gi 57791962 gb AY854117.1	Acinetobacter sp. HPC276 16S ribos...	319	2e-84
gi 57791956 gb AY854111.1	Acinetobacter sp. HPC311 16S ribos...	319	2e-84
gi 57791955 gb AY854110.1	Acinetobacter sp. HPC304 16S ribos...	319	2e-84
gi 57791950 gb AY854105.1	Acinetobacter sp. HPC277 16S ribos...	319	2e-84
gi 57791943 gb AY854098.1	Acinetobacter sp. HPC270 16S ribos...	319	2e-84
gi 77998064 gb DQ228953.1	Acinetobacter sp. SA4 16S ribosomal R	311	5e-82
gi 50541690 gb AY673994.1	Acinetobacter sp. PD12 16S ribosomal	311	5e-82
gi 48762783 gb AY633608.1	Acinetobacter seohaensis 16S ribos...	311	5e-82
gi 68160552 gb DQ083504.1	Acinetobacter sp. HPC1326 16S ribo...	311	5e-82
gi 68160531 gb DQ083483.1	Acinetobacter sp. HPC1325 16S ribo...	311	5e-82
gi 83701012 gb DQ316116.1	Acinetobacter sp. SO-A5-61 16S rib...	311	5e-82
gi 62042135 dbj AB207956.1	Uncultured bacterium gene for 16S...	301	5e-79
gi 62042126 dbj AB207954.1	Uncultured bacterium gene for 16S...	301	5e-79
gi 68160543 gb DQ083495.1	Acinetobacter sp. HPC1348 16S ribo...	295	3e-77
gi 47607231 gb AY613433.1	Acinetobacter sp. EDP3 16S ribosomal	287	8e-75

- Secuencia banda F: *Desconocida*.
- Secuencia banda G: *Sphingomonadae spp.*

CACGGAGTTAGCCGGAGCTTATTCTCCAGGTAAGTGCATTATCATCCCTGGTAAAAGAGCT
 TTACAATCCTAAGACCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGT
 CCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGCCCGCCCGTGCCTCCCGCCCGCCCGCCCGCCGCGC
 GCGGCGGGCGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATG

Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
gi 53773597 gb AY712123.1	Uncultured Sphingomonadaceae bacte...	276	3e-71
gi 50261382 gb AY654770.1	Mucus bacterium 26 16S ribosomal RNA	276	3e-71
gi 14915850 gb AF392622.1	Uncultured bacterium clone CRF3 16...	276	3e-71
gi 32966299 gb AY328581.1	Uncultured bacterium HOClCi32 16S ...	276	3e-71
gi 99909469 gb DQ520179.1	Uncultured bacterium clone ML-7-85...	276	3e-71
gi 25188140 emb AJ517908.1	UBA517908 Uncultured bacterium partia	276	3e-71
gi 12718669 emb AJ292803.1	UEU292803 uncultured eubacterium WR81	276	3e-71
gi 5708270 emb AJ233481.1	UEU233481 uncultured eubacterium 16S r	276	3e-71
gi 27530761 dbj AB074642.1	Uncultured alpha proteobacterium ...	276	3e-71
gi 38455851 gb AY371411.1	Erythrobacter sp. G265 16S ribosomal	276	3e-71
gi 90818707 emb AM237247.1	Uncultured alpha proteobacterium ...	276	3e-71
gi 45774509 gb AY569385.1	Uncultured bacterium clone DGGE10-...	276	3e-71
gi 83656964 gb DQ312361.1	Erythrobacter sp. GY-2 16S ribosomal	276	3e-71
gi 98986887 gb DQ509360.1	Uncultured bacterium clone Toolik_...	274	1e-70
gi 98986588 gb DQ509061.1	Uncultured bacterium clone Toolik_...	274	1e-70
gi 5708295 emb AJ233506.1	UEU233506 uncultured eubacterium 16S r	274	1e-70
gi 42566823 gb AY487123.1	Uncultured bacterium isolate DGGE ...	270	2e-69
gi 110931875 gb DQ831000.1	Novosphingobium sp. FND-3 16S rib...	268	7e-69
gi 90404414 gb DQ416667.1	Bacterium w3cb19 16S ribosomal RNA ge	268	7e-69

- Secuencia banda H: *α-protobacterium*.

CACGGAGTTAGCCGGGGCTTATTCTCCCGGTACAGTCATTATCTTCCCGGGTAAAAGAGCT
 TTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGT
 CCAATATTCCCCTGCTGCCTCCCGTAGGCCCGCCAGCAGCCGCGGGAATAATCAC
 TAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGC

Sequences producing significant alignments:		(Bits)	Value
gi 78322010 emb AM116747.1	Uncultured alpha proteobacterium ...	301	5e-79
gi 21360899 gb AF503283.1	Sphingomonas sp. ATCC 53159 16S ri...	301	5e-79
gi 22266999 gb AY043626.1	Uncultured alpha proteobacterium c...	301	5e-79
gi 22267173 gb AY043800.1	Uncultured gamma proteobacterium c...	301	5e-79
gi 22267150 gb AY043777.1	Uncultured alpha proteobacterium c...	301	5e-79
gi 27357399 gb AF431111.1	Uncultured alpha proteobacterium c...	301	5e-79
gi 15593196 gb AF408325.1	Uncultured Sphingomonadaceae bacte...	301	5e-79
gi 15593194 gb AF408323.1	Uncultured Sphingomonas sp. clone ...	301	5e-79
gi 94995681 gb DQ490375.1	Sphingomonadaceae bacterium KVD-un...	301	5e-79
gi 94995680 gb DQ490374.1	Sphingomonadaceae bacterium KVD-un...	301	5e-79
gi 61097561 emb AJ746105.1	Sphingomonas sp. MG48 partial 16S rR	301	5e-79
gi 61097560 emb AJ746104.1	Sphingomonas sp. MG47 partial 16S rR	301	5e-79
gi 2108335 emb X97776.1	ST16SR S.trueperi 16S rRNA gene	301	5e-79
gi 21360898 gb AF503282.1	Sphingomonas sp. ATCC 31853 16S ri...	301	5e-79
gi 21360897 gb AF503281.1	Sphingomonas sp. ATCC 31961 16S ri...	301	5e-79
gi 21360895 gb AF503279.1	Sphingomonas sp. ATCC 31554 16S ri...	301	5e-79
gi 21360894 gb AF503278.1	Sphingomonas elodea 16S ribosomal RNA	301	5e-79
gi 21360893 gb AF503277.1	Sphingomonas sp. ATCC 21423 16S ri...	301	5e-79

- Secuencia banda I: *Pseudomonas syringae*.

GCACCATGATCGGGATGTCGCTGCTGATACTGCTGCCNCCNGTANNANCCANTCNNNNNT
CCNANA ACTGACGTCGCATGCATCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGTAATTCGATT

Sequences producing significant alignments: (Bits) Value

gi 71553748 gb CP000058.1 	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	38.2	2.7
gi 63253978 gb CP000075.1 	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B72	38.2	2.7
gi 42601402 gb AY449461.1 	<i>Oikopleura dioica</i> clone BACOIK0005 4x	38.2	2.7