



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
AMBIENTAL – AGUA

IMPLEMENTACIÓN DE UN PROCESO AEROBIO DE
LODOS GRANULARES CON MEMBRANAS SUMERGIDAS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:
M. en C. VÍCTOR MANUEL ARELLANO BADILLO

TUTOR PRINCIPAL
Dr. GERMAN BUITRON MÉNDEZ, II, UNAM
COMITÉ TUTOR
Dr. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO, FQ, UNAM
Dr. GERMAN CUEVAS RODRÍGUEZ, UGto

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Secretario: Dr. Simón González Martínez

Vocal: Dr. Germán Cuevas Rodríguez

1 er. Suplente: Dr. Marco Antonio Garzón Zúñiga

2 do. Suplente: Dr. Germán Buitrón Méndez

Lugar donde se realizó la tesis: UNIDAD ACADÉMICA JURQUILLA, INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dr. Germán Buitrón Méndez

FIRMA

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico primeramente a Dios y a la Virgen Santísima advocación del Pueblito con Jesús y San Francisco, a cuyos pies pongo este trabajo.

A mi familia, mi esposa Margarita, Mis hijos Rosita, Clarita, Emita, Leo y Magui.

A mis Padres, y demás familiares naturales y políticos.

A todos los profesores, alumnos y compañeros de trabajo que he tenido a lo largo de estos años.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la UNAM, en particular al Instituto de Ingeniería y a la Unidad Juriquilla por la infraestructura facilitada para la realización de esta Tesis, así como al Dr. Germán Buitrón y a los investigadores del LIPATA: Dr. Alejandro Vargas, Dr. Iván Moreno por su asesoría y conocimiento, a los miembros del Comité Tutoral Dr. Germán Cuevas, Dr. Víctor Luna Pabello y a los demás miembros del Jurado: Dr. Simón González y Dr. Marco Garzón por sus valiosos comentarios, también a los maestros Jaime Pérez y Gloria Moreno por el apoyo técnico.

A todos los compañeros que han colaborado directamente en el proyecto: Juan Luis, Aurora, Luises, Ivonne, Toño, Tona, Roger, Tocayo, Sonia y a quienes han hecho amena la estancia como alumnos de servicio social, prácticas, estancias, maestría, doctorado y posdoctorado.

Agradezco también al INB en particular al Dr. Víctor Ramírez y Carlos Lozano y a todo su equipo, por su colaboración en este proyecto.

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento del CONACYT mediante los proyectos No. 100298 y 103720 y a la beca CEP otorgada por la UNAM.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----|
| RESUMEN | X |
| ABSTRACT..... | XI |
| INTRODUCCIÓN | XII |
| | |
| 1 ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1 Biorreactores con membranas..... | 1 |
| 1.1.1 Ventajas de los biorreactores con membranas..... | 2 |
| 1.1.2 Colmatación de la membrana | 3 |
| 1.1.2.1 Principales mecanismos de la colmatación de las membranas | 4 |
| 1.1.2.2 Productos microbianos solubles y sustancias poliméricas extracelulares | 5 |
| 1.1.2.3 Contaminantes orgánicos..... | 5 |
| 1.1.2.4 Contaminantes inorgánicos | 6 |
| 1.1.2.5 Crecimiento de biopelícula..... | 6 |
| 1.1.2.6 La biotorta..... | 7 |
| 1.1.2.7 Flux crítico..... | 7 |
| 1.1.3 Estrategias utilizadas para mitigar la colmatación de las membranas | 8 |
| 1.1.3.1 Modificaciones al material y estructura de las membranas | 8 |
| 1.1.4 Condiciones de la biomasa | 9 |
| 1.1.4.1 Carga orgánica (CO)..... | 9 |
| 1.1.4.2 Tiempo de retención de sólidos (TRS) | 9 |
| 1.1.4.3 Tiempo de residencia hidráulica..... | 10 |
| 1.1.4.4 Sólidos suspendidos | 10 |
| 1.1.4.5 Tamaño de partícula..... | 10 |
| 1.1.4.6 Adición de floculantes o coagulantes..... | 11 |
| 1.1.4.7 Retrolavados químicos..... | 11 |
| 1.1.4.8 Medios de soporte | 11 |
| 1.1.5 Condiciones hidráulicas | 11 |
| 1.1.5.1 Periodos de relajación | 12 |
| 1.1.5.2 Retrolavados | 13 |
| 1.1.6 Forma de operación de los biorreactores con membranas..... | 13 |
| 1.1.6.1 Operación en continuo | 13 |
| 1.1.6.2 Operación en modo discontinuo secuencial | 13 |
| 1.2 La granulación aerobia..... | 14 |
| 1.2.1 Ventajas de los gránulos aerobios | 15 |
| 1.2.1.3 Mecanismos de formación de los gránulos aerobios | 15 |
| 1.2.2 Principales factores que afectan a la granulación aerobia..... | 17 |
| 1.2.2.1 La presión de selección..... | 17 |
| 1.2.2.2 Sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y la estabilidad granular..... | 17 |
| 1.2.2.3 Régimen de alimentación | 19 |
| 1.2.3 Modelado del proceso de granulación | 19 |
| 1.2.4 Fuente de Carbono usada para cultivar lodo granular..... | 20 |
| 1.2.5 Degradación de compuestos tóxicos | 23 |
| 1.2.6 Condiciones hidrodinámicas para la formación de gránulos..... | 25 |
| 1.3 Consideraciones para el diseño y operación de reactores de membranas sumergidas con lodos granulares | 26 |

| | |
|---|----|
| 1.3.1 Biorreactores con membranas externas | 26 |
| 1.3.2 Biorreactores con membranas sumergidas internas | 26 |
| 1.3.2.1 Dimensiones del reactor..... | 27 |
| 1.3.3 Tipo de membrana utilizada | 28 |
| 1.3.4 Condiciones biológicas de operación del biorreactor | 28 |
| 1.3.4.1 La fuente de carbono..... | 28 |
| 1.3.4.2 Estrategia de alimentación..... | 28 |
| 1.3.4.3 Carga orgánica..... | 29 |
| 1.3.4.4 Nitrógeno | 29 |
| 1.3.4.5 Tiempo de retención de sólidos..... | 30 |
| 1.3.4.6 Sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en procesos de lodos granulares aerobios con membranas sumergidas | 30 |
| 1.3.4.7 La formación de biopolímeros agregados (BPA) | 31 |
| 1.3.5 Condiciones fisicoquímicas de operación..... | 31 |
| 1.3.5.1 Propiedades fisicoquímicas de la biomasa | 31 |
| 1.3.5.2 Condiciones de operación..... | 32 |
| 1.3.5.3 Inestabilidad de los gránulos | 32 |
| 1.3.6 Desempeño de biorreactores de membranas sumergidas con lodos granulares aerobios | 32 |
| 1.4 Conclusiones de la revisión..... | 37 |
| | |
| 2 METODOLOGÍA GENERAL | 39 |
| 2.1 Estrategia experimental | 39 |
| 2.2 Diseño del biorreactor piloto..... | 40 |
| 2.3 Técnicas analíticas | 42 |
| 2.3.1 Análisis generales | 42 |
| 2.3.2 Evaluación de la estructura de la colmatación de las membranas..... | 43 |
| 2.3.3 Toma de muestra | 43 |
| 2.3.4 Tinción | 44 |
| 2.4 Evaluación de la morfología de la colmatación de la membrana por SEM | 49 |
| 2.5 Evaluación de la morfología de la colmatación de la membrana por TEM | 50 |
| 2.6 Sustancias poliméricas extracelulares | 51 |
| 2.7 Evaluación de la colmatación mediante el modelo de resistencias en serie | 51 |
| 2.8 Determinación del flux crítico | 52 |
| | |
| 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 53 |
| 3.1 Aclimatación | 53 |
| 3.2 Influencia de la relación DQO/N en la granulación | 55 |
| 3.2.1 Operación del reactor | 55 |
| 3.2.2 Granulación de la biomasa..... | 57 |
| 3.2.3 Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)..... | 59 |
| 3.3 Operación del biorreactor con membranas sumergidas | 62 |
| 3.3.1 Aclimatación..... | 62 |
| 3.3.2 Granulación..... | 63 |
| 3.3.3 Filtración | 67 |
| 3.3.4 Colmatación de la membrana | 69 |
| 3.4 Estructura y morfología del proceso de colmatación | 75 |
| 3.4.1 Resultados de la evaluación de la estructura en la colmatación | 75 |
| 3.4.2 Evaluación de la morfología de la colmatación..... | 83 |

| | |
|---|-----|
| 3.5 Estrategias anticolmatación..... | 87 |
| 3.5.1 Operación del reactor | 87 |
| 3.5.2 Filtración | 93 |
| 3.5.3 Colmatación..... | 95 |
| | |
| 4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 99 |
| REFERENCIAS | 103 |
| ANEXO I PRODUCTOS DE LA TESIS | 119 |
| ANEXO II OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS..... | 120 |
| A1.1 Determinación de Fenoles Totales. (APHA, 2005) | 120 |
| A1.2 Productos microbianos solubles (PMS) o EPS sueltos..... | 120 |
| A1.2.2 Extracción con resina de EPS ligados. (Frolund <i>et al.</i> , 1996) | 120 |
| A1.2.3 Análisis Polisacáridos (modificado de Dubois <i>et al.</i> , 1956)..... | 121 |
| A1.2.4 Determinación de Proteínas. (modificado de Lowry, 1951) | 121 |
| A1.3 Prueba de respirometría..... | 121 |
| A1.4 Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Sólidos Suspendidos Volátiles. (modificado de APHA, 2005) | 122 |
| A1.6 Sólidos totales, porcentaje de granulación y coeficiente de integridad. (Ghangrekar <i>et al.</i> , 2005)..... | 122 |
| A1.7 Índice Volumétrico de Lodos | 123 |
| A1.8 Velocidad de Sedimentación | 123 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 Configuración de los MBR (Visvanathan <i>et al.</i> , 2000). | 1 |
| Figura 1.3 Etapas de la colmatación a flux crítico ($J_1 < J_2 < J_c$), supercrítico ($J_3 > J_c$) y subcrítico ($J_1 < J_c$) (modificado de Le-Clech <i>et al.</i> , 2006). | 8 |
| Figura 1.4 Fuerzas que influyen en el depósito de una partícula en la membrana, (modificado de Wang y Wu., 2009). | 12 |
| Figura 1.5 Etapas de un MSBR. | 14 |
| Figura 1.6 Formación de gránulos (Beun <i>et al.</i> , 1999). | 15 |
| Figura 1.7 Etapas de la granulación (modificado de Adav <i>et al.</i> 2008). | 16 |
| Figura 1.8 Ruta de degradación del 4CP por vía aerobia: (a) 4CP, (b) 4-clorocatecol, (c) 5-cloro-2-hidroxiimuconico semialdehido (Bali y Sengül, 2002). | 24 |
| Figura 1.9 Relación entre el tiempo de descarga y el tiempo de sedimentación con la velocidad de sedimentación (V_s) _{min} . (Liu <i>et al.</i> , 2005). | 25 |
| Figura 1.10 Reactor de membrana sumergida con módulo externo, utilizado por Thanh <i>et al.</i> , 2008. | 26 |
| Figura 1.11 Biorreactor con membrana de fibra hueca sumergida (modificado de Wang <i>et al.</i> , 2008). | 27 |
| | |
| Figura 2.1 Estrategia experimental. | 39 |
| Figura 2.2 Bioreactor piloto. | 41 |
| Figura 2.3 Estructura Química del FITC (Green 1990). | 44 |
| Figura 2.4 Estructura Química del CW. | 45 |
| Figura 2.5 Estructura Química del SITOX green. | 45 |
| Figura 2.6 Estructura Química del DAPI. | 45 |
| Figura 2.7 Estructura Química del To-Pro 3. | 46 |
| Figura 2.8 Longitudes de onda de absorción (AB) y emisión (EM) de los fluorocromos utilizados A) FITC con DAPI, B) CW con SYTOX green y C) CW, FTC y TO-PRO-3. | 48 |
| Figura 3.1 Disminución de la concentración de 4-CF en los primeros ciclos para la aclimatación a 100 mg/L 4-CF. | 53 |
| Figura 3.2 Duración del tiempo de los ciclos para la aclimatación a 100 mg/L 4-CF. | 54 |
| Figura 3.3 Evolución de la degradación de 4-CF para un ciclo tomado al día 30 para R20y día 35 para R150 | 55 |
| Figura 3.4 Tasa de degradación específica para ambas relaciones. | 56 |
| Figura 3.5 Fotomicrografías del inóculo inicial A) y gránulos formados después de 40 días (B) para R20 y (C) para R150. | 57 |
| Figura 3.6 Tamaño de gránulo (mediana) y porcentaje de gránulos con diámetro mayor a 0.21 mm durante la operación a diferentes relaciones DQO/N. | 58 |
| Figura 3.7 Velocidad de sedimentación V_s en función del tiempo para las relaciones R20 y R150. | 59 |
| Figura 3.8 Cantidad promedio de polisacáridos por SSV para ligados (A) y libres (B) para ambas relaciones DQO/N, tomados del día 22 al día 40. | 60 |
| Figura 3.9 Producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) a diferentes relaciones DQO/N. EPS libres. | 61 |
| Figura 3.10 Producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) a diferentes relaciones DQO/N, EPS ligados. | 62 |
| Figura 3.11 Variación de los sólidos suspendidos durante el tiempo de operación. La línea punteada indica el momento de introducción de la membrana. | 63 |
| Figura 3.12 Variación del IVL durante el tiempo de operación. La línea punteada indica el momento de introducción de la membrana. | 63 |
| Figura 3.13 Concentración en el efluente de 4-CF y DQO para el reactor con membrana. | 64 |
| Figura 3.14 Variación del diámetro de los gránulos durante el tiempo de operación. | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.15 Variación del porcentaje de granulación durante el tiempo de operación. | 65 |
| Figura 3.16 Concentración de EPS-libres durante el tiempo de operación. | 66 |
| Figura 3.17 Concentración de EPS-ligados durante el tiempo de operación. | 66 |
| Figura 3.18 Variación de la Tasa de degradación durante el tiempo de operación. | 67 |
| Figura 3.19 Resistencia de la membrana durante las pruebas de filtración a corto plazo. | 68 |
| Figura 3.20 Variación de la PTM y el Flux. | 70 |
| Figura 3.21 Membrana colmatada, a) 2 semanas de operación, b) 4 semanas de operación. | 70 |
| Figura 3.22 Resistencias en serie donde: R_b , resistencia de la biocapa; R_{pr} , resistencia de bloqueo de poros reversible; R_{pi} , resistencia de bloqueo de poro irreversible; R_m resistencia intrínseca de la membrana; R_r , resistencia residual. | 72 |
| Figura 3.23 A)) Proyección de corte transversal de la membrana colmatada en el microscopio de fluorescencia con objetivo 40X. B) Imagen de un crecimiento superficial de biopelícula en la membrana teñida con CW (polisacáridos, azul) y Sytox Green (células, verde) con objetivo, 25X al día 70 de la operación. Imagen de CLSM transversal (C) y superficial (D), CW con Sytox Green 10X cortes de la membrana del día 130 de la filtración de color verde se observan los microorganismos teñidos con Sytox Green y de azul los polisacáridos teñidos con Calcofluor White (barra 70 μ m) 20X. | 74 |
| Figura 3.24 Sólidos suspendidos y porcentaje de granulación durante el tiempo de operación. | 75 |
| Figura 3.25 Carga másica del reactor, velocidad de sedimentación e IVL de la biomasa. | 76 |
| Figura 3.26 Duración de los ciclos y del tiempo de reacción. | 76 |
| Figura 3.27 Desempeño de la presión transmembrana y el flux. Las flechas señalan los puntos de las autopsias a las membranas. | 77 |
| Figura 3.28 Día 0 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte transversal, D) SEM superficial. | 78 |
| Figura 3.29 Día 10 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte óptico transversal, D) CLSM corte transversal, E) SEM superficial, F) intensidad en el corte óptico transversal. | 79 |
| Figura 3.30 Día 18 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte óptico transversal, D) CLSM corte transversal, E) SEM superficial, F) intensidad en el corte óptico transversal. | 80 |
| Figura 3.31 Día 40 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte óptico transversal, D) CLSM corte transversal, E) SEM superficial, F) intensidad en el corte óptico transversal. | 81 |
| Figura 3.32 Día 60 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte óptico transversal, D) CLSM corte transversal, E) SEM superficial, F) intensidad en el corte óptico transversal. | 82 |
| Figura 3.33 Fotomicrografías A) SEM gránulos adheridos a la membrana, B) monocapa bacteriana, C) TEM parte externa de la membrana colmatada. D) TEM interior de la membrana colmatada. | 84 |
| Figura 3.34 Dinámica de la colmatación de la membrana. | 86 |
| Figura 3.35 Variación de los sólidos durante el tiempo de operación. | 88 |
| Figura 3.36 Variación del índice volumétrico de lodos durante el tiempo de operación. | 88 |
| Figura 3.37 A) Fotomicrografía de los gránulos al, A) día 3, B) día 28, C) día 40, D) día 100. | 89 |
| Figura 3.38 Incremento en el tamaño de gránulo durante el tiempo de operación. | 90 |
| Figura 3.39 Porcentaje de granulación en el reactor durante el tiempo de operación. | 90 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.40 EPS libres durante el tiempo de operación..... | 91 |
| Figura 3.41 EPS ligados durante el tiempo de operación..... | 91 |
| Figura 3.42 Variación de la PTM y el flux durante el tiempo de operación..... | 93 |
| Figura 3.43 Variación de la PTM y el flux durante el tiempo de operación para la operación con módulo externo con aireación..... | 94 |
| Figura 3.44 Tasa de colmatación de la membrana durante distintas estrategias de operación..... | 94 |
| Figura 3.45 Porcentajes de aporte a la resistencia total debida a R_b , resistencia de la biocapa; R_{pr} , resistencia de bloqueo de poros reversible; R_{pi} , resistencia de bloqueo de poro irreversible; R_m resistencia intrínseca de la membrana; R_r , resistencia residual..... | 95 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1.1 Clasificación de las membranas..... | 3 |
| Tabla 1.2 Características de gránulos aerobios..... | 21 |
| Tabla 1.3 Desempeño del tratamiento con lodos granulares..... | 22 |
| Tabla 1.4 Desempeño del tratamiento con lodos granulares y membranas..... | 35 |
| Tabla 2.1 Concentraciones en la solución de alimentación..... | 42 |
| Tabla 2.2 Diferentes fluorocromos utilizados en la literatura..... | 43 |
| Tabla 2.3 Longitudes de onda para distintos fluorocromos..... | 49 |
| Tabla 3.1 PTM (kPa) en las pruebas de filtración a corto plazo..... | 69 |
| Tabla 3.2 Comparación entre SBR y MSBR..... | 71 |
| Tabla 3.3 Resumen del desempeño entre los distintos procesos..... | 92 |

ABREVIATURAS UTILIZADAS

| | |
|-------------------------|--|
| 4-CF | 4-clorofenol |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| C_m | Carga másica, kgDQO/kgSSV/d, g4CF/kgSSV/d |
| C_v | Carga volumétrica, kgDQO/m ³ /d |
| COT | Carbono orgánico total, mg/L |
| d | Días |
| DBO | Demanda bioquímica de oxígeno, mg/L |
| DQO | Demanda química de oxígeno, mg/L |
| DQO_{ef} | DQO en el efluente |
| DQO_{in} | DQO en el influente |
| EPS | Sustancias poliméricas extracelulares |
| g | Gramo |
| h | Hora |
| IVL | Índice volumétrico de lodos, mL/g |
| J | Flux, L/m ² /h |
| J_c | Flux crítico, L/m ² /h |
| L | Litro |
| Lpm | Litros por minuto |
| MBR | Biorreactor de membranas sumergidas |
| MSBR | Reactor discontinuo secuencial de membranas sumergidas |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetros |
| µm | Micrómetros |
| nm | Nanómetros |
| NO₂ | Nitritos |
| O₂ | Oxígeno |
| OD | Oxígeno disuelto, mg/L |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PTM | Presión transmembrana kPa |
| PMS | Productos microbianos solubles |
| q | Tasa de específica de degradación, mg sustrato/gSSV/h |
| q_{max} | Tasa de específica de degradación máxima, mg sustrato/gSSV/h |
| Rpm | Revoluciones por minuto |
| SBR | Reactor discontinuo secuencial |
| S₀ | Concentración de sustrato dentro del reactor, mg/L |
| S_i | Concentración de sustrato en el influente, mg/L |
| SST | Sólidos suspendidos totales, mg/L |
| SSV | Sólidos suspendidos volátiles, mg/L |
| ST | Sólidos totales, mg/L |
| T | Temperatura, °C |
| V_s | Velocidad de sedimentación, m/h |
| V | Volumen del reactor, L |
| PVDF | Fluoruro de Polivinilidieno |
| TEM | Microscopía Electrónica de Transmisión |
| SEM | Microscopía Electrónica de Barrido |
| MF | Microscopía de Fluorescencia |
| CLSM | Microscopía Láser Confocal de Barrido |

RESUMEN

Se implementó un reactor discontinuo secuencial (SBR) aerobio de lodos granulares con membranas sumergidas con la finalidad de disminuir la colmatación en las membranas de filtración para el tratamiento de efluentes inhibitorios para la remoción de 4-clorofenol como compuesto modelo. Primero se desarrollaron gránulos aerobios a partir de lodos activados de una planta de tratamiento municipal, mediante una presión de selección y la limitación de nitrógeno, los gránulos alcanzaron una tasa de degradación de 87 mg4-CF/gSSV y una remoción superior al 99 %. Después se introdujo al reactor SBR una membrana (MSBR) de fluoruro de polivinilidieno con un tamaño de poro de 0.1 μm , los gránulos se mantuvieron estables con un diámetro promedio de hasta 2.5 mm dentro del reactor, al mismo tiempo se operó otro reactor SBR sin membranas, no se encontró diferencia significativa en el tamaño y cantidad de gránulos de ambos reactores.

El proceso de colmatación de la membrana sumergida en el reactor se analizó mediante las siguientes técnicas: microscopía electrónica de barrido (SEM); microscopía electrónica de transmisión (TEM); microscopía láser confocal de barrido (CLSM); microscopía de fluorescencia (MF), realizando autopsias a la membrana, se encontró que el mecanismo de colmatación de las membranas comienza con la adsorción de β -polisacáridos con el posterior desarrollo de una biopelícula tanto en la superficie como el interior de la estructura de la membrana que bloquea los poros irreversiblemente. Se evaluó el intercalado de ciclos de decantación (SBR) entre los ciclos de filtrado (MSBR) y el uso de un módulo externo como estrategia para evitar la colmatación, logrando una disminución de la tasa de colmatación del 25 % finalmente con las membranas sumergidas en un módulo externo se logró mitigar en un 90% disminuyendo de 0.345 kPa a 0.033 kPa por hora de operación.

ABSTRACT

An sequential batch reactor (SBR) with aerobic granular sludge process and submerged membranes was implemented in order to reduce membrane fouling in the treatment of effluents with the inhibitory 4-chlorophenol as an model of toxic compound, in the first step, aerobic granules was developed from activated sludge of an municipal wastewater treatment plant by means of the combined effect of an hydraulic selection pressure and the nitrogen limitation, aerobic granules were obtained with degradation rates and removal of 87 mg4-CP/gSSV and 99%, respectively. After in this system a polyvinylfluoride membrane (MSBR) with a pore size of 0.1 microns was introduced, the proprieties of the granules remained stable with an average diameter of up to 2.5 mm into the reactor, while in same time, other reactor was operated in SBR mode, any significant difference was not found in performance of both reactors.

The fouling process of the membrane submerged in the reactor was analyzed using the following techniques: scanning electronic microscopy (SEM); transmiion electronic microscopy (TEM); confocal laser scanning microscopy (CLSM); fluorescence microscopy (MF), autopsies was performed to the membranes, it was established that the mechanism of membrane fouling is as follows: first the adsorption of β polysaccharides with subsequent biofilm development on the surface and in the inside membrane structure and so the irreversibly pore blocking was produced. As a strategy to avoid this, we evaluated the SBR cycle interleaving with MSBR cycles, reaching a decrement in specific fouling rate of 25% and for other hand, with the membranes submerged in an external module, the fouling was mitigated in 90% with a reduction on fouling rate of 0.345 kPa to 0.033 kPa per hour of operation.

INTRODUCCIÓN

En México sólo se tiene una infraestructura instalada para tratar el 44.8 % del agua residual generada (CONAGUA, 2011), por lo que es prioritario invertir y desarrollar procesos de tratamientos que resulten más eficientes y económicos, además existe desabasto de agua potable debido al abatimiento de los mantos freáticos, lo cual hace necesario tratar y reciclar el agua para su uso doméstico, como en el sanitario o en el lavado de patios y autos, debido a esto, los métodos de tratamiento deben garantizar una calidad del agua cada vez más equiparable al de los sistemas de potabilización.

A partir de la década pasada, los biorreactores de membranas sumergidas (MBR), han transformado el concepto que se tenía hasta entonces de los sistemas de tratamiento de aguas residuales, basado en reactores, y tanques sedimentadores, que actualmente están siendo sustituidos por equipos compactos de un solo reactor, por ese motivo y debido a la excelente calidad de los efluentes obtenidos entre otras ventajas, desde entonces constituyen un mercado en expansión en el mundo del tratamiento de aguas, con un crecimiento anual del 11% (Drews, 2010), el mayor para nuevas tecnologías. Sin embargo, el principal problema de operación lo constituye la colmatación de las membranas (Flemming *et al.*, 1997), que hace que disminuya el rendimiento del proceso y causa pérdidas por los incrementos en el costo de operación, por los tiempos muertos requeridos para la limpieza de las membranas y el costo de los productos químicos utilizados para su limpieza.

La colmatación se puede definir de acuerdo con la Unión Internacional para la Química Pura y Aplicada (IUPAC), como la pérdida de la capacidad de filtración de una membrana debido al depósito de material que causa ensuciamiento sobre la superficie de la membrana y en el interior de los poros (Koros *et al.*, 1996), este material de ensuciamiento puede estar constituido por: biomasa, materia coloidal, materia orgánica y materia inorgánica. El efecto principal es el taponamiento de la membrana, aumento de la presión requerida para la filtración y la consecuente pérdida del caudal.

Entre los nuevos desarrollos para mitigar la colmatación se encuentran la optimización de los retrolavados (Vargas *et al.*, 2008) el uso de aditivos como la diatomita (Yang *et al.*, 2010) y floculantes (Iversen *et al.*, 2009), la implementación de medios de soporte (Ng *et al.*, 2008), pre-sedimentación de la biomasa y modificaciones de la superficie o material de la membrana (Yu *et al.*, 2008). El aumento en el tamaño de las partículas se ha visto que mejora las propiedades de la filtración de la biotorta y retarda el taponamiento de los poros ya que éste se debe principalmente a partículas con diámetros menores a 1 μm (Liu *et al.*, 2012); de manera que la granulación aerobia (Beun *et al.*, 1999) se ha propuesto como una opción para mejorar las características de la biomasa con el fin de obtener una buena filtración (Li *et al.*,

2005, Tay *et al.*, 2007). Entre las consideraciones que se deben tomar para la implementación de un tratamiento de membranas sumergidas con lodos granulares están: a) el diseño del reactor, b) el tipo de membrana, c) condiciones biológicas de operación y d) condiciones fisicoquímicas de operación.

Las ventajas que presenta la tecnología de lodos granulares tiene con respecto a los procesos tradicionales de lodos floculentos principalmente se mencionan: una reducción en costo de operación, que puede llegar a ser hasta un 20% menor (de Kreuk *et al.*, 2004) y el ahorro de espacio (sólo ocupa un 25%), lo cual es importante económicamente por lo costoso que suele ser el terreno en los centros urbanos, sin embargo tienen la desventaja de eliminar por el efluente una cantidad alta de sólidos suspendidos (Beun *et al.*, 1999), de manera que el acoplamiento de esta tecnología a un proceso de separación de sólidos, como es el de membranas sumergidas, puede mejorar la calidad del efluente, robustecer al proceso, y así mitigar el problema de la colmatación que depende como un factor principal del tamaño de partícula (Chang *et al.*, 2002), por lo tanto al acoplar los dos procesos se busca aprovechar de manera simultánea las ventajas de ambos.

Los clorofenoles son compuestos químicos que constituyen un problema en los residuos de varias industrias principalmente en las químicas, farmacéuticas y las petroquímicas (Carucci *et al.*, 2008; Olmos *et al.*, 2004), de forma particular el 4-clorofenol se ha considerado como un contaminante modelo para ese tipo de compuestos (Moreno-Andrade *et al.*, 2006b) debido al efecto inhibitorio que tiene sobre los lodos activados en los sistemas de tratamiento de aguas municipales (Shahinkaya y Dilek, 2005) y su ecotoxicidad (EC_{50} 1.9 mg/L, Monsalvo *et al.*, 2009).

Sin embargo surgen muchas interrogantes acerca del acoplamiento de ambos procesos como las siguientes: ¿Cómo se ve afectada la presión de selección sobre los gránulos al introducir una membrana en un proceso de lodos granulares aerobios? ¿Cómo afecta la presión selectiva a la biomasa y a la estabilidad de los gránulos? ¿Qué ventajas tiene la morfología de los gránulos en el bioensuciamiento de las membranas? ¿Cual es dinámica de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en la formación de gránulos aerobios y en la colmatación de las membranas? Esta investigación se realizó para dar respuesta a estas interrogantes.

Este trabajo se dividió en cuatro etapas: la primera fue la aclimatación de biomasa para la degradación de 4-clorofenol, a partir de un inculo de lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales convencional, la siguiente etapa fue aplicar las condiciones de granulación de manera que en el apartado 3.1 se presenta cuál es el efecto de la relación DQO/N sobre el proceso de granulación de la biomasa, en la tercera etapa se introdujo una membrana en el reactor y se compara el desempeño de éste proceso de lodos granulares con membranas sumergidas con un SBR convencional con gránulos aerobios (apartado 3.2), en el apartado 3.3 se propone un mecanismo para el proceso de colmatación de las membranas, y en la cuarta y última etapa se implementa una estrategia anticoltatación que consiste en

intercalar ciclos SBR en la operación normal de un MSBR y finalmente en el mismo apartado, los resultados del desempeño de la membrana colocada en un módulo separado del reactor (apartado 3.4)

En el capítulo 4, la sección de conclusiones y recomendaciones se enfoca hacia el análisis de los resultados, la formación de la capa de ensuciamiento de las membranas y su correspondencia hacia alguna de las teorías de formación de biopelículas que actualmente se manejan, también se hacen algunas observaciones y recomendaciones para investigaciones futuras a partir de la experiencia adquirida.

HIPÓTESIS

La colmatación de los poros de las membranas en un biorreactor discontinuo secuencial con membranas sumergidas disminuirá al aumentar el tamaño de las partículas.

El tamaño de partícula se puede incrementar a través de la granulación aerobia.

La biomasa granular que degrada 4-clorofenol puede permanecer estable en un biorreactor con membranas sumergidas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la eficiencia en el desempeño de un biorreactor discontinuo secuencial con membranas sumergidas que degrada 4-clorofenol con gránulos aerobios, desde el punto de vista de los parámetros fisicoquímicos, de colmatación de la membrana y de la integridad de los gránulos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un método para la formación de gránulos aerobios en un reactor discontinuo secuencial con capacidad para degradar 4-clorofenol.
- Evaluar la generación de sustancias poliméricas extracelulares y productos microbianos solubles durante la formación de gránulos aerobios con el fin de determinar su efecto en la colmatación y la integridad de los gránulos.
- Evaluar la estructura y morfología de las sustancias poliméricas extracelulares y de los biopolímeros agrupados en la superficie de las membranas para proponer un mecanismo de la colmatación.
- Proponer una estrategia para mitigar la colmatación en un reactor de membranas sumergidas con lodos granulares aerobios.

1 ANTECEDENTES

1.1 Biorreactores con membranas

El primer reporte del uso de membranas para el tratamiento de aguas residuales fue en 1969 por Smith *et al.*, quien trabajó para la compañía Dorr-Oliver, cuando en un módulo separado introdujeron membranas con la finalidad de separar los lodos activados y así no depender de la sedimentación por gravedad, sin embargo a pesar de los buenos resultados obtenidos, fue hasta al finalizar la década de los años ochentas cuando Yamamoto *et al.*, (1989), desarrollaron el primer prototipo de reactor con membrana sumergida (MBR) al introducir la membrana dentro del mismo reactor biológico, evitando el uso de una bomba de recirculación, proceso que está en amplio uso hasta la actualidad, desde entonces se ha incrementado el uso de esta tecnología llegando en el año 2005 a tener un mercado de US\$ 217 millones y con un rango de crecimiento de 10.9 % anual (Drews, 2010).

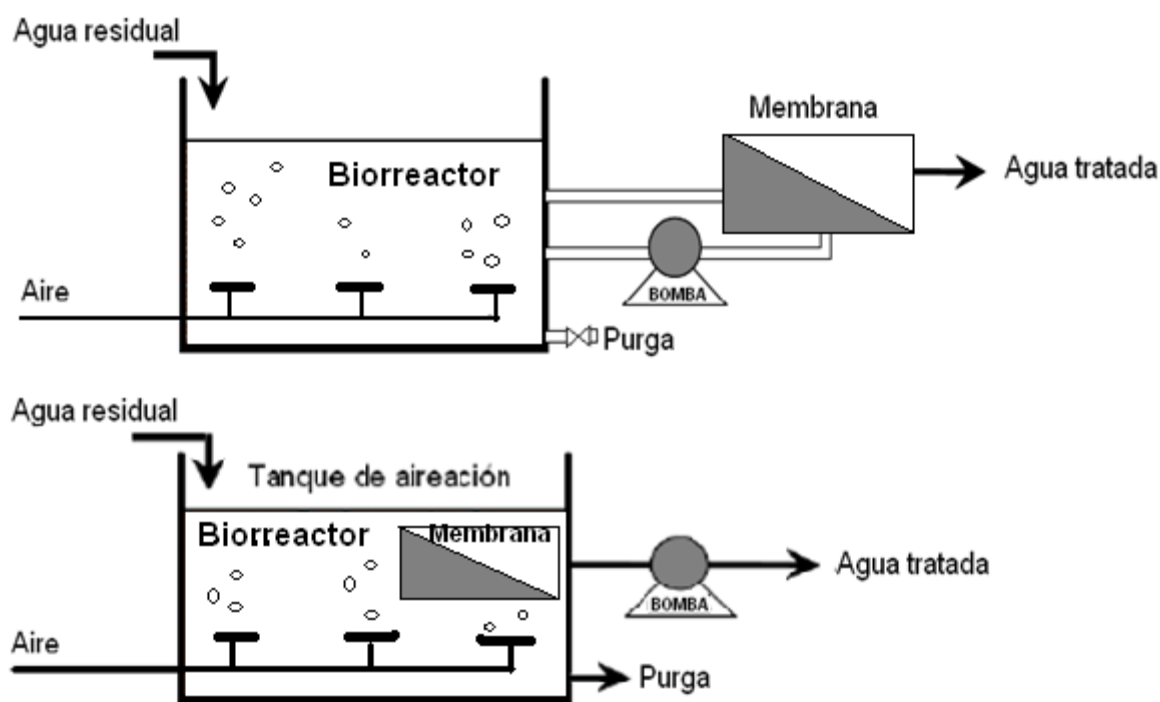


Figura 1.1 Configuración de los MBR (Visvanathan *et al.*, 2000).

Las membranas debido a la gran capacidad de separación que tienen, se utilizan comúnmente como un complemento a otros procesos biológicos o como un reemplazo de la sedimentación, ya que forman una barrera que evita el cruce de los sólidos suspendidos y retienen bacterias patógenas y algunos virus (Buitrón *et al.*, 2006). Las configuraciones típicas de los biorreactores con membranas sumergidas son dos: membranas internas y membranas externas (Figura 1.1), en la configuración externa, el licor mezclado es bombeado a alta presión hacia un módulo en donde están colocadas las membranas hasta

alcanzar un caudal específico (flux) de entre 50 y 120 L/h/m² de filtración y una presión transmembrana (PTM, que puede definirse como la presión necesaria para hacer pasar el agua a través de la membrana), en el rango de 1 a 4 bar, en cambio, para la configuración interna la filtración se lleva a cabo en el mismo reactor mediante la succión del permeado, el flux varía entre 15 y 50 L/h/m² y la PTM alcanza aproximadamente 0.5 bar (50 kPa), siendo menor que para la configuración externa.

1.1.1 Ventajas de los biorreactores con membranas

La ventaja principal de los biorreactores con membranas sumergidas (MBR) es la calidad del agua obtenida, la cual llega a estar libre de sólidos suspendidos detectables y Demanda Bioquímica de Oxígeno DBO₅ menor a 5 mg/L, debido a sus características, puede ser reutilizada en: enfriadores, sanitarios, lavado de patios, riego, lagos artificiales, etc. (Visvanathan *et al.*, 2000). Otras ventajas que tienen son: el reemplazo del tradicional sedimentador secundario en el tren de tratamiento por un módulo compacto, así se evita la dependencia de todo el sistema de tratamiento de la velocidad de sedimentación de los lodos, también permiten las membranas una mayor concentración de biomasa llegando a tener hasta 20-30 g/L (Buitrón *et al.*, 2006). Los biorreactores con membranas aparte de tener una completa retención de biomasa dentro del reactor retienen también sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y productos microbianos solubles (PMS), los cuales son degradados posteriormente por el mismo proceso evitando complicaciones y problemas ecológicos, ya que al llegar estos al ambiente, pueden alterar la biodisponibilidad de contaminantes hidrofóbicos, nutrientes o elementos traza. (Li *et al.*, 2005).

Los (MBR) por el alto tiempo de retención de lodos manejado (50-100 días), tienen una menor producción de lodo en exceso (0.22-0.53 kg SS/kgDBO₅) (Visvanathan *et al.*, 2000) que los procesos convencionales de lodos activados (0.7-1.2 kg SS/kgDBO₅) (Technobagolous *et al.*, 2004). Las características que deben tener las membranas para obtener un rendimiento óptimo son las siguientes (Visvanathan *et al.*, 2000):

1. Ser inertes y no biodegradables.
2. Ser fáciles de limpiar, de regenerar, y deben de ser resistentes a los agentes químicos, a las presiones, y a las temperaturas elevadas.
3. Tener una distribución de los poros uniforme y elevada porosidad.
4. Ser neutras o presentar carga negativa para evitar la adsorción de los microorganismos.
5. Ser duraderas y fáciles de sustituir.
6. Ser capaces de resistir las condiciones específicas del agua de alimentación.

Los materiales más utilizados en la actualidad para la fabricación de membranas, debido a su capacidad de trabajo, y sobre todo por su bajo costo son los materiales poliméricos, principalmente: acetato de celulosa, poliétersulfona (PES), polietileno (PE), polipropileno (PP), fluoruro de polivinilidieno (PVDF), teflón (PTFE), poliamida (0.04-0.1 μm) se utilizan además materiales inorgánicos como: cerámicos (0.1-0.2 μm), dióxido de zirconio (0.05 μm) y alúmina (0.2μm). De las características del material depende la

afinidad con algún tipo de sustancias colmatantes, por ejemplo, las membranas de polietileno se colmatan irreversiblemente más rápido que las de PVDF (Le-Clech *et al.*, 2006).

Las membranas se clasifican de acuerdo a su forma en: planas, tubulares, de placas y de fibra hueca. El tipo de membranas más utilizado en el mercado son las de fibra hueca y las tubulares, por ser compactas, fáciles de manejar, retrolavables y toleran una mayor cantidad de sustancias coloidales debido al movimiento que tienen durante la aireación. Por el tamaño de poro, las membranas se clasifican en: microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa (Smith 1969) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Clasificación de las membranas.

| | Ósmosis inversa | Nanofiltración | Ultrafiltración | Microfiltración |
|------------------|---|------------------------------|--|---------------------------------|
| Tamaño de poro | 0.002 μm | 0.002 – 0.05 μm | 0.05 – 0.2 μm | 0.2- 5 μm |
| Soporte | 150 μm | 150 μm | 150-250 μm | 10-150 μm |
| Capa superficial | 1 μm | 1 μm | 1 μm | 1 μm |
| Retención | Cl ⁻ , Na ⁺ , glucosa aminoácidos proteínas | Mono, di y oligosacáridos | Macromoléculas, Proteínas, Polisacáridos y virus | Partículas, barro, bacterias |
| Presión | 15 - 150 bares | 5 - 35 bares | 1 - 10 bares | 2 bares |

1.1.2 Colmatación de la membrana

La colmatación de la membrana es el principal problema de los sistemas de tratamiento con membranas sumergidas y es un efecto que resulta de las interacciones físicas, químicas o biológicas, entre los materiales de la membrana y los componentes de la biomasa, como son células, desechos, metabolitos microbianos, ácido desoxirribonucleico (ADN). Durante el proceso de filtrado, estos materiales se van depositando o adsorbiendo en la superficie y en el interior de los poros de la membrana e impiden el acceso del líquido hasta bloquear completamente el filtrado. La colmatación se define de acuerdo con la Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (IUPAC) como la reducción del flux causada por el depósito o adsorción de materia suspendida o solutos en la superficie de la membrana o dentro de los poros (Koros *et al.*, 1996).

En cuanto a la limpieza, la colmatación se puede clasificar en reversible, irreversible o residual. El ensuciamiento reversible se debe principalmente a la formación de una biotorta en la superficie de la membrana, que llega a tener incluso varios cientos de micras de espesor (Juang *et al.*, 2008) que generalmente se puede remover por medio de métodos físicos, por ejemplo mediante retrolavados. El ensuciamiento irreversible se debe principalmente al bloqueo de poros y a la formación de una capa fuertemente adherida en a la superficie de la membrana (Jiang *et al.*, 2003) y solo se puede remover mediante una limpieza química. La colmatación residual es la que no se puede remover con la limpieza química y que se va acumulando durante el tiempo de operación de las membranas (Drews, 2010).

De entre las distintas formas de la colmatación, la formación de biotorta es la que más se ha reportado en los MBR con lodos floculentos y tiene una mayor influencia en la resistencia total cuya aportación va desde un 55 % y hasta un 90%, esto depende directamente de la concentración de los sólidos suspendidos totales en el reactor y del flux (Damayanti *et al.*, 2011). La colmatación incrementa los costos de operación debido a la necesidad de reemplazo de las membranas dañadas, la limpieza química, los tiempos de paro para mantenimiento y aumenta la inversión inicial ya que afecta directamente a la eficiencia debido a la disminución del flux y al incremento de la presión transmembrana (PTM), por lo que se requiere en una mayor cantidad de membranas para aumentar el área de filtración.

1.1.2.1 Principales mecanismos de la colmatación de las membranas

Los mecanismos por los que se lleva a cabo la colmatación de los poros de las membranas pueden ser varios dependiendo del proceso y las características de la biomasa, sin embargo por el efecto que ejercen en la disminución del flux, se pueden tratar de resumir en los 4 siguientes (Liu *et al.*, 2012b) en donde la disminución del flux J con respecto al inicial J_0 ; (J/J_0) se explica por (Figura 1.2):

- a) Bloqueo completo, cuando las partículas quedan atoradas obstruyendo los poros de la membrana y está dado por:

$$J/J_0 = e^{-Kt} = e^{-K_a/ot} \quad (1)$$

- b) Bloqueo estándar, debido a la adsorción de partículas en el interior de los poros reduciendo su diámetro efectivo, dado por:

$$J/J_0 = (1 + 2K_s A_{eff}^2 J_0^{0.5} t)^{-2} \quad (2)$$

- c) Bloqueo intermedio: debido al depósito de partículas en la superficie de la membrana y en el interior de los poros, dado por la ecuación 3:

$$J/J_0 = (1 + K A_{eff}^2 J_0 t)^{-1} = (1 + K_a J_0 t)^{-1} \quad (3)$$

- d) Formación de biotorta: formación de una capa de material biológico en la superficie de la membrana con filtración a través de ésta, dada por la ecuación 4:

$$J/J_0 = (1 + 2K A_{eff}^2 J_0^{0.5} t)^{-0.5} = (1 + 2K_c R_c J_0 t)^{-0.5} \quad (4)$$

En donde J es el flux, J_0 es el flux al inicio de la filtración, K_a es la superficie bloqueada de la membrana por unidad de volumen permeado por la membrana (m^{-1}). K_s es el parámetro de Hermia, que significa la disminución en el área efectiva de los poros por unidad de volumen permeado (m^{-1}). R_r es la fracción de la resistencia por torta con respecto a la resistencia de la membrana limpia (adimensional).

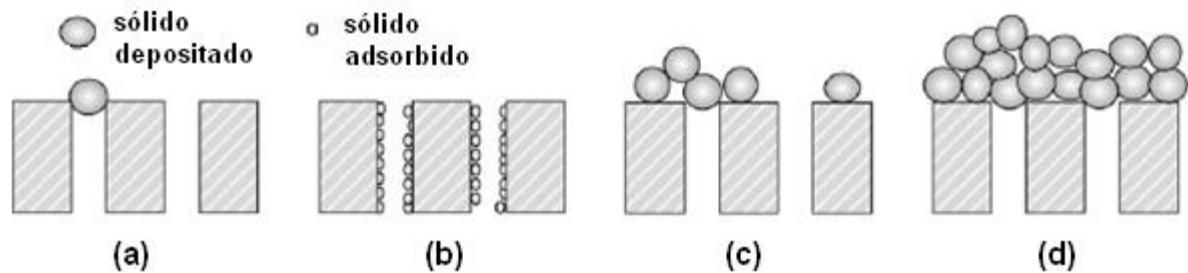


Figura 1.2 Mecanismos de la colmatación a) Bloqueo completo, b) Bloqueo estándar, c) Bloqueo intermedio y d) Formación de biotorta (Shen *et al.*, 2010).

1.1.2.2 Productos microbianos solubles y sustancias poliméricas extracelulares

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son producidas por los microorganismos durante el metabolismo de la materia orgánica, los EPS son macromoléculas poliméricas generalmente insolubles y están constituidos principalmente por proteínas, polisacáridos, ADN y ácidos húmicos. Los EPS sirven a los microorganismos como adhesivo para fijarse ya sea a una superficie o entre ellos (Drews *et al.*, 2007) y mantienen la estructura tridimensional de los agregados entre otras muchas funciones. Flemming y Wingender (2010), enumeran 14 funciones que realizan los EPS en comunidades bacterianas como son las biopelículas: adhesión, agregación de células bacterianas, cohesión de biopelículas, retención de agua, barrera protectora, adsorción de compuestos orgánicos, adsorción de iones inorgánicos, actividad enzimática, fuente de nutrientes, intercambio de información genética, aceptor o donador de electrones, exportación de componentes celulares, almacén de energía, arreglos enzimáticos entre otras.

Los productos microbianos solubles (PMS) son resultado ya sea del metabolismo celular o de la respiración endógena, están constituidos por moléculas de gran tamaño generalmente solubles, estos forman sustancias coloidales que se acumulan gradualmente en el interior de los poros y reducen el tamaño efectivo de estos hasta llegar a bloquearlos completamente, se considera que los EPS solubles una vez hidrolizados forman parte de los PMS (Laspidou y Rittman, 2002).

1.1.2.3 Contaminantes orgánicos

Los contaminantes del agua a tratar, contienen partículas suspendidas, macromoléculas y biopolímeros que reducen la capacidad de filtración de las membranas, ya que éstos interactúan con los lodos activados formando una capa coloidal e incrementan la viscosidad, dando como resultado el depósito en la superficie de la membrana de biopolímeros principalmente proteínas, polisacáridos, otros compuestos provenientes del influente, como consecuencia de la interacción disminuye la capacidad de filtración.

1.1.2.4 Contaminantes inorgánicos

Los compuestos químicos inorgánicos tienen influencia en la colmatación principalmente en los procesos anaerobios con membranas, Choo *et al.*, (1996), ellos proponen que la interacción de iones metálicos con las sustancias coloidales incrementa la densidad de la biotorta en la superficie de las membranas, calcio y magnesio son los principales colmatantes, sobre todo el calcio debido a la baja solubilidad de sus sales, estas se precipitan como CaCO_3 , CaSO_4 , estruvita, etc., además modifican las características fisicoquímicas (hidrofobicidad, pH, densidad, etc.), de la biomasa propiciando la colmatación. En algunos estudios se ha hecho énfasis a la interacción entre los iones metálicos y los biopolímeros como los EPS, de manera que estos inducen su precipitación y cristalización en las superficies bloqueando los poros de manera irreversible (Herrera-Robledo *et al.*, 2011).

1.1.2.5 Crecimiento de biopelícula

Las bacterias existen en la naturaleza en dos formas: bacterias libres planctónicas y en forma de biopelículas, se considera que el 99 % de todas las bacterias se encuentran en forma de biopelículas y que solamente el 1 % se encuentra de manera libre planctónica (Flemming y Wingender, 2010), las biopelículas se forman cuando las bacterias libres se adhieren a una superficie y elaboran señalizaciones químicas para coordinar la diferenciación y la estructura que incluye una matriz de exopolímeros (EPS) constituida principalmente por polisacáridos y proteínas que les sirve de protección conocida también como glicocálix. La formación de biopelículas forma parte de una antigua estrategia de supervivencia de las bacterias procariontas, ya que se brindan protección mutua y llegan a conformar una especie de comunidad bien estructurada que incluye el transporte de los nutrientes y de los desechos, además brinda también protección ante los cambios ambientales de pH, temperatura, toxicidad (Flemming, 2002), falta o exceso de nutrientes entre otros (Yang *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010).

El ciclo vital de una biopelícula se puede caracterizar por cuatro etapas: a) acondicionamiento de la superficie, b) adhesión de los microorganismos, c) crecimiento de la biopelícula y d) desprendimiento, la primera etapa comienza cuando una superficie sólida, como las membranas, es sumergida en un medio acuático, las moléculas orgánicas (EPS) son absorbidas en dicha superficie formando una película macromolecular acondicionada, las bacterias una vez percibida una superficie, la colonizan rápidamente, en pocos minutos se forma la película molecular y a las 24 horas la colonización bacteriana ya es significativa, debido a que las bacterias se unen a la superficie mediante fimbrias, flagelos o pili, la motilidad en esta etapa tiene un papel importante. En la fase de crecimiento, las bacterias adheridas se comienzan a dividir y las células hijas se extienden por todo el sitio colonizado, entonces mediante la generación de EPS conforman una matriz con estructuras parecidas a champiñones. En la última etapa

cuando la comunidad ha madurado, comienza el desprendimiento ya sea de algunas células o trozos completos, los cuales irán a colonizar otra superficie, reiniciándose así el ciclo (Atlas y Bartha, 2002).

De acuerdo con Flemming y Schaule, (1988), la biocolmatación de las membranas tiene al igual que la formación de la biopelícula las cuatro etapas mencionadas, con la diferencia de que se encuentran aceleradas por el efecto del transporte de biomasa por la filtración y depende de tres componentes: a) superficie (composición química, carga superficial, tensión superficial, hidrofobicidad, capa acondicionada, rugosidad, porosidad, tamaño de poro); b) microorganismos (especies, composición de las poblaciones mezcladas, número de células, fase de crecimiento, estatus nutricional, hidrofobicidad, carga superficial, respuesta fisiológica a la adhesión, EPS); c) medio líquido (temperatura, pH, sustancias acondicionantes, otros compuestos orgánicos disueltos, materia suspendida y coloides, viscosidad, tensión superficial, presión, fuerzas de corte (flujo), fuerzas verticales, flux).

1.1.2.6 La biotorta

Es conveniente hacer una definición de conceptos para describir el fenómeno de la colmatación de acuerdo con Lee *et al.*, (2008). El término capa de torta (cake layer) se define como el depósito y compresión de material particulado que es rechazado en la superficie de la membrana mientras, las biopelículas (biofilm) son comunidades de microorganismos asociadas a una superficie embebidas en una matriz exopolimérica. La biocapa colmatante (biolayer) a su vez está constituida por flóculos microbianos y otros agregados activos como son: biopolímeros, productos microbianos solubles y bacterias planctónicas que llegan a desarrollarse en forma de biopelícula en la superficie, por lo que el término biotorta (biocake) puede englobar a todos y es representativo de lo observado en la superficie de las membranas sumergidas.

1.1.2.7 Flux crítico

Cuando la operación se lleva cabo a flux constante, se pueden distinguir dos tipos de colmatación dependiendo de la magnitud del flux: uno cuando se opera a flux supercrítico y otro a flux subcrítico. El flux crítico (J_c) se define de acuerdo a la hipótesis de que en el arranque existe un flux tal que por debajo de éste no se tiene disminución del flux, mientras que por encima, ocurre la colmatación (Le-Clech *et al.*, 2003). La forma apropiada de calcularlo, es incrementando el flux por etapas, permitiendo un tiempo en cada etapa para estabilizar la PTM y poder observar su incremento, se toma como flux crítico aquel flux en que la PTM se incrementa por más de 0.01 kPa/minuto. Cuando se opera en forma supercrítica ($J > J_c$) se tiene un incremento de la colmatación debido a la formación y compactación de la biotorta en la superficie de la membrana, la PTM aumenta casi de manera exponencial. En la forma de operación subcrítica ($J < J_c$) se identifican dos etapas: en el primer periodo una capa colmatante obstruye los poros que después de muchas corridas se vuelve hidráulicamente irreversible, aparece sobre la superficie una

capa en forma de gel. En una segunda etapa, se forma la biotorta y el comportamiento es similar al mostrado en la operación supercrítica (Wang y Wu, 2009) debido que con la biotorta depositada en la superficie de la membrana disminuye el área efectiva de filtración (Figura 1.3).

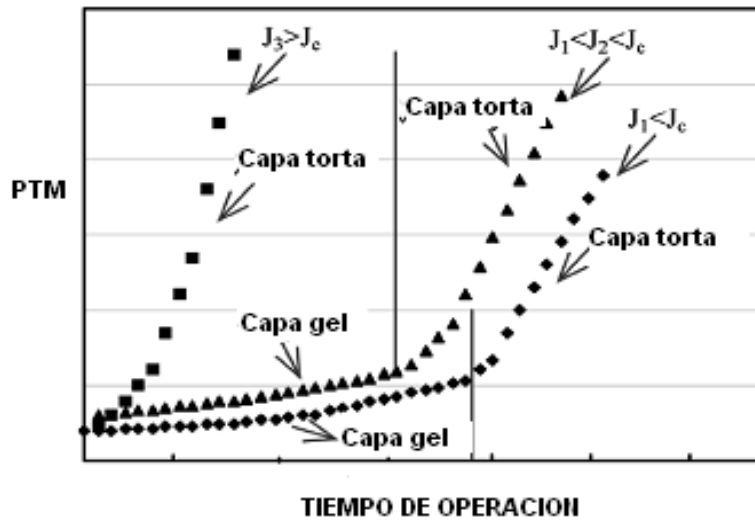


Figura 1.3 Etapas de la colmatación a flux crítico ($J_1 < J_2 < J_c$), supercrítico ($J_3 > J_c$) y subcrítico ($J_1 < J_c$) (modificado de Le-Clech *et al.*, 2006).

1.1.3 Estrategias utilizadas para mitigar la colmatación de las membranas

Se han aplicado diferentes medidas de mitigación, estas se pueden clasificar de acuerdo a los tres componentes (material de la membrana, condiciones de la biomasa y condiciones hidráulicas) que influyen en el ensuciamiento de la membrana y a la operación: a) modificando el material y la estructura de la membrana, b) cambiando las condiciones de la biomasa, c) aplicando distintas condiciones hidráulicas del reactor, d) mediante una forma de operación óptima, como se muestra a continuación.

1.1.3.1 Modificaciones al material y estructura de las membranas

Debido al avance en la ciencia de los materiales se tiene una gran variedad de opciones en cuanto a la composición y al tratamiento aplicado a las membranas. Los materiales más utilizados para la fabricación son los polímeros (normalmente hidrofóbicos) como el fluoruro de polivinilidieno (PVDF), polietilsulfonas (PES) y polipropileno (PP), por ello se tiene que aplicar un tratamiento químico especial con el fin de hacer la superficie hidrofílica y evitar que los microorganismos y los exopolímeros que tienden a ser hidrofóbicos se adhieran a las membranas (Li *et al.*, 2008). Otro tratamiento superficial aplicado a las membranas con el fin de prevenir el depósito de solutos es la incorporación de grupos funcionales iónicos, en su mayoría con carga negativa. También se busca biomimetizar las membranas para evitar la formación de biopelículas agregando fosfolípidos y polipéptidos. Otros materiales

biomimétricos incluyen: quitosano, gelatina, heparina e insulina (Drews 2010). Una forma física de modificar la superficie de la membrana es variando la rugosidad, se ha comprobado que a mayor rugosidad, se tiene mayor área de filtración (Hashino *et al.*, 2011).

1.1.4 Condiciones de la biomasa

El tipo de biomasa está relacionado directamente con la cantidad de EPS generados, estos con la viscosidad y la hidrofobicidad de la biomasa, finalmente con la compresibilidad y la porosidad de la biotorta (Chen y Lee, 2011). Lee *et al.* (2008) proponen que cuando la biotorta se acumula en la superficie de la membrana, al aumentar de grosor, la porosidad se reduce rápidamente, ese fenómeno es agravado por los productos de la respiración endógena y la lisis celular causada por la falta de penetración de oxígeno y nutrientes, además de la producción de EPS. Recientemente se ha encontrado que tiene una gran influencia la presencia de microorganismos filamentosos en la colmatación (Pan *et al.*, 2010), ya que estos pueden enlazar y fijar a los colmatantes y ambos representan un obstáculo para el desempeño de los biorreactores con membranas sumergidas.

1.1.4.1 Carga orgánica (CO)

Cuando se incrementa la tasa de carga orgánica, se provoca el aumento en la concentración de los compuestos orgánicos suspendidos y solubles en la proximidad de la membrana, esto da como resultado la formación de una delgada capa de biotorta (Le-Clech *et al.*, 2006), la resistencia se incrementa rápidamente y la presión transmembrana aumenta lo cual es indicativo de colmatación, esto se puede evitar operando en un rango de entre 0.25 y 0.5 gDQO/gSSV/d. A su vez, Meng *et al.* (2009) reportan que conforme se incrementa la carga orgánica, se tiene un incremento de la producción de EPS y la proliferación de microorganismos filamentosos.

1.1.4.2 Tiempo de retención de sólidos (TRS)

Para los procesos MBR, debido a las condiciones de retención de la biomasa por parte de la membrana, se permiten tiempos de retención mayores que en los procesos convencionales de lodos activados (20 - 100 días). Esto permite tener una buena remoción del nitrógeno y degradación de sustancias orgánicas, el TRS influye en el desempeño de las membranas, ya que a mayor TRS menor concentración se tiene de EPS y a largos TRS se tiene una mayor inactivación de microorganismos provocando un aumento en la concentración de compuestos orgánicos (Ng *et al.*, 2005). Otros investigadores por el contrario reportan un incremento de la viscosidad y como consecuencia de la colmatación al incrementar el TRS (Lee *et al.*, 2003). Por ese motivo se deben manejar adecuadamente los tiempos de purga para mantener el TRS adecuado (20 a 50 días).

1.1.4.3 Tiempo de residencia hidráulica

Influye directamente en el diseño del reactor, a mayor tiempo de retención hidráulica (TRH), se puede tener un menor flux, pero como consecuencia un mayor volumen de reactor, mientras que a tiempos bajos se tiene que incrementar ya sea el flux o la cantidad de área filtrante. Al aumentar el TRH aumenta también la concentración de materia orgánica, productos microbianos solubles, EPS y microorganismos, provocando que se acelere la colmatación (Meng *et al.*, 2009).

1.1.4.4 Sólidos suspendidos

Una de las características de los MBR es que se puede trabajar con una mayor cantidad de sólidos suspendidos (SS) con respecto a los procesos convencionales. Sin embargo, la tasa de colmatación de la membrana se incrementa conforme se aumenta la cantidad de sólidos suspendidos del licor mezclado (SSLM) (Damayanti *et al.*, 2011). Una alta concentración de sólidos (15 - 20 g/L), en general, causa una baja capacidad de filtración, ya que se depositan en mayor cantidad en la superficie de la membrana incrementando el grosor de la biotorta. Bajo un TRH constante en un MBR, la síntesis de biomasa y la respiración endógena alcanzan un equilibrio generando una menor producción de lodos de exceso que los procesos convencionales de lodos activados, los cuales sin embargo, se deben purgar para evitar afectaciones al desempeño de las membranas.

1.1.4.5 Tamaño de partícula

De acuerdo con la ecuación de Carman-Kozeny, el tamaño de las partículas y la porosidad de la biotorta son los principales parámetros que determinan la resistencia específica de la biotorta (Liu *et al.*, 2011):

$$\alpha = \frac{180(1-\varepsilon_p)}{\rho_p d_p^2 \varepsilon_p^3} \quad (5)$$

Donde: α es la resistencia específica de la biotorta (m/kg), ε_p es la porosidad de la biotorta, ρ_p es la densidad de las partículas (kg/m³) y d_p es el diámetro de partícula (m).

De la ecuación se puede deducir que las partículas pequeñas causan una mayor resistencia y un taponamiento mayor, por lo tanto, es lógico que los lodos granulares al tener diámetro mayor a 200 μm causen menor colmatación debido a la biotorta que los lodos floculentos que tienen un diámetro menor a 200 μm , de igual manera, Zhang *et al.* (2006) reportaron que la resistencia de biotorta (R_c) aporta 34.7 % para lodos granulares y 72.7 % para lodos floculentos de la resistencia total.

Del diámetro de partícula depende también el mecanismo de la colmatación, según Stoller *et al.* (2009), si la relación del diámetro de la partícula/diámetro de poro es menor a 0.1, la partícula pasa sin problema por la membrana, si es entre 0.1 y 10 se bloquea el poro, si es mayor a 10, es rechazado por la membrana y podría formar biotorta.

La colmatación por bloqueo de poros depende principalmente de la presencia de partículas finas (diámetro $< 1 \mu\text{m}$) y está relacionado con la morfología de estas partículas, por ejemplo los polisacáridos con una estructura de cadena larga, se adsorben más en los poros de las membranas que las proteínas que tienen una estructura más gruesa (Liu *et al.*, 2012b).

1.1.4.6 Adición de floculantes o coagulantes

Una gran variedad de productos existen en el mercado que se pueden utilizar con la finalidad de retrasar la colmatación, algunos inciden directamente sobre las características de la biomasa y los EPS o sirven de abrasivos para evitar la formación de la biotorta (Le-Clech *et al.*, 2006).

Los polielectrolitos catiónicos son utilizados con la finalidad de disminuir la cantidad de productos microbianos solubles, aunque también se han adicionado: FeCl_3 , policloruro de aluminio (PACl), quitosano y almidón entre otros (Drews 2010). Los polímeros catiónicos llegan a reducir los polisacáridos en un 55% y las proteínas en un 30% (Iversen *et al.*, 2009). Mishima y Nakajima, 2009 reportan que los coagulantes reducen la cantidad de EPS y de fósforo.

1.1.4.7 Retrolavados químicos

Los productos químicos oxidantes como el ozono, peróxido de hidrógeno y el hipoclorito de sodio, se aplican con el fin de evitar el crecimiento de biopelícula y para oxidar la materia orgánica depositada en los poros de la membrana de manera que se mitiga la colmatación irreversible (He *et al.*, 2006). Estos productos también se agregan en los retrolavados (Kim *et al.*, 2006). Otra manera de reducir la colmatación probada a nivel laboratorio es realizar los retrolavados con agua desionizada (Li *et al.*, 2009).

1.1.4.8 Medios de soporte

El carbón activado se ha utilizado ampliamente como soporte para los microorganismos, ya sea granular o en polvo también tiene la propiedad de adsorber PMS; otros productos que se han utilizado son la tierra diatomea (Chu *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2010), que forma una capa hidrofílica en la superficie de la membrana. Como soportes también se han utilizado materiales plásticos (Ng *et al.*, 2008) para formar lechos fijos o móviles y de manera que se inmoviliza la biomasa evitando que esté en contacto con la membrana (Lee *et al.*, 2001, Sombatsompop *et al.*, 2006).

1.1.5 Condiciones hidráulicas

En una filtración a flujo cruzado, como se esquematiza en la Figura 1.4, el transporte de las partículas depende principalmente de dos fuerzas: una de acercamiento o atracción hacia la membrana y otra de alejamiento o rechazo a la membrana, con respecto a la membrana uno es positivo y el otro negativo, el vector de fuerzas negativo se constituye por: la fuerza de gravedad (F_g), fuerzas de atracción de Van der Waals que incluye fuerzas de atracción entre átomos, moléculas y superficies (F_A), y la fuerza de arrastre

debida a la filtración (F_j), mientras que en la parte positiva el vector de fuerzas incluye la flotabilidad de las partículas producida por la presión del líquido que la rodea (F_b), la repulsión eléctrica de doble capa entre las partículas (F_R), la fuerza dada por el movimiento Browniano (F_B), la fuerza dada por velocidad superficial de agitación (F_s), y la fuerza de caída debida a la inercia debida al cambio de velocidad cerca de una pared plana (F_l), la tasa del momentum de una partícula está dado por la suma de todas estas fuerzas (F) (Wang y Wu, 2009).

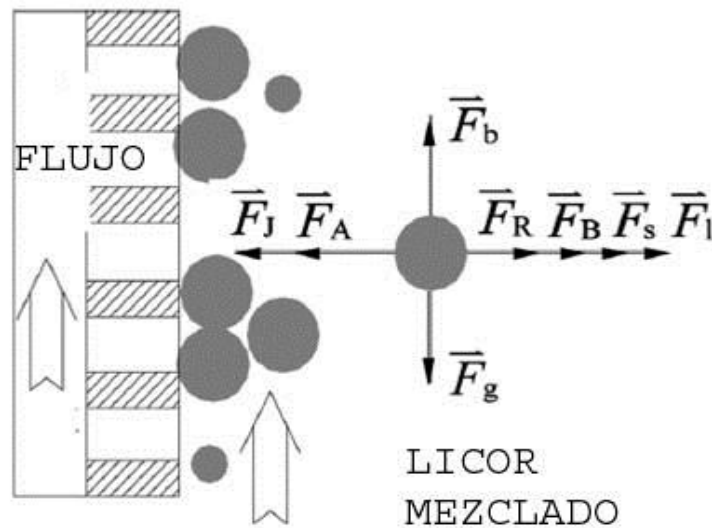


Figura 1.4 Fuerzas que influyen en el depósito de una partícula en la membrana, (modificado de Wang y Wu., 2009)

El conjunto de fuerzas está determinado por las propiedades fisicoquímicas de la biomasa: masa, densidad y diámetro de las partículas y como condiciones hidráulicas; las corrientes internas del flujo y las fuerzas de corte generadas por la agitación. Las propiedades fisicoquímicas de los sólidos y los coloides presentes en la solución se han aprovechado para controlar la colmatación en conjunto con las condiciones hidráulicas, dando origen a diversas estrategias como son: el aumento en la aireación, la aplicación de retrolavados, la operación a flux bajo o subcrítico (Cho y Fane, 2002)

1.1.5.1 Periodos de relajación

La introducción de periodos de operación y relajación durante la filtración permiten un descanso de la membrana, en el cual por efecto de la aireación se desprenden las partículas adheridas a las membranas, por ejemplo: 10 minutos encendido (ON) y 2 minutos apagado (OFF) (Le Clech, 2010, Li *et al.*, 2005) son utilizados como un sustituto de los retrolavados. La relajación de las membranas es favorecida de manera particular por la manera de operación de los reactores MSBR, ya que durante el tiempo de alimentación y de reacción no se encuentran operando las membranas a diferencia de los sistemas continuos en que operan todo el tiempo.

1.1.5.2 Retrolavados

Retrolavar las membranas es una operación que consiste en cambiar el sentido del flujo aplicando una presión suficientemente alta que permita desprender las partículas adheridas tanto en la superficie y en los poros de la membrana sin que resulte dañada, generalmente se utiliza el permeado, sin embargo los retrolavados se pueden aplicar con agua desionizada o adicionar algún producto químico como el NaClO.

Vargas *et al.*, 2008, desarrollaron un algoritmo el cual permite retrolavar la membrana de manera automática al disminuir el flux en un porcentaje establecido previamente a partir del flux máximo registrado, se prolonga de manera que el tiempo de operación de la membrana, se retarda la limpieza química, sin estos retrolavados la presión máxima se alcanzaría a las dos horas de iniciada la filtración.

Se han propuesto diferentes tipos de retrolavados a partir de la modelación matemática del proceso de filtración, permitiendo una mayor eficiencia en la filtración que con los retrolavados aplicados a tiempos fijos (Peiris *et al.*, 2011).

1.1.6 Forma de operación de los biorreactores con membranas

1.1.6.1 Operación en continuo

La manera más común de operar de los sistemas de tratamiento de aguas convencionales es en continuo, en donde el flujo constante de entrada es igual al flujo constante de salida, manteniendo el mismo volumen de líquido en el reactor, tienen la ventaja de que el traslado hacia el sedimentador hace por gravedad, cuando en un proceso tradicional de lodos activados, se sustituye el sedimentador por un módulo de membranas, comúnmente la operación se sigue realizando en continuo y es la forma de operación más apropiada para plantas de tratamiento de aguas residuales municipales.

1.1.6.2 Operación en modo discontinuo secuencial

Cuando en 1914 Arden y Locked generaron el primer proceso de lodos activados, lo hicieron alimentado por lotes, de manera que los primeros reactores para el tratamiento de aguas operaron de manera discontinuo secuencial (SBR). Estos procesos tienen mayor versatilidad, al soportar cargas elevadas y compuestos tóxicos en comparación con los procesos en continuo (Buitrón *et al.*, 2005). El SBR consta de 5 etapas bien definidas (Wilderer *et al.*, 2001) que son: llenado, reacción, sedimentación, vaciado y tiempo muerto. Durante la etapa de llenado, el efluente es introducido de una manera rápida hasta ocupar el volumen de trabajo del reactor, esta etapa se puede llevar a cabo con aireación o con agitación mecánica, después sigue la etapa de reacción en la cual se oxigena el licor mezclado mediante el suministro de aire que tiene la función adicional de generar agitación para mantener la mezcla. En la etapa de sedimentación, se detiene la aireación y se da el tiempo suficiente para que los lodos sedimenten por

gravidad. Finalmente en el vaciado se decanta el sobrenadante de una manera rápida hasta obtener el volumen de intercambio, en algunos casos se establece un tiempo muerto. Todo el proceso se lleva a cabo en un solo reactor, por lo tanto, son sistemas compactos y los SBR son el proceso más apropiado para tratar aguas residuales industriales o semi-industriales (Wilderer *et al.*, 2001).

Cuando en un reactor discontinuo secuencial (SBR) se introduce una membrana, se denomina reactor discontinuo secuencial con membranas sumergidas (MSBR) (Figura 1.5), en el cual las etapas de sedimentación y decantación son sustituidas por el vaciado mediante la filtración con membranas (Vargas *et al.*, 2008), se tiene así la ventaja de operar el proceso sin que sea afectado por la velocidad de sedimentación de los lodos, con una mayor retención de biomasa y una excelente calidad del efluente.

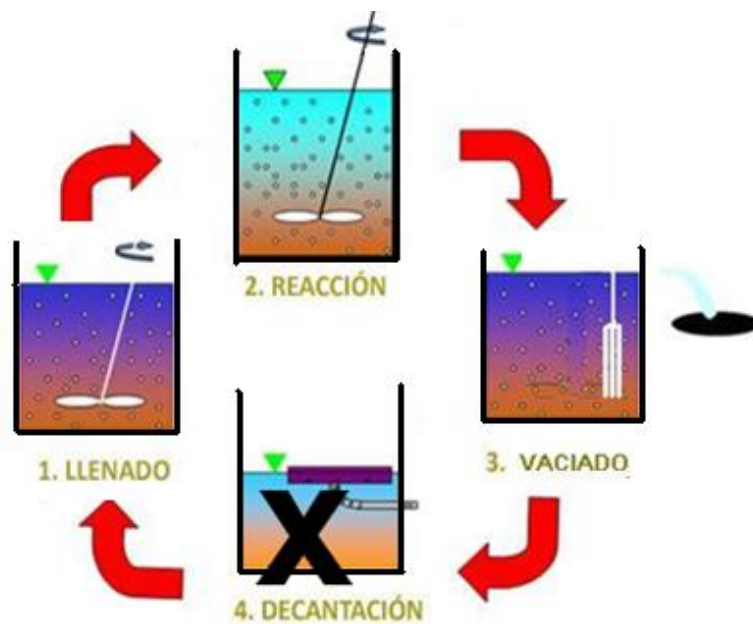


Figura 1.5 Etapas de un MSBR

1.2 La granulación aerobia

El primer reporte que se tuvo de los gránulos aerobios fue en Japón (Mishima y Nakamura 1991), en estos experimentos obtuvieron gránulos con diámetros entre 1 y 4 mm. Posteriormente Tijhuis *et al.*, (1994) observaron que en un reactor de lecho fluidizado había desprendimientos de biomasa de los soportes y que la biomasa seguía activa como gránulos, de manera que Morgenroth *et al.* (1997) reportaron la obtención de gránulos aerobios de una manera sistemática con un reactor discontinuo secuencial (SBR), desde entonces ha sido el tipo de reactor más utilizado (Beun *et al.*, 1999) para la granulación aerobia.

Dentro del primer grupo de trabajo de la IWA en Munich 2004 (De Kreuk *et al.*, 2007) definieron a los gránulos aerobios como aquéllos agregados de origen microbiano que no coagulan en condiciones de baja agitación y que sedimentan significativamente más rápido que los flóculos de lodos activados.

1.2.1 Ventajas de los gránulos aerobios

De manera similar a los gránulos anaerobios y a las biopelículas, la granulación aerobia puede considerarse como una forma de autoagregación de los microorganismos y una manera de inmovilización celular con el fin de protegerse de las condiciones ambientales adversas, de aquí que conserven las ventajas de las biopelículas con respecto a los lodos activados convencionales, sin la necesidad de tener un material de soporte, algunas de estas ventajas son:

- Mayor velocidad de sedimentación (Etterer y Wilderer, 2001, Gao *et al.*, 2011)
- Alta retención de biomasa (Kim *et al.*, 2008)
- Resistencia a los compuestos tóxicos (Jiang *et al.*, 2002; Quin *et al.*, 2004)
- Nitrificación y desnitrificación simultánea (Liu *et al.*, 2005)

Lo cual significa la posibilidad de tener plantas compactas, automatizadas, alta concentración de biomasa, baja producción de lodos, remoción de nitrógeno y con microorganismos resistentes a los compuestos tóxicos y a los picos de concentración.

1.2.1.3 Mecanismos de formación de los gránulos aerobios

Varios investigadores han propuesto mecanismos que pueden corresponder a lo observado en los procesos de granulación aerobia. Desde las primeras publicaciones, Beun *et al.*, (1999), propusieron un mecanismo para la formación de gránulos basándose en sus observaciones con el microscopio: Como primera etapa, la proliferación de microorganismos filamentosos que llegan a formar agregados o pellets con una buena sedimentación. La mayoría de bacterias por no tener esta propiedad son lavadas del reactor en la etapa de vaciado, a continuación, debido a las fuerzas hidrodinámicas de corte generadas por la agitación, estos pellets son compactados, cuando alcanzan un tamaño de 5-6 mm, los pellets se rompen liberando colonias de bacterias que crecen hasta formar los gránulos (Figura 1.6).

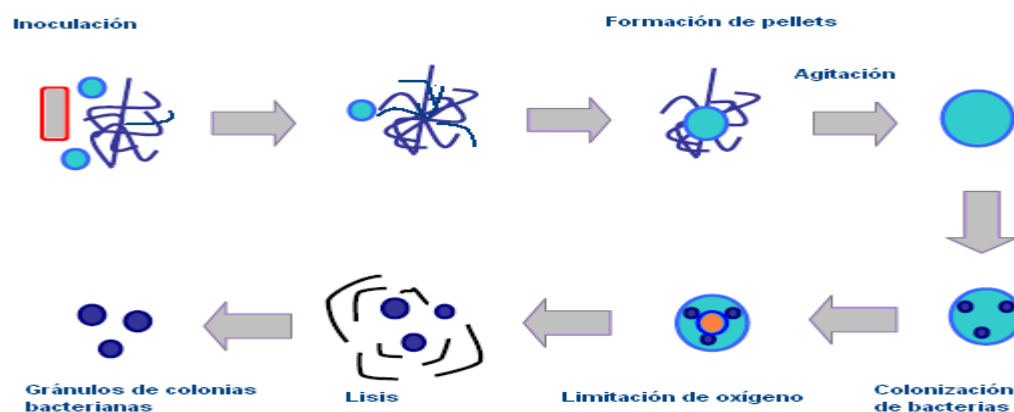


Figura 1.6 Formación de gránulos (Beun *et al.*, 1999).

Una hipótesis en la microbiología señala que la agregación microbiana ocurre mediante agregados intra, inter y multigenéricos de célula a célula a través de los receptores ubicados en la superficie celular, como las interacciones proteínas-polisacáridos o proteínas-proteínas. Reconociendo que la granulación es un proceso de autoinmovilización microbiana sin material de soporte, Liu *et al.* (2002) propusieron las siguientes cuatro etapas correspondientes al proceso de granulación (Figura 1.7):

I) Contacto microbio a microbio o contacto con alguna superficie sólida, para formar agregados debido a: fuerzas hidrodinámicas, difusión, gravedad o fuerzas termodinámicas (movimiento browniano), los microorganismos también pueden transportarse mediante flagelos, cilios o pseudópodos.

II) Formación de agregados mediante la atracción inicial debida a fuerzas físicas (van der Waals, cargas opuestas, fuerzas termodinámicas), químicas (pares iónicos, triples pares iónicos, puentes interpartículas) o bioquímicas (difusión de membrana celular, atracción de receptores celulares, deshidratación de la superficie celular, en esta etapa se considera la señalización y la acción colectiva de la comunidad bacteriana o quórum sensing), en esta etapa el incremento de la hidrofobicidad hace que disminuya el exceso de energía libre de Gibbs en la superficie celular y promueve la interacción entre las células que posteriormente sirve de motor para la conformación de auto-agregados fuera de la fase líquida.

III) La maduración de los agregados microbianos debido al adhesivo biológico producido por las funciones de asociación celulares y a la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Los cambios metabólicos y la competencia genética inducida por el ambiente, facilitan la interacción célula a célula y da como resultado una estructura microbiana altamente organizada.

IV) Estabilización de las estructuras tridimensionales principalmente por la fuerza hidrodinámica de corte debida a la agitación y al flujo. La forma y tamaño de los gránulos está determinada por las interacciones entre los agregados, la fuerza hidrodinámica de corte, las especies microbianas, la tasa de carga orgánica (TCO) y tipo de sustrato.

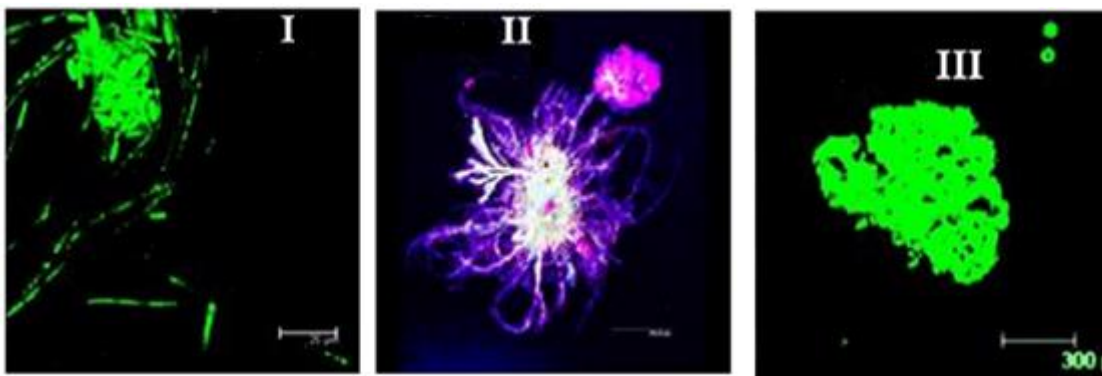


Figura 1.7 Etapas de la granulación (modificado de Adav *et al.*, 2008).

1.2.2 Principales factores que afectan a la granulación aerobia

Las propiedades de los gránulos formados en un reactor discontinuo secuencial (SBR) son afectadas por un gran número de parámetros operacionales, como son; el inóculo, la composición del sustrato, la tasa de carga orgánica, la fuerza hidrodinámica de corte, régimen abundancia-carencia, estrategia de alimentación, oxígeno disuelto, la configuración del reactor, el tiempo de retención de sólidos, el tiempo de los ciclos, el volumen de intercambio, el tiempo de sedimentación, y la intensidad de la aireación entre otros (Campos *et al.*, 2009). De los factores mencionados los que influyen principalmente en la presión de selección (Liu *et al.*, 2005) son: el tiempo de sedimentación, el volumen de intercambio y el tiempo de descarga.

1.2.2.1 La presión de selección

En la operación de un reactor discontinuo secuencial (SBR), solamente las partículas que sedimentan en un tiempo menor al de sedimentación son retenidas en el reactor, mientras que las que tienen una pobre sedimentación son lavadas fuera del reactor. De acuerdo con la teoría de la evolución biológica, esta separación física es considerada como una presión selectiva para la biomasa del reactor, y solamente aquellos microorganismos que se adaptan a ese cambio (los que llegan a ser grandes y densos para sedimentar rápido) pueden permanecer en el reactor y sobrevivir.

Tay *et al.*, (2002b) estudiaron la granulación de bacterias nitrificantes a diferente presión de selección y concluyen que es necesario aplicar grandes fuerzas de selección para llevar a cabo la granulación, la presión de selección se facilita mediante la configuración del reactor y el volumen de intercambio. Las fases de sedimentación y vaciado, actúan como un medio de separación, la cual obliga a los microorganismos a responder con cambios adaptativos para evitar ser desalojados del reactor.

1.2.2.2 Sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y la estabilidad granular

Los microorganismos sometidos a una alta fuerza hidrodinámica de corte, se adhieren entre sí por la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) para resistir el daño causado por estas fuerzas y por otras células suspendidas (Liu *et al.*, 2004). Los EPS secretados por las bacterias están constituidos en su mayor parte de proteínas, polisacáridos, ácidos húmicos y lípidos que ayudan a la adhesión celular y que facilitan el inicio del proceso de la granulación aerobia. La acumulación de EPS es responsable de la integridad y estabilidad de los gránulos aerobios (Tay *et al.*, 2004b).

Uno de los más serios obstáculos para la aplicación práctica del lodo granular aerobio es la pérdida de estabilidad de los gránulos a largo plazo, siguiendo dos diferentes vías: rompimiento del gránulo o crecimiento de microorganismos filamentosos, cuando los gránulos se rompen se generan trozos que son lavados del reactor con el vaciado y cuando proliferan los microorganismos filamentosos, los gránulos se

vuelven ligeros y abultados, que pueden ser lavados del reactor ocasionando además el taponamiento de tuberías y equipos. Chen *et al.* (2007) estudiaron mediante técnicas de microscopía láser confocal de barrido (CLMS) la distribución de EPS en gránulos aerobios alimentados con fenol. Reportan que los β -polisacáridos forman el núcleo y que se ramifican formando una especie de esqueleto que soporta la estructura del gránulo, mientras que células vivas, proteínas y α -polisacáridos se acumulan en las capas exteriores conjuntamente con algunos lípidos.

La cubierta de EPS desde el punto de vista fisicoquímico se puede considerar como un polielectrolito absorbido en una partícula coloidal, que puede alterar las características fisicoquímicas de la superficie celular, como la carga, la hidrofobicidad y otras propiedades de las bacterias que son importantes para los procesos de floculación, adhesión y granulación de la biomasa. Wang *et al.*, (2009) encontraron que bajo el impacto de una alimentación intermitente, se promueve la producción de EPS principalmente en la fase exponencial de crecimiento y que sirven como reserva de carbono durante la fase de poca alimentación, con los EPS se acelera la agregación de las bacterias, se ha reportado que el contenido de EPS en gránulos es de 2 a 3 veces mayor que en lodos floculentos por lo que con la generación de EPS se promueve la granulación aerobia (Tay *et al.*, 2001b).

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), los productos microbianos solubles (PMS) y los polímeros intracelulares de almacenamiento (XSTO), son importantes depositarios de electrones y carbono del sustrato original. De acuerdo con Sutherland *et al.*, (2001), los genes para las enzimas polisacárido liasas, que son las enzimas que permiten la disolución de las EPS, están asociados con la biosíntesis de los exopolisacáridos, ellos observaron que las células producen las liasas continuamente mientras los polisacáridos son sintetizados, evitando tener contacto con los polisacáridos formados y cuando la célula permite una pasiva secreción de estas liasas, causa entonces una disolución estable de la matriz de exopolímeros, en una serie de eventos asistidos por las fuerzas de corte hidrodinámicas, todo esto como una respuesta a los cambios ambientales (Tay *et al.*, 2001, 2005).

Davies *et al.*, 1998, quienes estudiaron la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, identificaron que el alginato es un polisacárido extracelular importante, involucrado en la formación de biopelículas, cuando se activa la producción de la alginato-liasa, la biocapa de alginato se rompe, liberando fragmentos de ésta. Se menciona que existen dos posibles mecanismos iniciadores que pueden mediar en la liberación de la alginato-liasa, uno es el exceso de productos de desecho, como la acumulación del CO₂ o de ácidos orgánicos que afectan al pH, o la falta de nutrientes en el ambiente y otro posible mecanismo es la regulación debida a la densidad celular, así en los casos de alta densidad celular y estancamiento, la concentración de homoserina lactona (HSL) se incrementa y puede acumularse hasta niveles suficientemente altos como para activar los genes dependientes de la densidad celular.

Adav *et al.*, 2008b, mediante la hidrólisis selectiva de EPS, encontraron que el componente principal y responsable de la estabilidad de lodos granulares, alimentados con fenol, son los β -polisacáridos, los cuales forman una continua e integral estructura que sostiene el suave núcleo de los gránulos sin evidencia de algún tipo de coraza, al hidrolizarse los gránulos con β -amilasa, se parten en pequeños pedazos $< 10 \mu\text{m}$ y algunos largos $>80 \mu\text{m}$ que contienen proteínas, lípidos y α -polisacáridos concentrados provenientes de las capas exteriores del gránulo, por lo que los β -polisacáridos conforman una estructura que a manera de red contiene a las capas exteriores de proteínas, lípidos, polisacáridos y células dándole estabilidad y soporte mecánico.

1.2.2.3 Régimen de alimentación

Entre las condiciones aplicadas para llevar a cabo el proceso de granulación se requiere tener periodos cortos de alimentación, conocido como régimen abundancia-escasez (Campos *et al.*, 2009) en el cual se tienen periodos de mayor cantidad de materia orgánica en el reactor y otro periodo más largo de carencia de alimento. Durante el periodo de abundancia, los microorganismos transforman la materia orgánica y la almacenan en el interior de la célula en forma de glicógeno, lípidos o Poli- β -hidroxilcanoatos (PHA) que reutilizarán durante el periodo de carencia (Van Loosdrecht *et al.*, 1995), de acuerdo a las condiciones ambientales, es la forma en que la célula decide almacenar los nutrientes que puede ser en forma de PHAs o de EPS.

1.2.3 Modelado del proceso de granulación

La teoría propuesta por Tay *et al.*, (2001), enlista las posibles fuerzas que corresponden al proceso de granulación, los modelos mecanísticos describen como actúan realmente esas fuerzas. Un modelo matemático desarrollado por Ni *et al.*, (2010) describe el crecimiento simultáneo de microorganismos autótrofos y heterótrofos en reactores discontinuos secuenciales (SBR) con gránulos aerobios, asumiendo que los heterótrofos se localizan en la parte externa y los autótrofos en la parte del núcleo, ese modelo predice que los heterótrofos cuentan con mayor disponibilidad de oxígeno para su consumo que los autótrofos. De Kreuk *et al.* (2007b) proponen un modelo matemático para un reactor de lodos granulares aerobios que remueve de manera simultánea DQO, nitrógeno y fósforo, operado en modo SBR. Ese modelo describe particularmente la penetración del oxígeno dentro del gránulo y la tasa de nutrientes que corresponde a la biomasa anóxica y a la anaerobia. Xavier *et al* (2007) propusieron un modelo multiescala para un reactor de lodo aerobio granular en un reactor SBR considerando un arreglo espacial bidimensional para cuatro grupos bacterianos, heterótrofos, amonio-oxidantes, nitrito-oxidantes y microorganismos acumuladores de fosfato (PAO). Las simulaciones integran en sí los procesos de bioconversión con la dinámica a corto y a largo plazo de operación, en conjunto con las dinámicas del metabolismo microbiano.

1.2.4 Fuente de Carbono usada para cultivar lodo granular

Los gránulos aerobios han sido cultivados exitosamente en distintos tipos de agua residual, ya sea industrial o sintética (Thanh *et al.*, 2008), la comunidad bacteriana encontrada en estos estudios depende del tipo de alimentación, varios autores mencionan que los gránulos alimentados con glucosa están conformados en su mayoría microorganismos filamentosos, a diferencia de aquellos que son alimentados con acetato de sodio los cuales contienen principalmente microorganismos con forma de bacilos, dependiendo del tipo de alimentación es el tiempo de la granulación y el tamaño que llegan a alcanzar los gránulos (Eterer y Wilderer, 2001).

En las tablas 1.2 y 1.3 se pueden observar las características de los gránulos obtenidos con distinto tipo de sustrato, se encuentran desde los fácilmente biodegradables, como son la glucosa y el acetato, hasta los compuestos aromáticos y aguas industriales.

Tabla 1.2 Características de gránulos aerobios (Modificado de Thanh *et al.*, 2008)

| Fuente de carbono | CM (kg/m ³ .d) | Tiempo de Formación (días) | Diámetro del gránulo (mm) | IVL (mL/g) | Vs (m/h) | Biomasa sedimentada (gSS/L, gránulo) | SSV (g/L) | Referencia |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|---------------|-------------|--|--------------|-----------------------------------|
| Acetato | 2.3 | 50 | 1 | | 24 | 11.9 | - | Beun <i>et al.</i> , 1999 |
| Acetato | 2.5 | > 63 | 2.5 | - | > 10 | 60 | 7-10 | Beun <i>et al.</i> , 2002 |
| Acetato | - | 28 | 0.25-0.32 | - | - | - | - | Yang <i>et al.</i> , 2004 |
| Acetato | 6 | 21 | 0.33 -0.39 | 46-62 | - | 40-60 | - | Tay <i>et al.</i> , 2004b |
| Acetato | 1.2 - 1.6 | 48 | 1.2 | 12-15 | - | - | - | De Kreuk <i>et al.</i> , 2005 |
| Acetato | 1.5 | 20 | 2-3 | 80 | | | 4-4.5 | Dacong <i>et al.</i> , 1999 |
| Acetato | 3.0 | 27 | 0.55-0.75 | 40 | - | - | 6 | Liu et al, 2006 |
| Glucosa | 2.5 | 50 | 1-1.3 | 80 | | | | Jang <i>et al.</i> , 2003 |
| Ind. cebada | 3.4 | 28 | 2-4 | 30-40 | - | - | - | Schwazenbeck <i>et al.</i> , 2004 |
| Ind. de bebidas | 3.5 | 41 | 2-7 | 32 | 91 | - | 8-11 | Wang <i>et al.</i> , 2007 |
| Agua sanitaria | 7 | 60 | 0.25-4 | 60 | - | 10-15 | - | Arrojo <i>et al.</i> , 2004 |
| Glucosa y Acetato | 1.7-2.8 | 51 | 0.35 | 83 | - | - | 9.5 | Kim <i>et al.</i> , 2008 |
| Glucosa y peptona | 2.4 | 120 | - | 46-114 | - | - | - | McSwain <i>et al.</i> , 2004 |
| Glucosa, Acetato y peptona | 3.6 | 56 | 1.1-6.5 | - | 35 | - | - | Etterer y Wilderer, 2001 |
| Azúcares | 2.9 | 40 | 2.35 | - | - | - | - | Morgenroth <i>et al.</i> , 1997 |
| Acetato/4-Clorofenol | 4/0.2 | 14 | 1-4 | 81.6 | 10 | 3.21 | 3.0 | Carucci <i>et al.</i> , 2009 |
| Fenol | < 2.5 | - | - | 40-65 | - | | - | Jiang <i>et al.</i> , 2004 |
| Fenol | 20 mg/L | 21 | 0.53-0.67 | 19-25 | - | - | - | Liu <i>et al.</i> , 2005b |
| Agua de rastro | 2.6 | 4 | 1.7 | 22 | 51 | 62 | 8 | Cassidy y Belia, 2005 |
| Nitrofenol | 0.256 | 25 | | | | | | Chen <i>et al.</i> , 2009 |
| Glucosa/2,4,diclorofenol | | 23 | 1-2 | | 6 | 4.7 | | Wang <i>et al.</i> , 2007 |
| Alcohol terbutílico | 0.6 | 90 | 0.32 | 57 | - | - | 4.54 | Zhuang <i>et al.</i> , 2005 |

Tabla 1.3 Desempeño del tratamiento con lodos granulares (Modificado de Thanh *et al.*, 2008)

| Fuentes | OLR (kg/m ³ d) | NLR (kg/m ³ d) | TRH (h) | TRS (d) | v (cm/s) | Remoción DQO (%) | Remoción NTK (%) | N-NH ₄ efluente (mg/L) | N-NO ₂ efluente (mg/L) | N-NO ₃ efluente | SSV (g/L)a | SSV ef. (mg/L)b | Referencia |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------|---------|------------|----------|---------------------|---------------------|---|---|-------------------------------|---------------|--------------------|--------------------------------------|
| Acetato/AC | 1.2 - 1.6 | 69 mg/L | 5.6-7.4 | - | 2.02 | - | 44-75 | - | - | - | 18-20 | - | de Kreuk <i>et al.</i> , 2005 |
| Ind. cebada | 3.4 | - | 12 | - | 0.5-0.7 | 50-80 | - | - | - | - | - | - | Swarzenbeck <i>et al.</i> , 2004 |
| Ind. bebidas | 3.5 | 0.24 | - | - | 1.77 | 88.7 | 88.9 | 14.4 | - | 50 | 10-11 | - | Wang <i>et al.</i> , 2007 |
| Agua sanitaria | 7 | 0.7 | - | - | - | 80 | 70 | 20-30 | - | 15-18 | 5-6 | 50-800 | Arrojo <i>et al.</i> , 2004 |
| Glucosa, acetato/AS | 2.5 | 0.12 | - | 15 | 0.42 | 95 | 97 | < 1 | - | - | 4-5 | - | Jang <i>et al.</i> 2003 |
| Glucosa, acetato/AS | 1.76-2.84 | 0.10-0.16 | - | - | - | 93-98 | 47-99 | 1-29 | 0.1-13 | 2.3-10 | 7.7-9.5 | - | Kim <i>et al.</i> , 2008 |
| Glucosa y peptona | 2.4 | - | - | - | - | 96 | - | - | -- | - | 3.2-9.0 | 170-290 | McSwain <i>et al.</i> , 2004 |
| Glucosa, acetato, /peptona | 3.6 | - | - | 10 | - | 93 | 99 | - | < 0.23 0.02 | - | - | - | Etterer y wilderer., 2001 |
| Fenol | 1.0-2.5 | - | 8 | - | 2.97 | > 96 | - | - | -- | - | 5.5-8.5 | - | Jiang <i>et al.</i> , 2004 |
| Agua de rastro | 2.6 | - | - | 20 | 1.57 | 98 | 97 | 2 | 0 | 26 | 8 | 42 | Cassidy y Belia., 2005 |
| AS | - | 0.13-1.50 | 7.6-120 | - | 0.85 | - | > 90 | < 10-40 | - | <400< 500 | - | - | Tsuneda <i>et al.</i> , 2003 |
| Etanol/AC | 1.5 | 0.08-0.45 | 7.7 | - | 0.5-2.4 | > 95 | 100 | - | -- | - | 9 | - | Yang <i>et al.</i> , 2003 |
| Acetato/AC | 1.6 | 0.2 | 5.8 | 25 | 2.52 | - | 8-45 | 0.13-0.70 | 0.04- 3.90 | 0.13-22 | 5 | < 120 | Mosquera-Corral <i>et al.</i> , 2005 |

Note: a,b valores en () MLSS; WW: Agua residual; AC: Cloruro de Amonio; AS: Sulfato de amonio; v: vel superficial de aire; N: nitrógeno

1.2.5 Degradación de compuestos tóxicos

Los gránulos aerobios han resultado eficaces para la remoción de una gran variedad de compuestos tóxicos como son el fenol (Liu *et al.*, 2005b, Jiang *et al.*, 2002), acetonitrilo, cresol, nitrofenol (Yi *et al.*, 2006), 2-clorofenol, 4-clorofenol (Carucci *et al.*, 2009), 2,4-diclorofenol (Wang *et al.*, 2007, Khan *et al.*, 2011), triclorofenol (Carucci *et al.*, 2008), pentaclorofenol (Chen *et al.*, 2009), 2-fluorofenol (Duque *et al.*, 2011), ácido nitrilotriacético (Nanchariath *et al.*, 2006), etc., los resultados dependen del tipo de inóculo, la estrategia de aclimatación y la operación del reactor. Los gránulos aclimatados, tienen una mejor resistencia a altas concentraciones de los compuestos tóxicos que la biomasa dispersa o floculenta, se atribuye esto al efecto de protección de la matriz exopolimérica en que se encuentran inmersos los microorganismos (Jiang *et al.*, 2010), a su estructura compacta, a los cambios metabólicos, intercambio genético y otros muchos factores asociados a la formación de biopelículas (Maszenan *et al.*, 2011).

Ho *et al.*, (2010) reportan que la tasa máxima de degradación en la cinética con gránulos aerobios es de 3.8 g de fenol/gSSV/día a una concentración de 1 g/L, mientras que para lodos floculentos es de 0.770 g de fenol/gSSV/día a una concentración de 0.5 g/L, comportamiento contrario se ha reportado para la biomasa no aclimatada a la degradación de compuestos inhibitorios, ya que Liu *et al.*, 2009b reportan una menor actividad en gránulos expuestos al fenol que en lodos floculentos, sin embargo los gránulos son menos sensibles a inhibirse proporcionalmente en cuanto mayor es el tamaño del gránulo, esto se debe según los autores a la resistencia difusional y al efecto de protección de matriz.

Los compuestos fenólicos clorados como son los monoclorofenoles, se pueden encontrar en grandes concentraciones en los efluentes de las industrias petroquímicas, farmacéuticas, y madereras (Carucci *et al.*, 2010, Olmos *et al.*, 2004), de manera que el 4-clorofenol se ha utilizado como un compuesto modelo con el propósito de estudiar la aclimatación de microorganismos para la degradación de compuestos inhibitorios (Buitrón *et al.*, 2003). Los reactores SBR han resultado apropiados para la granulación aerobia (de Kreuk *et al.*, 2004) y ha sido demostrado que la agregación de los microorganismos protege a la comunidad microbiana de altas concentraciones de compuestos tóxicos (Jiang *et al.*, 2002). Por esta razón, combinar los SBR con la formación de gránulos aerobios es una tecnología prometedora para el tratamiento de aguas residuales industriales altamente tóxicas (Adav *et al.*, 2007, 2009).

Como principal ruta de degradación de los compuestos fenólicos por parte de los gránulos aerobios se encuentra la vía de deshalogenación selectiva del clorocatecol y la ruptura del anillo aromático como se muestra en la Figura 1.8, debido a que en condiciones limitadas de oxígeno se observa la presencia del metabolito 3-cloro-2-hidroxiácido mucónico semialdehído (Carucci *et al.*, 2009).

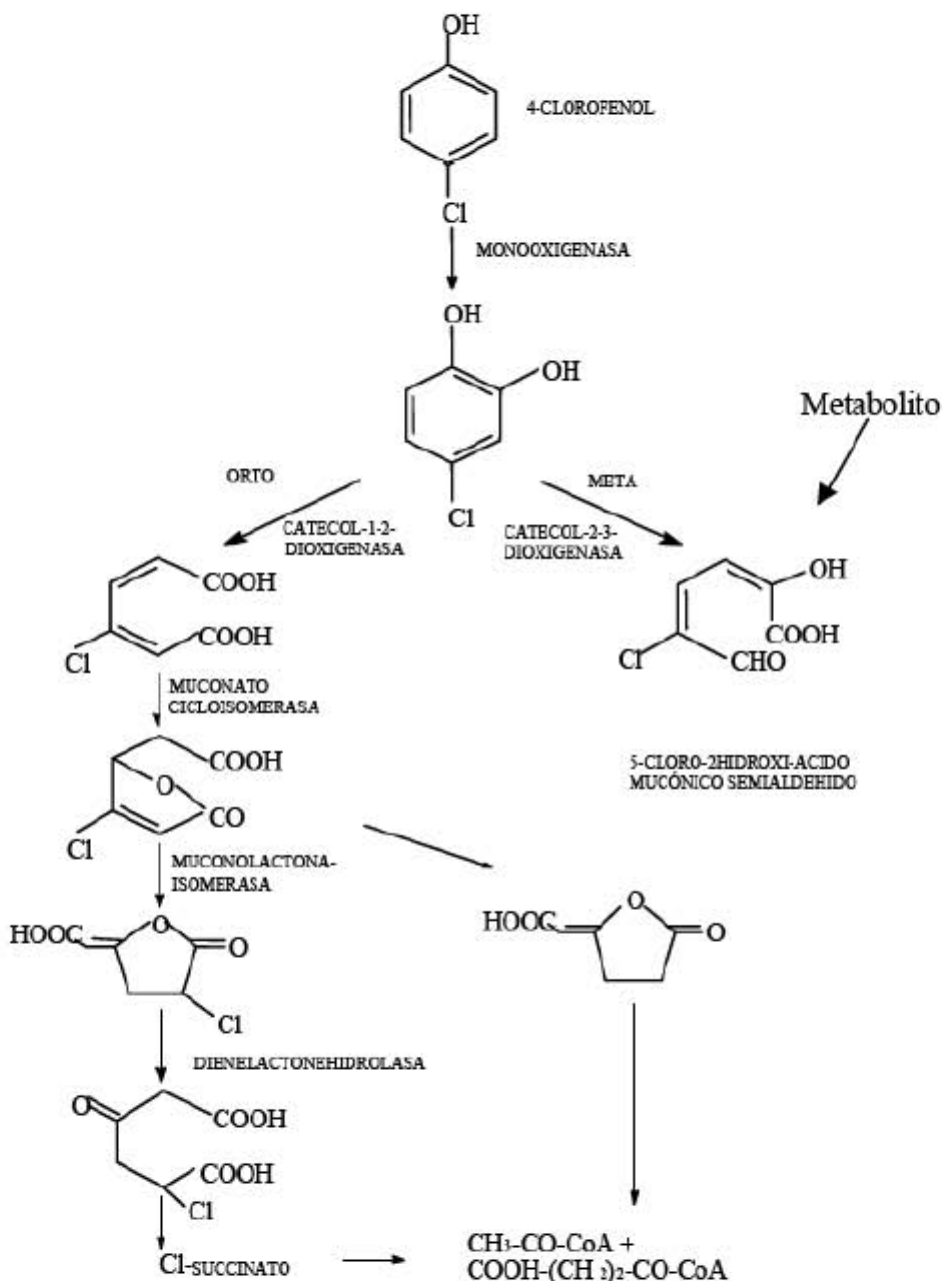


Figura 1.8 Ruta de degradación del 4CP por vía aerobia: (a) 4CP, (b) 4-clorocatecol, (c) 5-cloro-2-hidroximuconico semialdehido (Bali y Sengül, 2002).

1.2.6 Condiciones hidrodinámicas para la formación de gránulos

De acuerdo con varios investigadores, para que la granulación se lleve a cabo, se requiere de un mínimo de velocidad superficial de aireación, Tay *et al.*, (2001) reportaron que a una velocidad de 0.008 m/s no había formación de gránulos, en cambio a una velocidad de 0.012 m/s sí se formaron, por lo que determinaron que para la formación de gránulos la velocidad superficial mínima debe de ser de 0.012 m/s. El efecto de la velocidad superficial sobre los microorganismos consiste en que a mayor aireación se generan fuerzas de corte hidrodinámicas debido a la turbulencia en la agitación, lo que provoca estrés en los microorganismos y como respuesta adaptativa, comienzan a alterar sus funciones metabólicas predisponiéndose a formar una biopelícula.

La formación de gránulos aerobios se ha reportado principalmente en reactores discontinuos secuenciales (SBR) debido a la facilidad para ejercer una presión selectiva mediante tiempos cortos de sedimentación (Quin *et al.*, 2004), volumen de intercambio y en velocidad de vaciado (Wang *et al.*, 2004). Todos estos factores se pueden resumir en la velocidad de sedimentación buscada de los lodos (Liu *et al.*, 2005). En la Figura 1.9 se observa cómo se relaciona el tiempo de descarga T_d con el tiempo de sedimentación T_s , entre la línea roja y la azul está la condición adecuada de la velocidad de sedimentación V_s para que se realice la granulación.

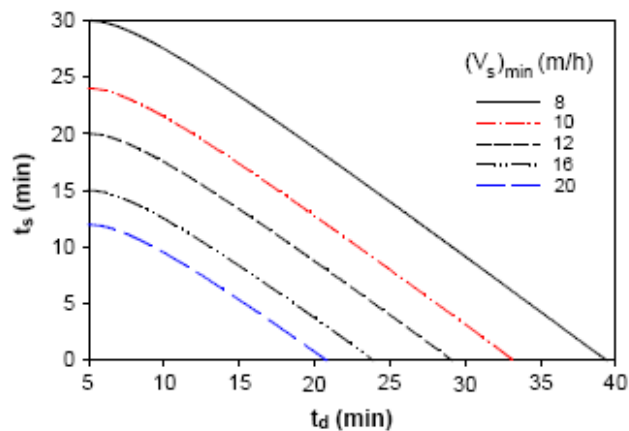


Figura 1.9 Relación entre el tiempo de descarga y el tiempo de sedimentación con la velocidad de sedimentación $(V_s)_{min}$. (Liu *et al.*, 2005).

1.3 Consideraciones para el diseño y operación de reactores de membranas sumergidas con lodos granulares

El primer reporte de operación de un reactor MBR con lodos granulares fue en 2005, cuando Li *et al.*, compararon el comportamiento de la filtración con lodos floculentos y con lodos granulares, desde entonces en su aplicación se han utilizado distintas configuraciones de biorreactores tanto los que manejan un módulo de filtración externo y los que tienen la membrana dentro del mismo reactor biológico, ambas configuraciones se han probado y presentan tanto ventajas como desventajas, como se muestra a continuación.

1.3.1 Biorreactores con membranas externas

Tienen como ventaja un menor costo de aireación, ya que el módulo puede servir como unidad de sedimentación (Figura 1.10) (Thanh *et al.*, 2008) además de que se puede mantener un funcionamiento independiente del reactor de lodos granulares y el módulo de filtración actúa a la manera de un tratamiento terciario (Sánchez *et al.*, 2010), tienen la desventaja de que ocupa un mayor espacio y requiere bombeo extra para la recirculación.

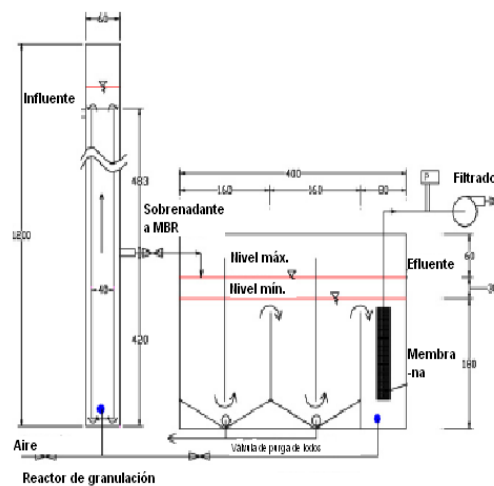


Figura 1.10 Reactor de membrana sumergida con módulo externo, utilizado por Thanh *et al.*, 2008.

1.3.2 Biorreactores con membranas sumergidas internas

Son los más ampliamente utilizados (Wang *et al.*, 2008, 2010, 2012) ya que tienen la ventaja de que con el módulo sumergido en el mismo reactor, no se requiere otra unidad (Figura 1.11), tampoco bombeo adicional al del permeado y aunque se colmatan más fácilmente que los de módulo externo

(Visvanathan *et al.*, 2000), la colmatación se considera reversible debido a la formación de una torta de lodo, sin embargo, tienen como desventaja una menor capacidad de filtración ya que el flux es afectado directamente por la operación del reactor biológico. En el caso de los lodos granulares, existe dificultad para mantener la presión de selección necesaria para la formación de los gránulos (Liu *et al.*, 2005), por lo que se puede requerir una purga del reactor en un intervalo de tiempo. Esto trae como consecuencia se generan dos efluentes uno de buena calidad, que corresponde al permeado y otro de baja calidad, el de la purga (Tay *et al.*, 2007). Los principales problemas que reportan quienes han trabajado con ese tipo de configuración son: problemas de crecimiento de microorganismos filamentosos y rompimiento de los gránulos (Li *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2008).

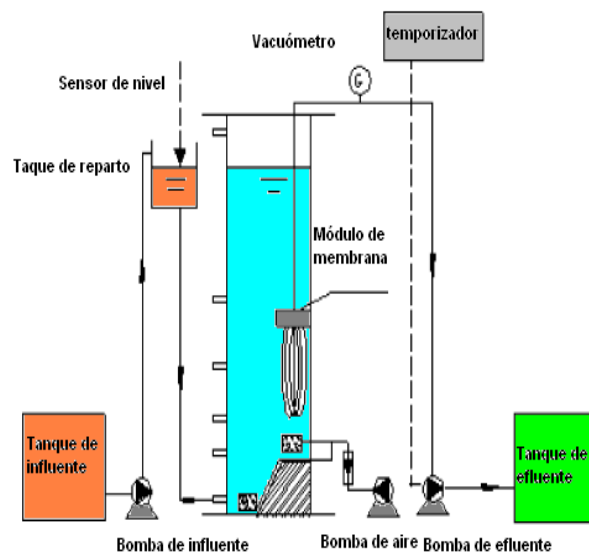


Figura 1.11 Biorreactor con membrana de fibra hueca sumergida (modificado de Wang *et al.*, 2008).

1.3.2.1 Dimensiones del reactor

La geometría del reactor es importante para mantener las condiciones hidráulicas para la granulación, ya que se ha reportado que es necesaria una velocidad superficial mínima del gas de 1.2 cm/s (Tay *et al.*, 2001), para que suministre un esfuerzo hidrodinámico de corte (Chen *et al.*, 2008), que tiene además un efecto positivo en el desprendimiento de la biotorta generada en la superficie de la membrana, por lo tanto para mantener una buena velocidad superficial utilizando menos aire, es preferible que el área transversal sea reducida, sin embargo, se ha podido trabajar con relaciones H/D de hasta 4 sin problema para la granulación (Kong *et al.*, 2009), respecto al volumen, se han utilizado reactores piloto de laboratorio de hasta 60 L (Tu *et al.*, 2010), hasta ahora no se han reportado investigaciones realizadas a mayor escala.

1.3.3 Tipo de membrana utilizada

El tipo de membranas más utilizado son las de fibra hueca debido a las ventajas que presentan, son compactas, fáciles de manejar, retrolavables y toleran una mayor cantidad de sustancias coloidales y por el movimiento que tienen durante la aireación retardan la formación de la biotorta. Sin embargo, al trabajar con lodos granulares se ha reportado que los gránulos se quedan atrapados entre las fibras, ocasionando una acumulación de biomasa en el módulo de filtración (Thanh *et al.*, 2010) y crecimientos de biopelícula interna (Wang *et al.*, 2009b). También se han utilizado módulos de membranas planas, que tienen la desventaja de ser menos resistentes a los retrolavados (Thanh *et al.*, 2008) y proporcionan una menor área que las tubulares y las de fibra hueca. Recientemente se han utilizado materiales de bajo costo para la filtración en ese tipo de procesos; aprovechando el tamaño de partícula, así se ha utilizado malla de nylon de 0.07 mm (Li *et al.*, 2012) y de 0.1 mm (Liu *et al.*, 2012c) para formar membranas dinámicas manteniendo buenas condiciones de filtración.

1.3.4 Condiciones biológicas de operación del biorreactor

1.3.4.1 La fuente de carbono

En todo proceso biológico, la condición más importante es la alimentación, particularmente la fuente de carbono. Durante el proceso de granulación de lodos activados, la conformación de los gránulos depende del tipo de alimento, así en los reactores alimentados con glucosa, en los gránulos predominan las bacterias filamentosas, mientras que en los que son alimentados con acetato de sodio, predominan los microorganismos con forma de bacilo (Liu *et al.*, 2002), por esto algunos investigadores han optado por hacer combinaciones de ambos alimentos (Juang *et al.*, 2009; Thanh *et al.*, 2010) también se ha reportado que hay relación entre el tamaño del gránulo y la toxicidad del alimento, ya que cuando los gránulos son alimentados con compuestos tóxicos, por ejemplo con fenol (Ho *et al.*, 2010), el diámetro obtenido es hasta cuatro veces más pequeño que cuando el alimento es fácilmente biodegradable (Juang *et al.*, 2008), éste autor es el único que ha reportado la operación de un reactor de gránulos con membranas alimentado con fenol (Tabla 1.4); esto debido probablemente a la resistencia difusional.

1.3.4.2 Estrategia de alimentación

Aunque en un inicio la granulación aerobia se llevó a cabo en reactores de alimentación continua o semicontinua (Mishima y Nacamura *al.*, 1991, Tijhuis *et al.*, 1994), en seguida se utilizaron preferentemente los reactores discontinuos secuenciales SBR (Morgenroth *et al.*, 1997, Beun *et al.*,

1999), por ser su operación simple y la rapidez con la que se forman los gránulos, debido a que manejan un periodo corto de abundancia de alimento y un periodo de ayuno prolongado, hacen que los microorganismos acumulen materia orgánica en forma de polihidroxialcanoatos (PHA) (van Loosdrecht *et al.*, 1997) y favorecen la selección de microorganismos formadores de flóculos densos en vez de los filamentosos (McSwain *et al.*, 2004), además, la estrategia de alimentación en conjunto con la alta actividad del inoculo influyen positivamente en la capacidad de los microorganismos para aclimatarse a los contaminantes tóxicos (Jiang *et al.*, 2002, Nanchariath *et al.*, 2006, Moreno y Buitrón, 2004).

Con la implementación de la membrana, se ha podido modificar la manera de operación de los reactores con gránulos aerobios, pasando de una manera discontinua a una forma de operación continua. Juang *et al.*, (2010), reportan 210 días de operación de forma continua con gránulos formados a partir de biomasa granular anaerobia, así mismo, Liu *et al.*, (2012c) reportan la obtención de gránulos estables en un proceso operado en continuo con una malla de 0.1 mm de abertura para formar una membrana dinámica.

1.3.4.3 Carga orgánica

El proceso de formación de los gránulos se ve afectado por la cantidad de alimento que se suministra, se ha reportado que en un SBR alimentado con acetato de sodio, cuando se trabaja a cargas menores a 1 kgDQO/m³/d predomina el lodo floculento, y que a cargas mayores de 8 kgDQO/m³/d los gránulos tienden a desintegrarse (Tay *et al.*, 2003), aunque bajo las condiciones de operación adecuadas, se han logrado operar procesos hasta con una carga de 16.7 kg DQO/m³/d (Juang *et al.*, 2009). También se ha observado el crecimiento de microorganismos filamentosos en gránulos alimentados con baja carga orgánica (Li *et al.*, 2010). Cuando se trabaja con compuestos tóxicos se debe tener el cuidado de no sobrepasar la capacidad de amortiguamiento del proceso.

1.3.4.4 Nitrógeno

Los gránulos aerobios tienen una alta capacidad para la remoción de nitrógeno mediante la nitrificación y la desnitrificación simultánea (Wang *et al.*, 2008), ya que al tener un gradiente de penetración de oxígeno, se considera que tienen una parte anóxica en su interior de manera que se han llegado a tener remociones de hasta 1.5 kgN/m³·d, (Tsuneda *et al.*, 2006). La remoción se incrementa al implementar una fase anóxica con agitación mecánica durante el periodo de alimentación, en algunos experimentos, el utilizar nitrógeno gas para mantener la agitación mejora la estabilidad de los gránulos (Thanh *et al.*, 2010). La abundancia de nitrógeno amoniacal puede afectar la granulación, se ha reportado en algunas investigaciones que a concentraciones mayores a

23 mg/L inhiben la nitrificación, la hidrofobicidad celular y la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Yang *et al.*, 2004).

Uno de los parámetros que pueden afectar a la formación de gránulos aerobios es el contenido de nitrógeno, particularmente el nitrógeno amoniacal. Se ha reportado que los agregados microbianos obtenidos una relación alta de C/N tienen una mayor cohesión que los cultivados a una relación baja (Burdman *et al.*, 1998). Yang *et al.*, (2005), publicaron que los gránulos aerobios cultivados utilizando etanol como única fuente de carbono a una relación demanda química de oxígeno/nitrógeno (DQO/N) de 100/5, tienen diámetros 4 veces mayor a los cultivados con una relación DQO/N de 100/30 (0.5 mm, diámetro). La condición de estrés inducida por la limitación de nitrógeno, promueve el incremento de la producción de polisacáridos (Young *et al.*, 2011) lo cual es favorable para la granulación. Por esta razón, más allá que la degradación de materia orgánica o la producción de biomasa, la limitación de nitrógeno puede ser recomendable durante la etapa de granulación.

Actualmente, final de la revisión bibliográfica de la investigación, no se han encontrados reportes donde se explique cual es el efecto de la relación DQO/N a la formación de gránulos aerobios, con la presencia de compuestos inhibitorios en el agua residual, tampoco como afecta a la formación de gránulos la limitación extrema de nitrógeno.

1.3.4.5 Tiempo de retención de sólidos

Liu *et al.*, 2006 reportaron que los tiempos de retención de sólidos mayores a 10 días favorecen la formación de microorganismos filamentosos, los cuales hacen que los gránulos se vuelvan suaves y ligeros y que finalmente se desintegren. En los biorreactores con membranas sumergidas se aumenta la retención de biomasa con ello el tiempo de retención de sólidos, pudiendo mantener tiempos de retención de hasta 60 días (Li *et al.*, 2007), de forma que se puede favorecer la estabilidad de los gránulos mediante la selección de microorganismos de lento crecimiento (de Kreuk *et al.*, 2004), con la ventaja adicional de propiciar una baja producción de lodos en exceso.

1.3.4.6 Sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en procesos de lodos granulares aerobios con membranas sumergidas

Los productos microbianos solubles y las sustancias poliméricas extracelulares son considerados los principales causantes de la colmatación irreversible (Drews, *et al.*, 2007). Debido a la importancia que tienen se ha estudiado el contenido de estos compuestos durante el proceso de granulación (Quin *et al.*, 2004) y en el acoplamiento con membranas sumergidas con lodos granulares. Los EPS

se consideran de dos tipos: EPS libres, que se encuentran en la fase líquida del licor mezclado y EPS ligados (Gong *et al.*, 2009), que se encuentran en los límites de las células, ambos se constituyen principalmente de proteínas, polisacáridos y sustancias húmicas (Ng *et al.*, 2005, McSwain *et al.*, 2005). Los resultados publicados sobre ese tipo de sustancias han sido contradictorios, mientras que Tay *et al.*, 2001b encuentran que la cantidad de EPS en los lodos granulares son de 2 a 3 veces más que en los lodos floculentos, Wang *et al.*, 2010, encuentran que los EPS en los lodos floculentos son 1.28-1.51 mayores que en los lodos granulares, haciéndose mayor la diferencia conforme se incrementa el diámetro del gránulo. Tu *et al.*, 2010 también encuentran que los EPS aumentan ligeramente después que ha tenido lugar la granulación. La diferencia en los resultados en cuanto al contenido de sustancias poliméricas extracelulares se deben en gran medida a la variedad de métodos que se tienen para la extracción y a la dificultad que esto representa, incluso aún no se ha establecido una definición clara para diferenciar entre las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y los productos microbianos solubles (PMS) que de acuerdo con Lapidou y Rittman (2002), estos son los EPS libres una vez que se han hidrolizado en el medio acuoso, juntamente con otros productos del metabolismo y la lisis celular.

1.3.4.7 La formación de biopolímeros agregados (BPA)

Recientemente algunos investigadores (Sun *et al.*, 2011), han considerado el efecto de los llamados biopolímeros agrupados (BPA) en la colmatación en biorreactores de membranas sumergidas, los cuales se forman a partir de la unión de productos microbianos solubles con algunas sustancias poliméricas extracelulares y que llegan a tener tamaños superiores a 10 μm , y sugieren que facilitan la formación de una película de biopolímeros en la superficie de las membranas (Sun *et al.*, 2008), aún no se ha evaluado el efecto de los BPA en los procesos de membranas con lodos granulares.

1.3.5 Condiciones fisicoquímicas de operación

1.3.5.1 Propiedades fisicoquímicas de la biomasa

Entre las propiedades fisicoquímicas que influyen el proceso de filtración, está la estabilidad mecánica de los gránulos, que se relaciona con la densidad, la forma de la superficie, tamaño y rigidez (Liu *et al.*, 2009), que a su vez son directamente el resultado de las condiciones de operación del reactor. Otro conjunto de propiedades son las reológicas que como la viscosidad dependen directamente de la concentración de sólidos suspendidos, pH, temperatura, diámetro, velocidad de sedimentación, peso específico, Índice volumétrico de lodos (IVL), parámetros que se ven favorecidos con la granulación de la biomasa (Thanh *et al.*, 2008).

1.3.5.2 Condiciones de operación

Para evitar la colmatación en los biorreactores de membranas sumergidas se han desarrollado distintas estrategias de operación como es la filtración intermitente, en donde se opera un periodo de tiempo (ON), que va de 10 a 15 minutos y se deja de filtrar otro tiempo (OFF) que es de 3 a 5 minutos, lo cual permite una relajación de la membrana ayudando al desprendimiento de la biotorta que se haya depositado durante la operación, para esto juega un papel importante la intensidad de la aireación (Wang *et al.*, 2008). Otra estrategia para mitigar la colmatación reversible es el retrolavado, el cual puede ser de aire o del mismo permeado, consiste en cambiar el sentido del bombeo que normalmente es de succión al de presión. Los retrolavados son eficientes incluso para desbloquear poros, se pueden establecer a un determinado tiempo fijo, sin embargo se ha encontrado una mayor eficiencia en los MBR al establecer los retrolavados en función de la pérdida de caudal (Vargas *et al.*, 2008).

La colmatación irreversible sólo se puede remover mediante la limpieza química, que generalmente se hace retirando la membrana y sumergiéndola en una solución de NaOH con NaOCl y después en una de ácido cítrico o ácido oxálico, con sus correspondientes enjuagues (Le-Clech *et al.*, 2006).

1.3.5.3 Inestabilidad de los gránulos

Se ha observado que la pérdida de estabilidad de los gránulos en los reactores con membranas, al igual que en los SBR, se debe principalmente a: a) crecimiento de microorganismos filamentosos en la superficie de los gránulos (Li *et al.*, 2005, 2007), esto causa que los gránulos se vuelvan esponjosos y floten en el reactor, generalmente ese efecto está relacionado con una deficiencia de oxígeno disuelto o de nutrientes, b) la hidrólisis del núcleo del gránulo (Wang *et al.*, 2012), se lleva a cabo cuando se tiene una baja transferencia de nutrientes y oxígeno al núcleo del gránulo, de manera que se estimula la actividad anaerobia causando la desintegración de los gránulos, c) la pérdida de resistencia (Tay *et al.*, 2007), generalmente se debe a que la granulación no se llegó a completar o a la carencia de algún nutriente como Ca, Mg o fosfato, d) Proliferación de flóculos (Tay *et al.*, 2007), se debe a una baja producción de EPS y se lleva a cabo cuando en el reactor no se tienen las condiciones estresantes ni selectivas para favorecer al crecimiento de los gránulos (Lee *et al.*, 2010).

1.3.6 Desempeño de biorreactores de membranas sumergidas con lodos granulares aerobios

De acuerdo con los resultados de Tay *et al.*, (2007), la resistencia específica de la biotorta formada por los lodos granulares es seis veces más pequeña que para lodos floculentos, lo que indica que los

gránulos se comprimen menos que los flóculos. La resistencia de la fracción correspondiente a los sólidos suspendidos fue insignificante comparada con la de la fracción de solutos y coloides. Estos investigadores, reportan que en pruebas cortas de filtración a presión constante, cuando se incrementó la PTM 8 veces, la pérdida de permeabilidad en el MBR con lodos granulares fue 1.68 veces menor que con lodo floculento, en cambio las pruebas a flux constante indicaron que cuando el flux se incrementó 3 veces, la pérdida de permeabilidad de la membrana fue 21 veces más bajo que con lodos floculentos convencionales. Durante la operación la presión transmembrana (PTM) en el reactor con lodo floculento se incrementó a 50-60 kPa aplicando una limpieza física de manera regular, en cambio con lodos granulares se mantuvo una PTM de 3-6 kPa sin necesidad de limpieza física. La convergencia de dos tecnologías una ampliamente utilizada, como lo son los biorreactores de membranas sumergidas, y otra la recientemente utilizada, granulación aerobia, resulta en una tecnología prometedora hacia la cual se están enfocando recientemente algunos grupos de investigación como son los mostrados en la Tabla 1.4.

En 2005, Li *et al.*, reportaron la operación de un MBR de membrana interna con lodo granular que fue obtenido previamente en un SBR con la finalidad de estudiar la estabilidad y las características de los gránulos en el bioreactor, el proceso estuvo operando por un periodo de 55 días, sin embargo reportan una disminución en el tamaño de los gránulos, reduciendo su diámetro de 3 mm a 2 mm, con una pobre sedimentabilidad consecuencia del crecimiento de microorganismos filamentosos en la superficie de los gránulos. Sin embargo, reportan que el flux en el MBR con gránulos aerobios fue 50% más alto que el de un MBR con lodos floculentos a 16 días de su operación, la causa de la colmatación en el lodo granular fueron principalmente solutos y coloides, además reportan que los gránulos se comenzaron a romper durante la operación del MBR.

Resultados similares reportan Zhou *et al.*, (2007), donde los resultados de filtración a corto tiempo indican que con los gránulos aerobios se puede controlar significativamente la colmatación de la membrana, e identificaron además a las proteínas y los polisacáridos como los principales responsables de la colmatación en estos sistemas.

Tay *et al.*, en 2007 reportaron la operación de un reactor discontinuo secuencial con membrana MSBR logrando mantener el lodo granular, basándose en las condiciones de operación de un SBR. Los gránulos aerobios fueron previamente cultivados en un SBR, una vez que se formaron los gránulos, tras un periodo de maduración, fue sumergido un módulo de membranas. Con esta forma de operación, 3/8 del efluente fueron descargados por medio de la filtración y el restante 1/8 por decantación con el fin de mantener las condiciones de presión de selección en el proceso granular. La presión transmembrana se mantuvo cerca de 3-4 kPa, al día 80 alcanzó 10.5 kPa, debido a esto

se le dio un lavado con agua, restableciéndose la permeabilidad. En el proceso floculento en cambio, se aplicaron varios lavados cuando la presión transmembrana alcanzó los 50 kPa, el intervalo fue aproximadamente de 18-19 días, como conclusión estos autores afirman que el lodo granular mejora las condiciones de filtración, reportan además, que el tamaño de los gránulos se mantuvo inestable debido al efecto de la operación con la membrana.

Tabla 1.4 Desempeño del tratamiento con lodos granulares y membranas.

| Fuentes Carbono | OLR (kg/m ³ d) | Vol. (L) | TRH (h) | SST (g/L) | Dm. Gran. (mm) | Membra -na * | Poros (µm) | Área (m ²) | Modo de Operación | TPM (kPa) | Flux Inicial L/m ² /h | Flux final L/m ² /h | Aire Lpm. | Problema reportado | Referencia |
|-----------------------------------|------------------------------|-------------|------------|--------------|----------------------|-----------------|---------------|---------------------------|--|--------------|--|--------------------------------------|--------------|-----------------------|---------------------------------|
| Glucosa | 2 | 5 | 5 | 15 | | PP | 0.1 | 0.05 | 10 min. ON/5 min. OFF | 100 | 9 | 3.1 | | Taponamiento | Li <i>et al.</i> ,2005 |
| Glucosa | | 20 | | 15 | 2.3 | PP | 0.1 | 0.5 | 10 min. ON/5 min. OFF / retrolavado | | | | | Filamentosos | Li <i>et al.</i> ,2007 |
| Acetato | 4 | 2.24 | | 6.5 | 0.7 | Memcor | 0.1 | 0.025 | 3/8 filtrado 1/8 decantado | 120 | 12 | 12 | 3.5 | Turbiedad | Tay <i>et al.</i> , 2007 |
| Glucosa/acetato | | | | | | PVDP | 0.1 | 0.03 | | | | | | Disgregación | Wang <i>et al.</i> , 2008 |
| Fenol/peptona | | 0.8 | | | | PE | | 0.03 | 15 min ON/15 min. OFF, retrolavados | 80 | | | 3 | Biotorta | Juang <i>et al.</i> ,2008 |
| Glucosa | | 2.5 | 5.8 | | | PVDF | 0.1 | 0.06 | 8 min ON/ 4 min. OFF | | 18 | | 4.5 | EPS | Thanh <i>et al.</i> , 2008 |
| Glucosa/acetato | 1-3.5 | | 12 | 20 | | PVDF | 0.1 | 0.03 | 8 min. ON/ 2 min. OFF | 100 | | | | | Wang <i>et al.</i> , 2009 |
| Acetato | 30 | 3.39 | | 10.2 | | PE | 0.4 | 0.03 | | | | | 3 | disgregación | Juang <i>et al.</i> , 2009 |
| Acetato | 9-16 | 1 | | | | PE | 0.4 | 0.03 | | 9.8-70 | | | 3 | Biopelícula | Juang <i>et al.</i> , 2010 |
| Acetato | 1.7-16 | 3.39 | 24 | 10.2 | | PE | 0.4 | 0.03 | continuo | | | | 3 | Biopelícula | Juang <i>et al.</i> , 2010b |
| Ind. Pescado | | | | | | PVDF | 0.1 | 0.027 | 5.5 min. ON/0.5 min.OFF | | 10 | 2.5 | | Filamentosos | Sánchez <i>et al.</i> , 2010 |
| Glucosa/aceta- to/etanol/prop. | | 17 | | | | PES | 0.1 | 0.028 | Fase anóxica | | | 2.9 | | PMS | Thanh <i>et al.</i> , 2010 |
| Acetato | | 7.6 | | | 0.9 | PVDF | 0.22 | 0.3 | 8 min. ON/2 min. OFF | 0.5-17.8 | 6 | | | EPS | Wang <i>et al.</i> ,2010 |
| Glucosa | 26-35 | 60 | | | | MF | 0.4 | 1 | 9 min. ON/3 min. OFF | 19.6 | 10 | | | Flóculos | Tu <i>et al.</i> , 2010 |

*PP, polipropileno, PE, polietileno, PES, poliestersulfona, PVDF, fluoruro de polivinilidieno

Wang *et al.*, (2008), estudiaron la estabilidad de gránulos aerobios alimentados de manera continua con fenol en un MBR, el reactor fue inoculado con gránulos maduros los cuales fueron preservados por 15 días a 8°C. Los gránulos presentaron menos desintegración después de 24 días de operación, la distribución de tamaño fue menor comparada con el de un reactor SBR. El porcentaje de gránulos fue 56-62% del total de lodos, sin embargo la colmatación presentada en la membrana, en el reactor con lodos granulares fue de un carácter más irreversible que el operado con los lodos floculentos. La membranas fueron limpiadas con agua cuando la presión transmembrana alcanzó los 70 kPa. Ellos reportan también que los principales responsables del ensuciamiento de la membrana con lodos granulares son: el depósito de proteínas, α -polisacáridos, lípidos, y en menor medida los β -polisacáridos, también reportan que los polisacáridos solubles constituyen la mayor parte (84%) de las sustancias poliméricas extracelulares en el sobrenadante.

En el 2010 Juang *et al.*, reportaron como principal causante del taponamiento interno de las membranas a una bacteria denominada *Arthrobacter sp.*, La bacteria tiene forma de bacilo con 0.87 μm de longitud y 0.56 μm de ancho, lo suficientemente pequeño como para penetrar la membrana y causa el crecimiento de una biopelícula interna, la cual es responsable del bloqueo de los poros (Juang *et al.*, 2011). En otra publicación (2010b) mencionan igualmente a *Ralstonia mannitolitica* y *Actinobacterium*, de igualmanera reportan Juang *et al.*, (2010c) la operación en continuo por 216 días de un reactor MBR con gránulos aerobios que fueron cultivados previamente en un reactor SBR alimentados con 4.8 g/L de acetato de sodio como fuente de carbono, determinaron el efecto de altas concentraciones de sales de fosfato, lo cual aseguran le dio estabilidad a los gránulos a comparación a los que carecían de estas y que terminaron por desintegrarse, observaron al microscopio precipitados de fosfato de calcio y óxidos de hierro en el interior de los gránulos, los cuales posiblemente confieren estabilidad a la estructura granular, no reportan datos acerca de la filtración.

En el 2010 Tu *et al.*, reportaron el funcionamiento de un reactor alimentado con glucosa con 60 litros de capacidad, cual operaron en un primer periodo con lodo floculento y membranas sumergidas, en un segundo periodo retiraron las membranas para favorecer la granulación, finalmente en una tercera fase introdujeron de nuevo las membranas esta vez con lodos granulares ya formados. Ellos reportan que en el primer periodo alcanzaron la presión crítica de 19.6 kPa hasta después de 75 días, mientras que con lodos granulares lo operaron por 80 días sin que la presión transmembrana aumentara a más de 8 kPa. En referencia a los EPS señalan que estos se incrementaron ligeramente durante los periodos 2 y 3 y además aumentó la relación proteínas/carbohidratos de 1.5 a 2.5.

Los procesos de lodos granulares con membranas se han utilizado a nivel laboratorio para tratar efluentes de la industria alimenticia, Sánchez *et al.*, en 2010 compararon un proceso floculento con uno granular acoplado un módulo externo de membranas sumergidas a manera de tratamiento terciario, y reportan que no se tuvo una diferencia significativa en términos de permeabilidad, presión transmembrana y flux crítico entre el proceso granular y el floculento y a pesar de que la biomasa estaba sólo parcialmente granulada, adjudican una mayor relevancia a los biopolímeros agrupados a la nitrificación y a los productos microbianos solubles que al tamaño de la biomasa (Sánchez *et al.*, 2011).

1.4 Conclusiones de la revisión

Se ha encontrado, de acuerdo a las investigaciones que se han realizado, que es factible y prometedor aplicar y desarrollar una tecnología para los biorreactores con membranas sumergidas (MBR) combinándolos con lodos granulares, ya que debido a las características físicas de los gránulos, como son tamaño, densidad y resistencia a la compresión, se tiene una menor colmatación de las membranas que con lodos floculentos. Sin embargo, aún se tiene que investigar con respecto a las condiciones de operación para dar la estabilidad a los gránulos requerida para operar en un proceso con membranas y para entender cuáles son los mecanismos por los que tienden a desintegrarse en ese tipo de reactores, ya que aún no queda claro cuál es el efecto de la membrana sobre la presión de selección.

Es necesario optimizar la operación para retardar la colmatación y así alargar el tiempo de filtración de las membranas. Para esto se requiere estudiar la dinámica de la colmatación, para encontrar cuales son los principales agentes responsables del taponamiento de las membranas y así diseñar estrategias anticoltatación. En cuanto a esto, se ha logrado con la granulación controlar la formación de la biocapa, pero hasta ahora se desconoce qué efecto tienen los biopolímeros agrupados que se forman a partir de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en el desempeño de la filtración.

Es necesaria una mayor investigación sobre la configuración de los reactores de manera que permitan un menor gasto en la aireación, que representa el mayor costo de operación tanto en los biorreactores de membranas sumergidas como en los procesos granulares aerobios y evaluar la conveniencia del uso de un módulo interno o externo dependiendo de las características del influente.

Falta investigar el efecto de altas concentraciones de compuestos tóxicos sobre la estabilidad de los gránulos y como afecta esto a la operación con membranas sumergidas.

2 METODOLOGÍA GENERAL

2.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental se desarrolló en 4 fases como se muestra en la Figura 2.1; inicialmente se buscó la aclimatación de los lodos activados convencionales, para degradar de una manera eficiente el 4-clorofenol, para esto se basó en trabajos previos (Moreno-Andrade *et al.*, 2006), después se aplicó una presión selectiva a los microorganismos disminuyendo el tiempo de sedimentación, posteriormente obtenidos los gránulos se introdujo la membrana de ultrafiltración, primeramente en el mismo reactor y posteriormente en un módulo separado, a continuación, se describen estas fases relacionándolas con los objetivos particulares.

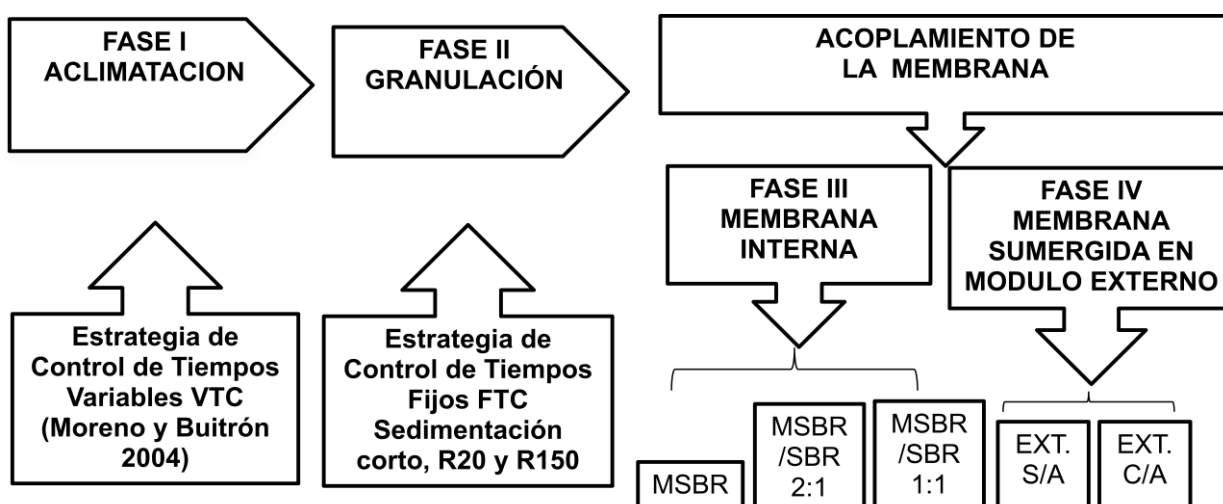


Figura 2.1 Estrategia experimental.

Fase I. Aclimatación

Se inoculó el reactor con lodos activados de una planta municipal en un reactor discontinuo secuencial piloto de 4 L, para degradar 4-clorofenol, para esto se aplicó una estrategia de tiempos variables (Moreno y Buitrón, 2004); esto es, se mantuvo el periodo de reacción, iniciando el siguiente ciclo hasta que el sistema degrada el 95%, se repitieron los ciclos hasta alcanzar un tiempo de degradación menor a 3 horas. Para la alimentación se utilizó agua residual sintética con 4-clorofenol (4-CF) con una concentración de 200 mg/L como única fuente de carbono y solución mineral (AFNOR, 1989), de inicio fueron 20 ciclos con 100 mg/L de 4-CF y después 20 ciclos con 200 mg/L de 4-CF como S_0 , el

volumen de intercambio fue del 50 % con un suministro de aire de 60 L/h y un tiempo de sedimentación de 15 minutos, la relación DQO/N se mantuvo en 20 agregando NH_4Cl .

Se evaluaron las propiedades físicas durante la aclimatación de los gránulos. Se analizó la concentración de exopolímeros y las agrupaciones de éstos (proteínas y carbohidratos).

Fase II. Granulación

Pasado el periodo de aclimatación se aplicaron condiciones de granulación que consisten en: cortos tiempos de sedimentación (5 min.- 3 min.), aireación 60 L/h, alta carga orgánica (200 mg/L 4-CF). Para observar el efecto de la cantidad de nitrógeno se trabajó a una relación DQO/N de 20 y otra a 150 (R20 y R150, respectivamente), hasta obtener gránulos estables y maduros con ciclos de 4 horas con un tiempo corto de sedimentación de 3 minutos, esto con la finalidad de aplicar una presión selectiva para seleccionar la biomasa granular, para mantener la concentración de SSVLM de $2 \pm 0.5\text{g/L}$ se realizó una purga diaria de lodo de 200 mL.

III y IV Fases de filtración

Al reactor con biomasa granular se acoplaron las membranas primero en configuración interna (MSBR) comparando la operación con otro reactor operando sin membrana (SBR) como estrategia anticompactación se alternaron ciclos con membrana y sin membrana 2:1 y 1:1 (MSBR/SBR 2:1 y MSBR/SBR 1:1), finalmente se introdujeron las membranas a un módulo externo, primero sin aireación y después con aireación (EXT S/A y EXT C/A). Durante el filtrado el sistema se retrolavó automáticamente por 15 segundos cada 15 minutos. Los lavados químicos a las membranas consistieron en 12 horas con HClO 0.05 %, $\text{pH}=11$ y 12 horas con ácido cítrico 0.1 M, $\text{pH}=2$, de acuerdo a la recomendación del fabricante, se aplicaron en cuanto la PTM excedió de 55 kPa.

La duración de los ciclos de operación dependieron del tiempo de reacción, sumado al tiempo de filtración el cual fue de entre una hora y dos horas, tuvo una duración total de 4 horas, sin contar el tiempo muerto, ni el tiempo de sedimentación, debido a esto, el caudal de salida fue de entre 0.8 a 1 L/h, que corresponde a un flux de 10 a 15 $\text{L/m}^2/\text{h}$.

2.2 Diseño del biorreactor piloto

El biorreactor utilizado (Figura 2.2) consta de dos módulos construidos en acrílico de 3 mm de espesor, uno para trabajar con la membrana interna con 5 L de capacidad y otro para trabajar como membrana externa, con 3.5 L de capacidad. El aire fue suministrado por un controlador de flujo másico Aalborg modelo GFC17 hacia un difusor tubular de burbuja fina colocado en la parte inferior del reactor. La

concentración de oxígeno disuelto fue medida mediante un sensor Endress Hauser COS41 y un transmisor liquisys-S COM223. La temperatura se controló recirculando agua a través de una doble pared del reactor desde un recipiente con un calentador/enfriador (Cole palmer 01266-30) con la finalidad de mantenerla en 25°C. Se utilizaron un par de módulos de filtración, el material de la membrana utilizada (Memos GmbH) es: Fluoruro de polivinilidieno (PVDF) de 250 kDa peso molecular de corte, y consta un módulo de 4 membranas tubulares de 1 cm de diámetro, la longitud del módulo: 34 cm, la longitud de trabajo: 32 cm, el tamaño de poro: 0.1 μm y un área de 0.04 m^2 para cada módulo.

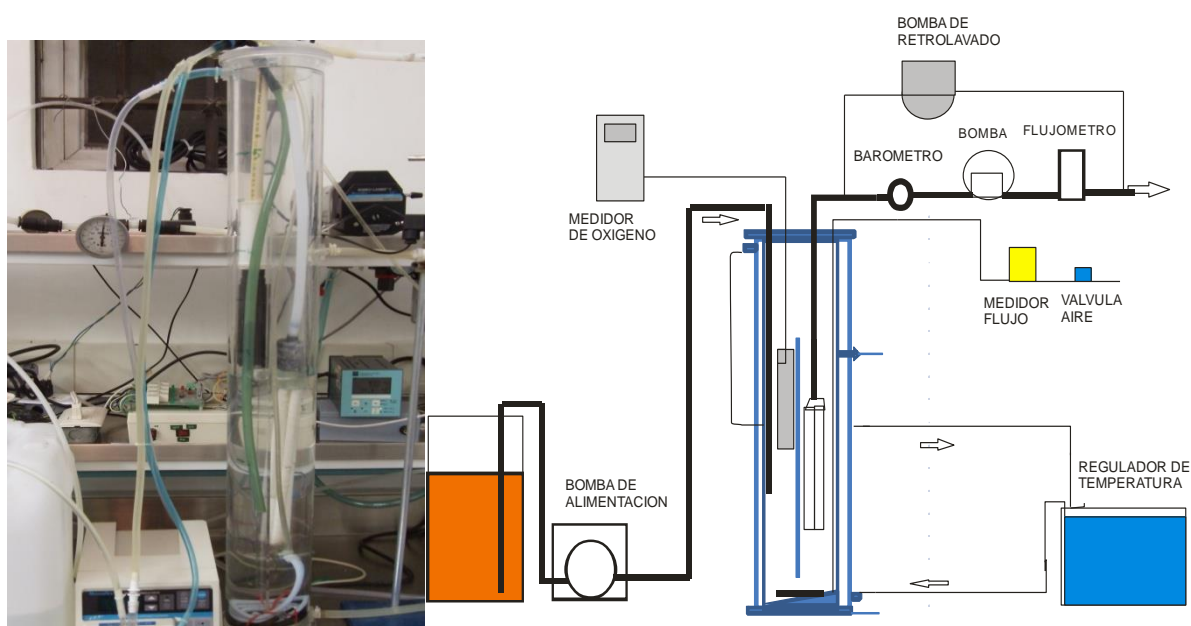


Figura 2.2 Bioreactor piloto.

El biorreactor se encontraba equipado con bombas peristálticas Masterflex Modelo 7523-20 (Perkin Elmer, USA) para alimentación y desagüe, las cuales fueron limpiadas y calibradas semanalmente, mientras que los retrolavados se llevaron a cabo con una bomba de diafragma Concept Plus (Prominent, Alemania) a un flujo de 10.4 L/h, 15 segundos cada 15 minutos, el flujo del permeado fue medido con un flujómetro Alicat L200CCM y la presión con un transductor Cole-Parmer Mod. C206. Todas las señales de medición tanto analógicas como digitales fueron recibidas en una tarjeta de adquisición de datos (DAC) National Instruments Mod. USB6008 y procesadas en un computador mediante un programa de control desarrollado en LabView 7.1 en el Instituto de Ingeniería denominado *Biorec*, las mangueras fueron limpiadas o cambiadas mensualmente. Con el fin de evitar el crecimiento bacteriano en las paredes se limpió el reactor cada semana con un escobillón largo.

El biorreactor fue alimentado con agua residual sintética preparada de acuerdo con AFNOR 1985 modificado por Moreno y Buitrón 2004 a partir de las soluciones siguientes: Solución A: 8.5 g/L de

KH₂PO₄, 21.75 g/L de K₂HPO₄, 33.4 g/L de Na₂HPO₄·7H₂O, 2.5 g/l de NH₄Cl; Solución B: 22.5 g/L de MgSO₄·7H₂O, Solución C: 36.4 g/L de CaCl₂·2H₂O, Solución D: 0.25 g/L FeCl₃·6H₂O, Solución F: 0.0399 g/L de MnCl₂·4H₂O, 0.0572 g/L de H₃BO₄, 0.0428 g/L de ZnCl₂, 0.0347 g/L de (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0.0555 g/L de EDTA, 0.0445 g/L de FeCl₃·6H₂O, Solución G: 20 g/L de 4-CF. Todas las soluciones se prepararon con agua destilada, conductividad 20 μS y se diluyeron con agua potable del servicio, para cada litro del agua residual sintética se agregaron: 3 mL de la solución A, 1 mL de cada una de las soluciones B, C, D y F, la solución de 4-CF se agregó posteriormente para mantener una concentración de 200 mg/L quedando las concentraciones como se indica en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Concentraciones en la solución de alimentación.

| | | | |
|---|------------|---|-------------|
| KH ₂ PO ₄ | 25.5 mg/L | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.0399 mg/L |
| K ₂ HPO ₄ | 65.35 mg/L | H ₃ BO ₄ | 0.0572 mg/L |
| Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | 100.2 mg/L | ZnCl ₂ | 0.0428 mg/L |
| NH ₄ Cl | 7.5 mg/l * | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | 0.0347 mg/L |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 22.5 mg/L | EDTA | 0.0555 mg/L |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 36.4 mg/L | FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0.0445 mg/L |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0.25 mg/L | 4-CF | 200 mg/L |

* Para mantener la relación DQO/N de 20 se agregan 57.5 mg/L de NH₄Cl.

2.3 Técnicas analíticas

2.3.1 Análisis generales

La concentración del 4-CF fue determinada como fenoles totales, fue medida tomando muestras y procesándolas fuera de línea utilizando el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina (APHA, 2005). Los sólidos totales y volátiles (SST y SSV) fueron determinados de acuerdo a los métodos estándar (APHA, 2005). La determinación del carbono orgánico disuelto total (COT) se llevó a cabo mediante un analizador Shimadzu TOC-5050 (Japón). La demanda química de oxígeno (DQO), índice volumétrico de lodos (IVL) y la velocidad de sedimentación, fueron evaluadas de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 2005) (Anexo II).

El porcentaje de gránulos mayores a 210 μm fue evaluado granulométricamente de acuerdo con (Laguna *et al.*, 1999). La biomasa granular fue tamizada en una malla estándar de 0.21 mm (número 65 Tyler), considerando la definición de Kreuk *et al.*, 2007. La evolución de los gránulos en el reactor fue determinada con 0.5 mL de muestra en un microscopio óptico (Eclipse E400, Nikon Instruments,

Japan) y el tamaño de gránulo fue estimado mediante el análisis de imágenes con el programa AxioVision rel. 4.8.2 (Carl Zeiss, Germany), para cada muestra se tomaron 10 mediciones y calculado el promedio. Los datos presentan la mediana de cada muestra.

2.3.2 Evaluación de la estructura de la colmatación de las membranas

La estructura de la colmatación fue evaluada mediante técnicas de fluorescencia, las cuales han sido útiles para distinguir los distintos componentes de una estructura biológica, al diferenciar estos mediante fluorocromos que se adhieren a un compuesto objetivo y lo hace resaltar de su entorno. Estas técnicas ya se han utilizado con microscopios de fluorescencia o con microscopios láser confocal de barrido y se han aplicado al estudio de los gránulos aerobios y a la colmatación en los MBR por diversos investigadores (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Diferentes fluorocromos utilizados en la literatura.

| Fluorocromo | Excitación (nm) | Emisión (nm) | Marcaje | Referencia |
|---------------------------|-----------------|--------------|---|---------------------------------|
| Calcofluor white | 400 | 410–480 | β -1,4 y β -1,3 polisacáridos | Chen <i>et al.</i> , 2006 |
| Sytox blue | 458 | 460–500 | Células muertas | Chen <i>et al.</i> , 2007 |
| FITC | 488 | 500–550 | Proteína, amino-azúcares | Chen <i>et al.</i> , 2007 |
| Nile red | 514 | 625–700 | Lípidos, sitios hidrofóbicos | Chen <i>et al.</i> , 2007 |
| Con A conjugates | 543 | 550–600 | α - polisacáridos | Chen <i>et al.</i> , 2007 |
| Syto 63 | 633 | 650–700 | Células totales | Chen <i>et al.</i> , 2007 |
| Calcofluor white | 405 | 420–480 | β -1,4 y β -1,3 polisacáridos | Bereschenko <i>et al.</i> ,2010 |
| Syto 13 | 488 | 505-550 | Células totales | Bereschenko <i>et al.</i> ,2010 |
| DAPI | 405 | 420-480 | Células totales | Bereschenko <i>et al.</i> ,2010 |
| FITC-Con-A | 488 | 505-550 | α - polisacáridos | Bereschenko <i>et al.</i> ,2010 |
| Calcofluor White | 405 | 420-480 | β -1,4 y β -1,3 polisacáridos | Bereschenko <i>et al.</i> ,2010 |
| Tetrametil rodamina TRITC | | | Proteínas | Zator <i>et al.</i> , 2007 |
| Rodamina B | | | Proteínas | Zator <i>et al.</i> , 2007 |
| SYBR green 1 | 488 | 513-530 | Bacterias | Hwang <i>et al.</i> , 2007 |
| Amarillo benzoxantano | 395 | 450-480 | Proteínas | Hwang <i>et al.</i> , 2007 |
| SYTO 9 | 488 | 530-545 | Acidos nucleicos | Neu <i>et al.</i> , 2004 |
| SYTO 40 | 840 dos | 370-500 | Acidos nucleicos | Neu <i>et al.</i> , 2004 |
| FITC-lectina | 480 | 530-545 | Glicoconjugados | Neu <i>et al.</i> , 2004 |
| TRIC-lectina | 567 | 600-630 | Glicoconjugados | Neu <i>et al.</i> , 2004 |
| Sytox green | 504 | 520-530 | Células muertas | |

2.3.3 Toma de muestra

Para validar la técnica de fluorescencia, se utilizó un filtro de PTFE Millipore tamaño de poro 0.2 μ m a través del cual se filtraron 20 mL de una solución con 100 mg/L de albúmina de suero bovino (ASB) como patrón de proteínas, alginato de sodio (Alg.) como polisacáridos y gránulos disgregados como biomasa, se cortó 1 cm² de la membrana se colocó en un portaobjetos de vidrio y se realizó la tinción los resultados se muestran en el Anexo A2.10.

2.3.4 Tinción

2.3.4.1 Proteínas

El FITC (isotiocianato de fluoresceína) es un marcador fluorescente comúnmente utilizado para las proteínas, ya que contiene los grupos requeridos para conjugar a los grupos amino, sulfidrilo, tirosilo imidazolilo, y carbonilo de las proteínas. FITC (Figura 2.3) tiene un peso molecular de 389, y longitudes de onda de excitación y de emisión de 494nm y 520nm, respectivamente, por lo tanto, emite luz verde en el rango visible.

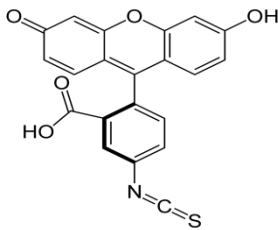


Figura 2.3 Estructura Química del FITC (Green 1990).

Primero cuidadosamente se adicionaron 100 μ L de buffer de bicarbonato de sodio (0.1M, pH=9), con el fin de mantener el grupo amino de las proteínas en su forma no protonada, se le agregó en seguida 10 μ L de una solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, USA), a una concentración de 1 μ g/L disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). Se incubó en la oscuridad por 30 minutos. El exceso de colorante fue removido enjuagando dos veces con buffer de fosfatos 1x PBS pH 7.2, y se procedió con la observación microscópica.

2.3.4.2 Polisacáridos

La 7 dietilamino-4-metilcumarina (Figura 2.4) mejor conocida como Calcofluor white (CW), es un abrillantador fluorescente, el cual señala los materiales de la pared celular de hongos, algas y plantas, tiene una gran afinidad por la celulosa y quitina interactuando con los polisacáridos, también puede interactuar con los carbohidratos de la superficie de las proteínas (Adav *et al.*, 2010).

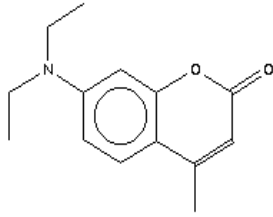


Figura 2.4 Estructura Química del CW.

Al corte de la membrana se agregaron 100 μL del colorante Calcofluor white (Sigma, USA), a una concentración 30 $\mu\text{g/L}$ disuelto en buffer 1x PBS, $\text{pH} = 7.2$, se incubó por 30 minutos en la oscuridad, el exceso de colorante fue removido mediante dos enjuagues con buffer 1x PBS.

2.3.4.3 Bacterias

Los colorantes SYTOX (Figura 2.5) tienen una gran afinidad por los ácidos nucleicos y pueden fácilmente penetrar en las células cuando se encuentra la membrana permeable, por lo tanto no cruzan la membrana de células vivas, son muy útiles para marcar bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, se pueden utilizar en conjunto con otros marcadores que permean las células como el DAPI o SYTO 59-64 para diferenciar las células vivas de las muertas.

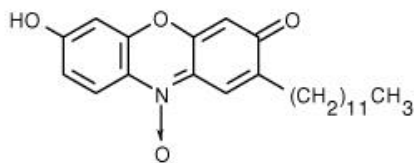


Figura 2.5 Estructura Química del SITOX green.

La muestra del corte de la membrana se tiñó con 100 μL SITOX Green (Molecular Probes, USA) a una concentración 250 $\mu\text{g/L}$ disuelto en buffer PBS 1x, $\text{pH} = 7.2$ por 5 minutos, se enjuagó con buffer de fosfatos (Adav *et al.*, 2010) 1x de PBS dos veces por 5 minutos.

El dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol (Figura 2.6) más conocido como DAPI es un colorante que se liga al ADN y cuando lo hace muestra una gran fluorescencia de color azul.

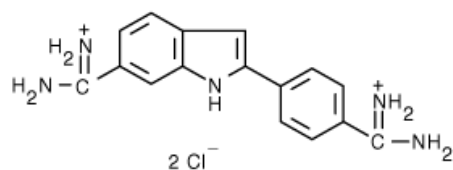


Figura 2.6 Estructura Química del DAPI.

El To-Pro3, diyoduro de (Quinolinium,4-[3-(3-metil-2(3H)-benzotiazolilideno)-1-propenil]-1-[3-(trimetilamonio)propil]). Es un fluoróforo utilizado para la tinción de ADN.

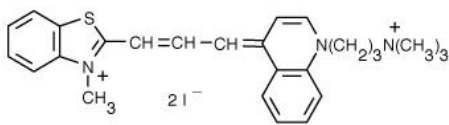


Figura 2.7 Estructura Química del To-Pro 3.

La concentración utilizada para teñir la muestra fue a partir de una solución concentrada de 1mM en dimetilsulfóxido (DMSO), diluida con agua destilada en una proporción 1:1000.

A la muestra del corte de la membrana se agregaron 100 μ L del colorante DAPI (Molecular Probes, USA) a una concentración de 500 μ g/L disuelto en buffer 1x PBS, pH 7.2, se incubó por 30 minutos en la oscuridad, el exceso de colorante fue removido enjuagando con buffer 1x PBS dos veces 5 minutos. Las muestras se almacenaron en la oscuridad a 4 °C.

Las laminillas fueron observadas con el microscopio de fluorescencia Axovert, las bacterias con el DAPI con el filtro de color azul (DAPI), las proteínas con el FITC se observaron con el filtro verde (GFP), igualmente, se observaron las bacterias con el SITOX Green con el filtro de color verde (GFP), los polisacáridos teñidos con el CW se observaron con el filtro azul (DAPI), con el objetivo 10X.

2.3.4.4 Corte y tinción de la membrana

La autopsia de la membrana sumergida se realizó de la manera siguiente: se extrajo la membrana del reactor y con una navaja se hizo un corte de aproximadamente 1 cm de longitud posteriormente se colocó en un tubo de polietileno para centrífuga. Para fijar la muestra se siguió la técnica recomendada por Adav *et al.*, 2010 a cual consiste en fijar la muestra con formaldehído al 3.7 % por 1 hora, de acuerdo con Nosyk *et al.*, 2008 esta forma de fijar la muestra no afecta a la estructura de exopolímeros, posteriormente se enjuagó con buffer PBS 1x por 1 hora, posteriormente la muestra fue enjuagada con buffer PBS 1x por 1 hora, los cortes transversales se realizaron en un criomicrotomo (Leica, Alemania), utilizando OCT como medio de montaje, y se realizaron los cortes a 40 μ m de espesor.

Tinción de la membrana: Se colocaron los cortes de la capa superficial de la membrana en las celdas de un pastillero de polietileno, cuidadosamente se adicionaron 100 μ L de buffer de bicarbonato de sodio (0.1M, pH=9), con el fin de mantener el grupo amino de las proteínas en su forma no protonada, se agregó en seguida 10 μ L de una solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC), disuelto previamente en dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración de 1 μ g/L. Se incubó en la oscuridad por 30 minutos.

El exceso de colorante fue removido mediante dos enjuagues con buffer 1x PBS pH 7.2 por 10 minutos cada uno.

En seguida se agregó el colorante DAPI ,100 μ L a una concentración de 500 μ g/L disuelto en buffer 1x PBS, pH 7.2 y se incubó por 30 minutos en la oscuridad, el exceso de colorante fue removido enjuagando con buffer PBS 1x dos veces 5 minutos. La muestra se almacenó a 4 °C.

Debido al entrecruzamiento de las bandas de emisión entre el DAPI y el CW (Tabla 2), y entre el FITC y el SYTOX (Figura 2.7) hubo la necesidad de teñir dos muestras separadas. La segunda muestra fue teñida con 100 μ L del colorante Calcoflúor White a una concentración 30 μ g/L disuelto en buffer 1x PBS, pH =7.2, se incubó por 30 minutos en la oscuridad, el exceso de colorante fue removido enjuagando con buffer 1x PBS dos veces. La muestra se almacenó a 4 °C.

Previo a la observación, la segunda muestra se tiñó con 100 μ L de SITOX Green a una concentración 250 μ g/L disuelto en buffer PBS 1x, pH =7.2, incubando por 5 minutos, se enjuagó con buffer 1x de PBS dos veces por 5 minutos en la oscuridad.

Las muestras se colocaron cuidadosamente en porta objetos de vidrio manteniéndolas hidratadas con buffer PBS 1x.

Se observaron con el microscopio de fluorescencia Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Germany) del Instituto de Neurobiología, éste microscopio está equipado con el sistema Apotome. Las bacterias teñidas con el DAPI se detectaron con el filtro de color azul (DAPI), las proteínas teñidas con el FITC con el filtro de color verde (GFP). En la segunda muestra, las bacterias teñidas con el SITOX Green se detectaron con el filtro color verde (GFP) y los polisacáridos teñidos con el CW con el filtro azul (DAPI). Las observaciones fueron hechas con el objetivo 10X “Plan apochromat”, las imágenes digitales fueron tomadas por la AxioCam (Carl Zeiss, Germany) en mosaicos de 9 fotografías y tratadas digitalmente con el analizador de imágenes AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Germany).

Con la finalidad de utilizar una sola laminilla para la tinción al mismo tiempo de proteínas, β -polisacáridos y bacterias, se utilizó además el fluorocromo To-Pro 3 para la tinción de éstas últimas, llevando el procedimiento siguiente:

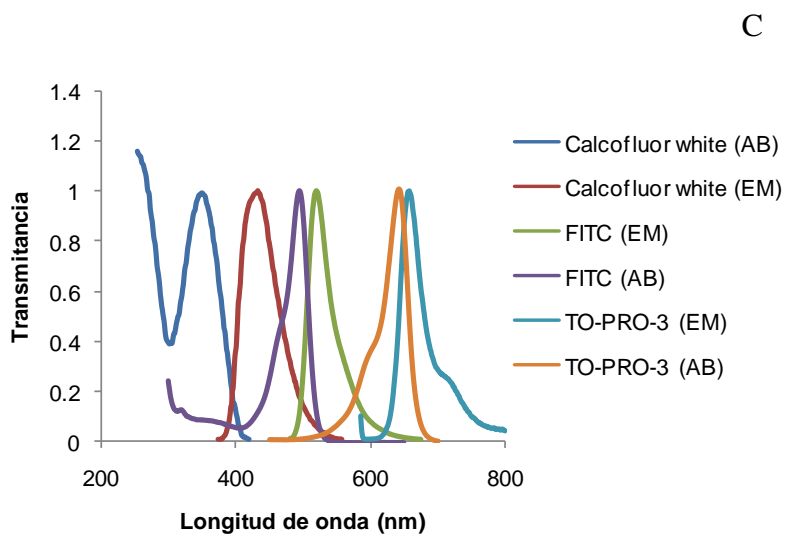
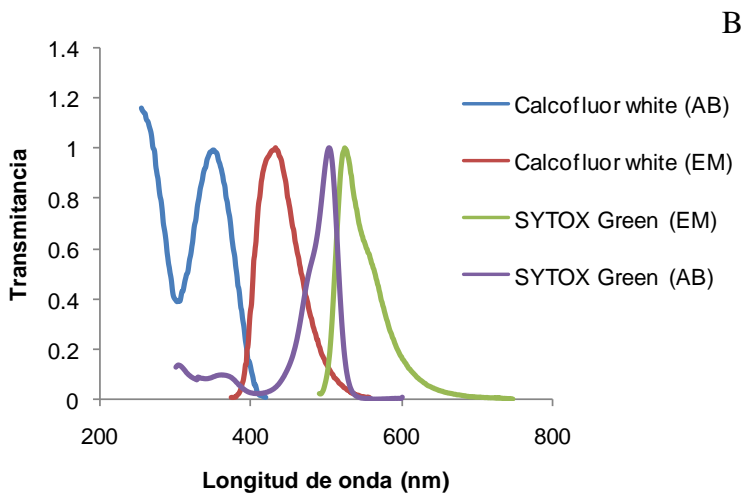
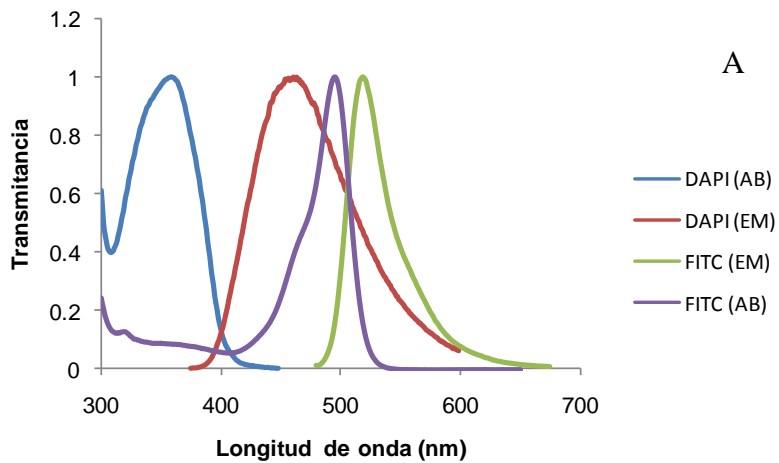


Figura 2.8 Longitudes de onda de absorción (AB) y emisión (EM) de los fluorocromos utilizados A) FITC con DAPI, B) CW con SYTOX green y C) CW, FITC y TO-PRO-3.

Tabla 2.3 Longitudes de onda para distintos fluorocromos. (Adav *et al.*, 2010)

| Tinte | Excitación (nm) | Emisión (nm) | Marcaje |
|------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------|
| Calcofluor white | 400 | 410–480 | Beta polisacáridos |
| FITC | 488 | 500–550 | Proteínas |
| DAPI | UV | 400–480 | Células totales |
| SYTOX green | 504 | 520–530 | Células muertas |
| ToPro 3 | 633 | 640–685 | Células muertas |

Primero, se adicionaron cuidadosamente 100 μL de buffer de bicarbonato de sodio (0.1M, pH=9), con el fin de mantener el grupo amino de las proteínas en su forma no protonada, posteriormente se agregaron 10 μL de una solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC), 1 mg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO), y se llevó a agitación 100 rpm por 30 min. El exceso de colorante fue removido enjuagando dos veces con buffer 1x PBS. En seguida fue agregado el fluorocromo Calcofluor White (100 μL , 30 mg/L en buffer 1x PBS, pH =7.2 por 30 minutos). El exceso de colorante fue removido enjuagando con buffer 1x PBS dos veces. La muestra se almacenó a 4 °C. Previo a la observación, la muestra fue teñida con ToPro 3 (250 mg/L disueto en PBS, pH = 7.2) por 15 minutos, se enjuagó con buffer 1X de PBS.

Se observaron las muestras en el Microscopio Láser Confocal de Barrido Axiovert 200 LSM 510 equipado con detector Meta y con láser Multifotónico (Zeiss, Germany) las proteínas teñidas con el FITC se observaron con el detector Ch2 BP-500-550 IR y las bacterias con el To-Pro 3 con el detector ChS1 640-661, los polisacáridos teñidos con el CW se observaron con el detector ChS2 415-480, se utilizó un objetivo EC Plan-Neufluar 20x/0.50M27.

2.4 Evaluación de la morfología de la colmatación de la membrana por SEM

Para evaluar la matriz de exopolímeros que crecen en la superficie de la membrana, se utilizó la microscopía electrónica de barrido (SEM) (Ng. *et al.*, 2006). Se cortaron 2 mm² de membrana, la cual se enjuagó con 1 ml buffer de fosfato 0.1M 3 veces, posteriormente la muestra se fijó con glutaraldehído 3% en buffer de fosfato 0.1M a pH 7.2 y se dejó reposar toda la noche, una vez que pasó ese tiempo, la muestra se enjuagó 3 veces con buffer de fosfato PBS. La muestra se fijó por segunda vez con una solución de osmio (OsO₄) al 1% en buffer de cacodilato 0.1 M, pH 7.4 por 1 hora a 4°C. Para deshidratar la muestra se utilizaron soluciones en etanol sucesivamente (25, 50, 75, 85, 95 y

100%), 10 minutos cada uno, se dejó 1 hora en etanol 100%, la muestra fue montada a una base de aluminio (stub) limpiado ultrasónicamente 20 minutos con acetona. Previo a la observación se recubrió con una capa de oro en un Sputter (Denton Vacuum, USA) mod. Desk II de 120 Armstrongs. Las muestras se observaron en el Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM- 6060LV del CFATA UNAM a 500, 1500, 5000, 7500 y 15000 aumentos del CFATA y en el microscopio EVO 50 (Zeiss, Germany) de la FCN de la UAQ.

2.5 Evaluación de la morfología de la colmatación de la membrana por TEM

Mediante la microscopía electrónica de transmisión (TEM) se pueden observar detalles de la morfología de los microorganismos, incluso la forma en que se encuentran las sustancias poliméricas extracelulares. Se realizaron cortes a la membrana una vez que se terminó la reacción, la muestra se lavó con buffer de fosfatos, con una jeringa se aspiró la solución cuidando de no deteriorar la muestra, se fijó con una solución de glutaraldehído al 3% en buffer de cacodilato 0.1 M en un tiempo de 1 a 2 horas a una temperatura de 4°C, en un volumen 10 veces mayor que el volumen ocupado por la muestra, se retiró la solución y se realizaron 3 lavados con el mismo buffer de cacodilato con 8.5 % de sacarosa, por 15 minutos cada uno.

La muestra se fijó por segunda vez con una solución de osmio (OsO_4) al 1% en buffer de cacodilato 0.1 M, pH 7.4 por 1 hora a 4°C, la muestra se lavó al igual que en la primera fijación. La deshidratación se hizo en concentraciones ascendentes de etanol (10, 25, 50, 75, 85, 95 y 100%) sucesivamente, con la finalidad de retirar el agua gradualmente para posteriormente sustituir el etanol por la resina donde fue montada. Después a temperatura ambiente se sustituyó el etanol por óxido de propileno, 20 minutos por dos ocasiones, finalmente se agregó una mezcla de resina Epon y óxido de propileno 1:1, se conservó la muestra a temperatura ambiente por una noche, a descubierto, para que la muestra quedara embebida e infiltrada por la resina, se colocaron las muestras en cápsulas Beem y se polimerizaron a 60° por un tiempo de 36 horas.

Los cortes a la muestra se realizaron con un ultramicrotomo (MTx, RMC), los bloques fueron seccionados a 60 nm de espesor, se montaron en una rejilla de cobre de 300 mallas, posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo 2% y citrato de plomo 2%, finalmente se observaron con el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM- 1010 del Instituto de Neurobiología a 8 kV.

2.6 Sustancias poliméricas extracelulares

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) fueron extraídas y evaluadas de acuerdo con Li *et al.*, 2008. Los EPS fueron clasificados en dos tipos: como EPS libres (F-EPS) que son los que se ubican libremente entre los agregados de biomasa y el licor mezclado y los EPS ligados (B-EPS) que son los que están unidos fuertemente a las superficies sólidas (Nielsen and Jahn, 1999). Los EPS se determinaron tomando una muestra de 50 mL de licor mezclado las cuales se centrifugaron a 4000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante fue filtrado en un disco GFA de fibra de vidrio 1.6 μm de corte (Watman, UK) y fueron medidas como EPS libres.

La extracción de los EPS ligados se realizó de la manera siguiente: a la biomasa asentada en la centrifugación, se recuperó el volumen original (50 mL) con una solución isotónica de NaCl 0.9% de acuerdo con Morgan *et al.*, 1990, y se calentó a 80° C por una hora, después de enfriar se centrifugó y filtró de la manera anteriormente descrita. El contenido de las proteínas y los polisacáridos fue determinado de acuerdo con los métodos de Lowry y Dubois respectivamente (Lowry *et al.*, 1951; Dubois *et al.*, 1956), utilizándose albúmina de suero bovino y glucosa (Sigma, USA) como estándares.

Para los biopolímeros agrupados, se tomaron 30 mL del sobrenadante al final del periodo de reacción, se dejó sedimentar por 12 h a 4° C, en un refrigerador (Sun *et al.*, 2008), se filtró el sobrenadante en un filtro de policarbonato de 0.4 μm de tamaño de poro y se procedió a teñir los materiales recolectados en el filtro de la misma manera como se indicó anteriormente, y se observó mediante el microscopio de fluorescencia Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Germany).

2.7 Evaluación de la colmatación mediante el modelo de resistencias en serie

Para calcular las resistencias en la membrana dentro del reactor se utilizó el modelo de resistencias en series (Feng *et al.*, 2012).

$$J = \frac{\Delta P}{\mu \sum_{i=1}^n R_i} \quad (8)$$

En donde la resistencia total R_t es la sumatoria de resistencias R_i del sistema y está dado por:

$$R_t = R_m + R_b + R_{pr} + R_{pi} + R_i \quad (9)$$

En donde R_m ; es la resistencia intrínseca de la membrana, R_b ; Resistencia debida a la biocapa, R_{pr} ; Resistencia de boqueo de poros reversible, R_{pi} ; Resistencia de boqueo de poros irreversible y R_r ; Resistencia residual.

Una vez retirada la membrana del reactor se colocó en una probeta conteniendo agua destilada. Para obtener la resistencia total del sistema (ecuación 1), se hizo filtrar agua destilada, posteriormente, la membrana se enjuagó con agua a chorro, se limpió la superficie con una esponja y se determino así la resistencia total menos la de la biocapa ($R_t - R_b$). Enseguida, se aplicaron 3 retrolavados con agua destilada y se determinó el valor de la suma $R_{pi} + R_r + R_m$. Finalmente, se aplicó un lavado químico de 12 h con NaHClO al 0.05% pH 11 y se determinó así la resistencia residual más la resistencia intrínseca de la membrana ($R_r + R_m$).

Para analizar los EPS de la colmatación se cortó un cm^2 de la membrana, se enjuagó con buffer PBS 1X, se dividió en pequeños pedacitos y se colocó en un tubo 1 mL de agua destilada, se agregó después 25 μL de fenol al 80 % y 2.5 de H_2SO_4 concentrado, se leyó la absorbancia a 490 nm y se determinó como mg de EPS/ cm^2 de membrana.

2.8 Determinación del flux crítico

El Flux crítico (J_c) se define como el caudal en el cual la presión transmembrana aumenta a más de una centésima de kilo pascal por minuto a una operación de flux constante (Le-Clech *et al.*, 2003), y significa el flujo al cual la membrana se comienza a colmatar rápidamente.

Para determinar J_c se utilizó una membrana de preferencia nueva o recién limpiada químicamente, y se puso en funcionamiento con agua destilada en una probeta de 1 L, a partir de un flux de 5 $\text{L}/\text{m}^2/\text{h}$., por 20 minutos, incrementándolo escalonadamente 5 $\text{L}/\text{m}^2/\text{h}$. cada 20 minutos hasta un máximo de 50 $\text{L}/\text{m}^2/\text{h}$, y posteriormente se disminuyó el flux de la misma manera escalonada (Cho y Fane, 2002). El experimento fue repetido con licor mezclado a la concentración de operación.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aclimatación

Se inoculó el reactor con 2 L de lodos activados de la planta de tratamiento de aguas municipal de Santa Rosa Jaúregui, logrando una concentración en el reactor de 3.5 gSSV/L, la operación se realizó con la finalidad de compensar la pérdida de biomasa que generalmente se tiene durante la aclimatación y al inicio de la granulación, quedando en el reactor 2.7 de SST para el día 17. Los lodos activados originarios de la planta de tratamiento tuvieron un IVL de 130 mL/g.

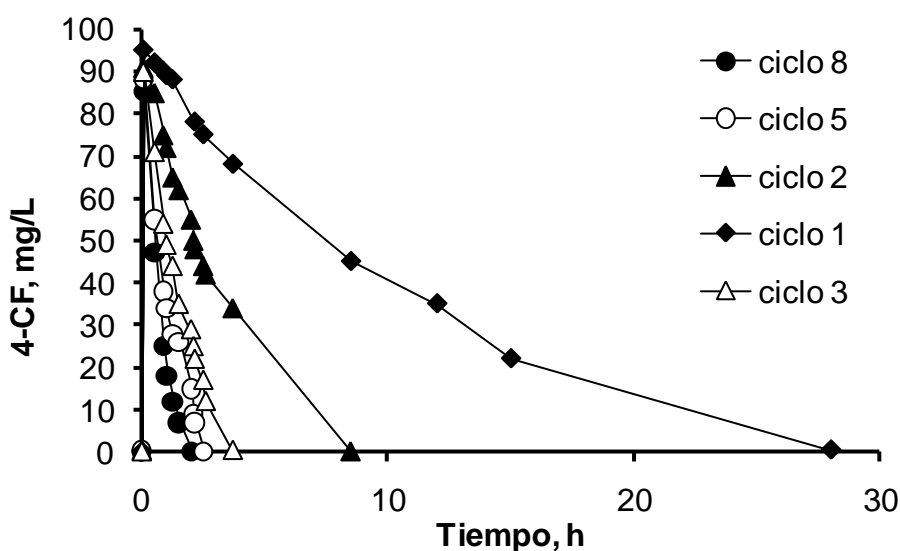


Figura 3.1 Disminución de la concentración de 4-CF en los primeros ciclos para la aclimatación a 100 mg/L 4-CF.

En primer lugar, la biomasa se aclimató para degradar 100 mg/L de 4-CF por 20 ciclos, se tuvo un tiempo de degradación menor de 2 horas a partir del ciclo 8 (Figura 3.1). A partir del ciclo 21 se incrementó la concentración de 4-CF a 200 mg/L en el reactor causando que el tiempo de reacción se incrementara a 6 horas para ese ciclo y disminuyendo a 4h para el ciclo siguiente lo que el tiempo de ciclo se mantuvo fijo en 4 h por 20 ciclos dando por concluido el periodo de aclimatación. Ese mismo comportamiento se observó durante dos distintos arranques (E1 y E2) utilizando distintos inóculos de la misma planta de tratamiento (Figura 3.2).

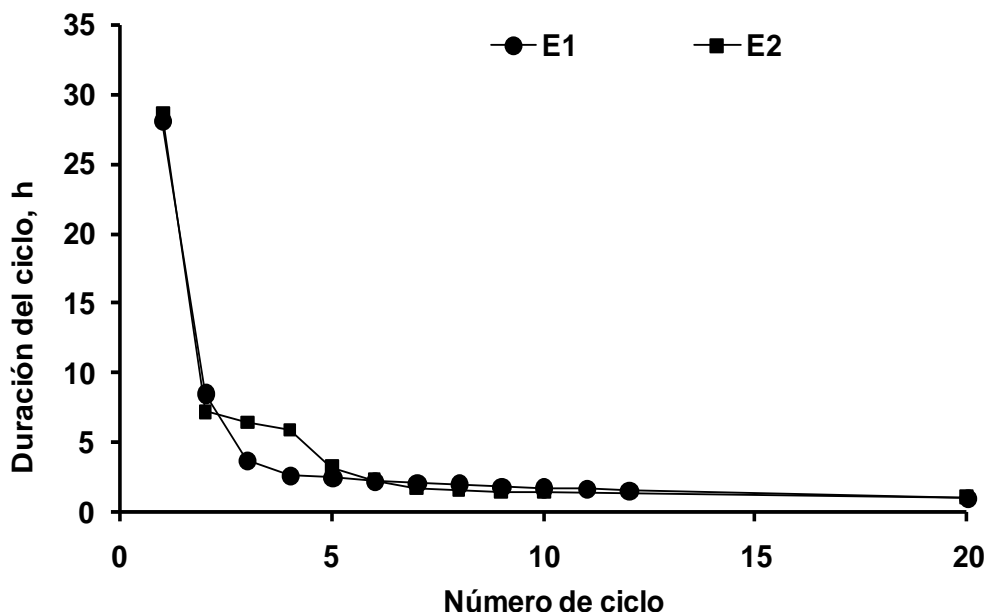


Figura 3.2 Duración del tiempo de los ciclos para la aclimatación a 100 mg/L 4-CF.

La estabilidad y la alta capacidad de degradación de 4-CF que tienen los gránulos aerobios depende principalmente de la estrategia de alimentación utilizada, que en ese caso durante el periodo de aclimatación fue de tiempos variables, logrando tener después de 15 días una biomasa con capacidad de degradar eficientemente 200 mg/L de 4-CF.

Otro método que se ha reportado es el utilizado por Jiang *et al.*, en el 2002 quienes desarrollaron gránulos con capacidad para degradar fenol a partir de lodos activados convencionales que fueron aclimatados por dos meses para degradar de 50 hasta 500 mg/L, y después se aplicó un estrés hidráulico manteniendo los ciclos en un tiempo fijo de 4 horas, logrando gránulos superiores a 0.5 mm después del día 30 con capacidad para degradar grandes cantidades de fenol (2 g/L). La desventaja de utilizar tiempos fijos en la aclimatación es que si en el tiempo establecido no se alcanzó a degradar la totalidad del compuesto tóxico, éste se acumula para el siguiente ciclo, llegando a provocar la inhibición de los microorganismos, por otra parte, si la degradación se lleva a cabo en un tiempo menor al del ciclo, los microorganismos pueden quedar sometidos a un periodo de ayuno tal que degradan en la respiración endógena las enzimas necesarias para la degradación del compuesto tóxico (Buitrón y Capdeville, 1995), perdiendo la capacidad para degradarlos eficientemente, todo esto puede retrasar bastante la aclimatación y ocasionar pérdida de biomasa.

3.2 Influencia de la relación DQO/N en la granulación

3.2.1 Operación del reactor

El tiempo de aclimatación fue alcanzado después de 20 ciclos una vez obtenida una degradación constante de 4-CF. La eficiencia en la remoción de 4-CF alcanzada fue de 99.7% independientemente de la relación DQO/N. La Figura 3.3 presenta la evolución de la degradación de 4-CF para muestras tomadas al día 30 para la relación DQO/N de 20 (R20) y al día 35 para la relación DQO/N de 150 (R150). Para el R20 se tiene un menor tiempo de degradación, lo que indica una mayor tasa volumétrica de remoción, sin embargo, se tiene una mayor cantidad de biomasa en el R20, lo cual tiene un efecto directo en la degradación específica, como se discute posteriormente.

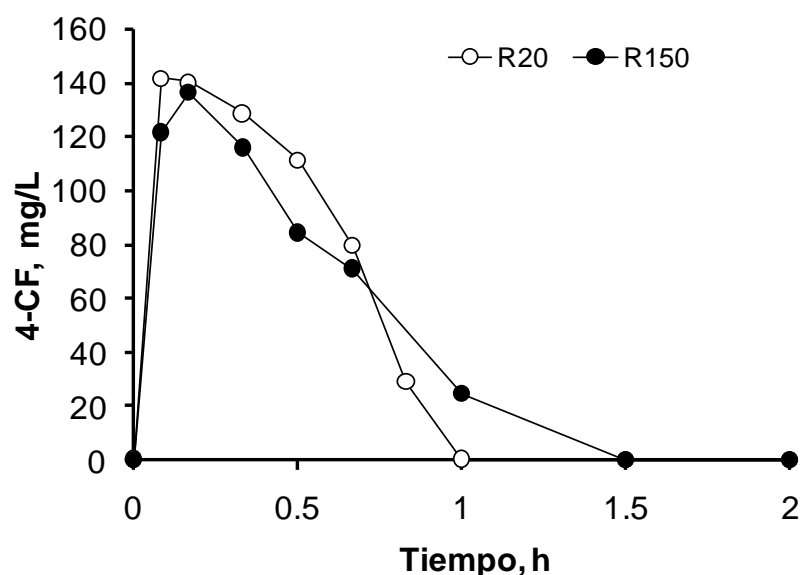


Figura 3.3 Evolución de la degradación de 4-CF para un ciclo tomado al día 30 para R20y día 35 para R150

Con la finalidad de promover la granulación, después de la aclimatación de la biomasa, se fue reduciendo drásticamente el tiempo de sedimentación (15 min. durante la aclimatación y hasta 3 minutos durante los experimentos de la relación DQO/N), condición tuvo como consecuencia la reducción de los sólidos suspendidos debido al lavado de la biomasa. La concentración de SSV se redujo entre los días 10 al 16 de 2 g/L a 1.362 ± 0.2 y 1.104 ± 0.13 g SSV/L para R20 y R150 respectivamente. Los microorganismos que tienen capacidad de formar agregados, conformaron una densa estructura y permanecieron en el reactor. Después entre los días 16 y 40, se alcanzó una concentración estable de biomasa de 3.437 ± 0.329 y 1.775 ± 0.349 g SSV/L para R20 y R150 respectivamente. El crecimiento de biomasa fue limitada debido a la carencia de nitrógeno y finalmente

fue menor para el R150 que para el R20. Se evaluó la tasa de degradación específica (q) considerando la cantidad de 4-CF consumida en el intervalo de tiempo y dividido entre los SSV (Figura 3.4). Para ambas condiciones se observó que la q se incrementa durante la fase de aclimatación. No se encontraron diferencias entre R20 y R150, para R20 el tiempo de degradación fue menor, pero se tiene una mayor concentración de biomasa de manera que la q disminuye en consecuencia (Figura 3.4).

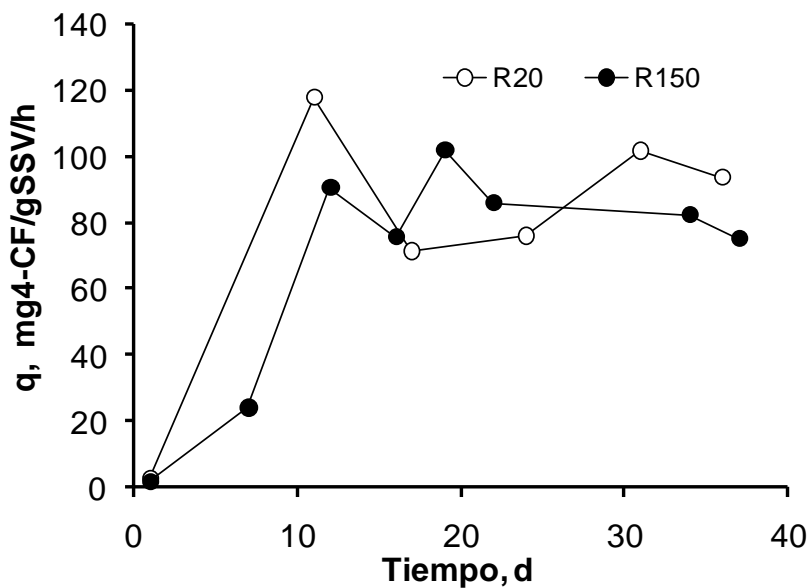


Figura 3.4 Tasa de degradación específica para ambas relaciones.

Las tasas de degradación específicas obtenidas en este estudio son similares a las reportadas previamente para lodo floculento aclimatado por Buitrón y Capdeville, 1995, de 115 mg4CF/gSSV/h, pero mayores a las reportadas por Carucci *et al.*, (2010) de 4.65 mg 4CF/gSSV/h para el lodo granular. Estas diferencias pueden deberse a varios factores, incluyendo al tipo de inoculo y a la estrategia de aclimatación, Para este estudio, primero se aclimataron los lodos activados al 4-CF, y entonces la biomasa fue granulada. Con esta metodología, se espera seleccionar los microorganismos con mayor capacidad de degradación del 4-CF y enriquecer el cultivo. Otras metodologías sugieren primero obtener los gránulos a partir de lodos activados, usando un sustrato de fácil degradación como el acetato de sodio (Tay *et al.*, 2004, 2005) y una vez granulada la biomasa, aclimatarla al compuesto inhibitorio, sin embargo, en la estrategia existe pérdida de potenciales microorganismos degradadores en el inoculo, resultando gránulos con baja capacidad de degradación. En este estudio se demuestra que la adaptación primero del lodo activado al 4-CF, sin un co-sustrato, seguido por la granulación, produce biomasa con una alta tasa de remoción.

3.2.2 Granulación de la biomasa

La biomasa se consideró aclimatada cuando el valor de la q permaneció constante al día 10 (Moreno *et al.*, 2006). En ese punto, el tiempo de sedimentación se redujo gradualmente de 15 minutos (día 11) a 10 minutos (día 12), 5 minutos (día 13) y 3 minutos (día 14), para exponer los flocos a la presión selectiva para formar gránulos.

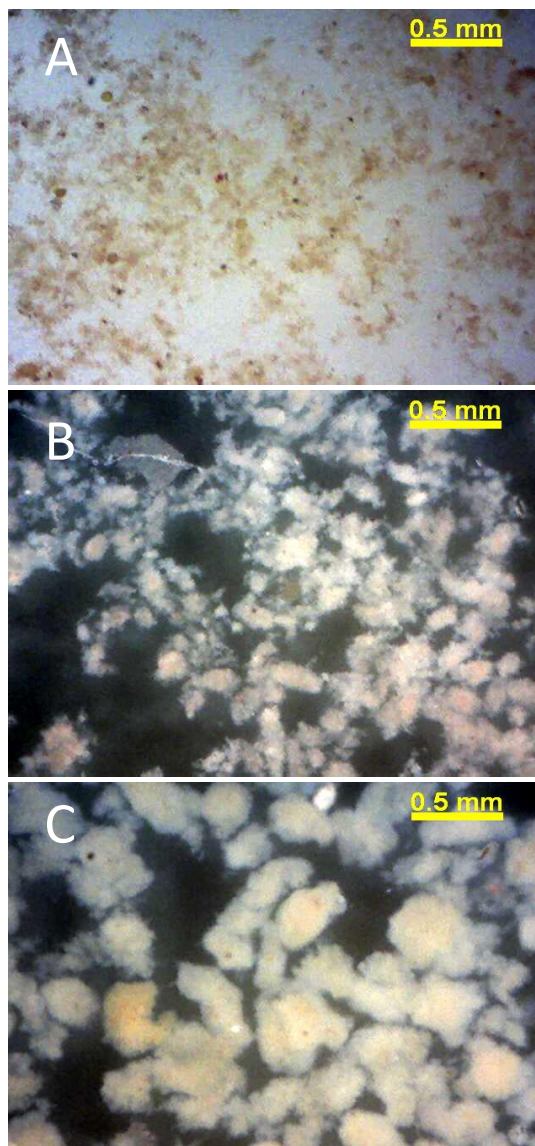


Figura 3.5 Fotomicrografías del inoculo inicial A) y gránulos formados después de 40 días (B) para R20 y (C) para R150.

Del día 14 y hasta finalizar el experimento, los tiempos del ciclo fueron los siguientes: llenado 3 min., reacción 166 min., sedimentación 3 min., y vaciado 8 min. Bajo estas condiciones se observó que la granulación comenzó el día 20 en ambos reactores.

La Figura 3.5 muestra el inoculo inicial (día 1) y los gránulos formados después de 40 días. Se nota que gránulos grandes se forman en R150, después del día 14, cuando se redujo el tiempo de sedimentación, se tuvo un incremento constante del tamaño del gránulo (Figura 3.5). Al finalizar el experimento, las medianas de los tamaños de diámetro fueron 0.328 y 0.741 mm con desviaciones absolutas de 0.082 y 0.103 mm para R20 y R150, respectivamente. Estos resultados demuestran una influencia positiva del estrés causado por la limitación de nitrógeno en el tamaño del gránulo.

El tamaño de los gránulos fue también evaluado mediante la fracción de gránulos con un diámetro mayor a 0.21 mm (Figura 3.6). Se observa que más del 96% de los gránulos tienen un diámetro mayor a 0.21 mm para el R150, pero solamente un 35% de los gránulos cumplen ese criterio para R20. Otros estudios han reportado incrementos del tamaño de los gránulos al incrementar la relación DQO/N, en consecuencia de la limitación de nitrógeno. Por ejemplo, Yang *et al.*, 2005 incrementaron la relación DQO/N de 3.3 a 20, resultando en un incremento del tamaño de los gránulos por un factor de cuatro.

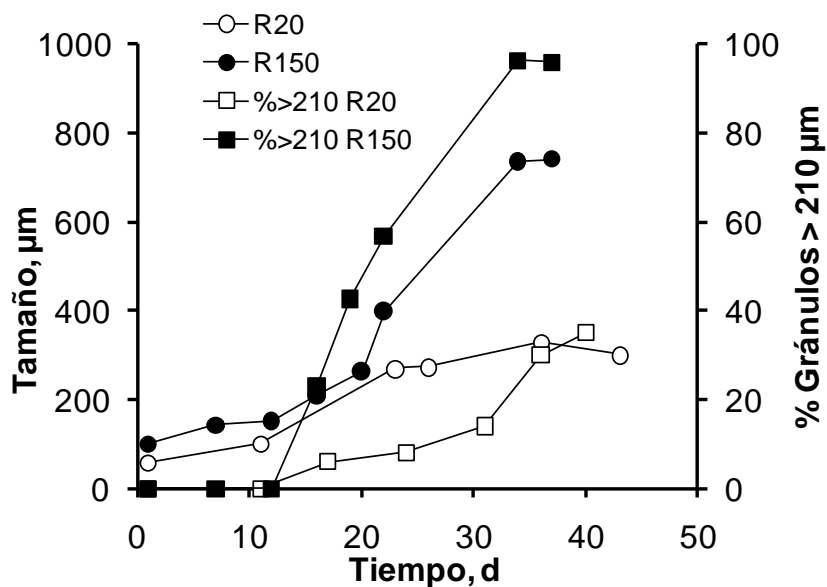


Figura 3.6 Tamaño de gránulo (mediana) y porcentaje de gránulos con diámetro mayor a 0.21 mm durante la operación a diferentes relaciones DQO/N.

El reactor operó con una baja velocidad superficial de aireación de 0.24 cm/s. Es interesante que la granulación se pueda obtener a valores tan bajos. Varios autores reportan que la granulación se alcanza con un límite inferior de velocidad superficial de 1.2 cm/s (Tay *et al.*, 2001, Mc Swain *et al.*, 2005). Sin embargo, nuestros resultados van de acuerdo con los recientes reportes de Gao *et al.*, 2013, quienes han obtenido gránulos con velocidades de 0.58 cm/s y mantenido esos gránulos a 0.14 cm/s. Los resultados obtenidos muestran que no solo se pueden mantener los gránulos a una baja velocidad superficial de aireación, sino que se puede llevar a cabo la granulación aerobia.

Después del primer día que se disminuyó el tiempo de sedimentación, se observó un claro incremento en la velocidad de sedimentación (V_s) para R150 (Figura 3.7). Después de 20 días, la V_s se estabilizó en 15.6 ± 0.09 m/h para la relación, a su vez, para R20. La V_s no cambió mucho, estabilizándose a 4.4 ± 1.1 m/h (Figura 3.7).

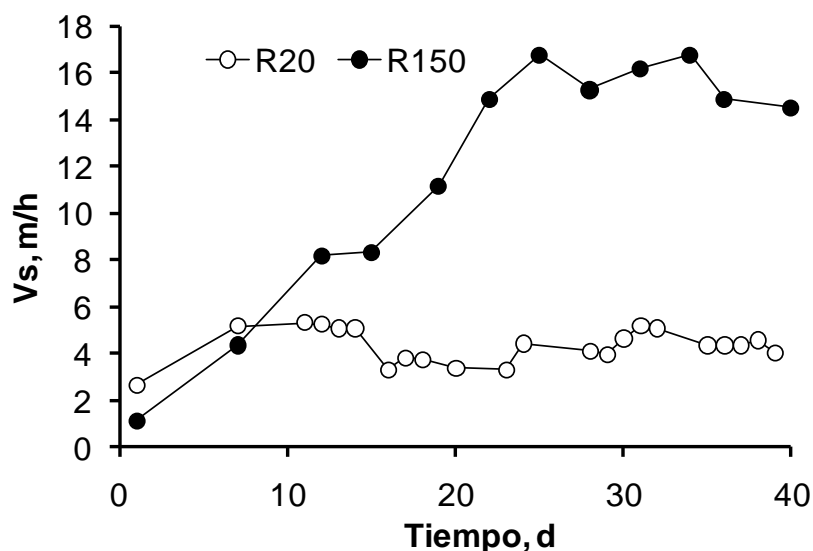


Figura 3.7 Velocidad de sedimentación V_s en función del tiempo para las relaciones R20 y R150.

El índice volumétrico de lodos IVL se evaluó a 5 (IVL5) y 30 (IVL30) minutos para ambos reactores. En general, los gránulos muestran excelentes propiedades de sedimentación, en ambos casos, los IVL y las V_s son superiores a las encontradas en los lodos activados convencionales. Como una consecuencia de la aclimatación de la biomasa al 4-CF, los IVL disminuyen gradualmente para ambos reactores y del día 20 al día 40 (cuando se promueve la granulación), se estabiliza el IVL. No se observa un efecto significativo de la relación DQO/N para el IVL30, con valores de 41 ± 14 mL/g y 55 ± 16 mL/g para R20 y R150 respectivamente. Por el contrario, y consistente con la V_s , el IVL5 presenta un menor valor (56 ± 12 mL/g) para R150 que el obtenido para el R20 (76 ± 14 mL/g), indicando que una biomasa más densa se produce bajo condiciones limitadas de nitrógeno.

3.2.3 Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

Las EPS consisten en una mezcla de proteínas carbohidratos, polisacáridos, lípidos, ADN, y sustancias húmicas, los cuales rodean las células y crean una matriz en las biopelículas microbianas y en los flóculos de lodos activados (Ng *et al.*, 2005, McSwain *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2001). En la Figura 3.8 se presenta los valores promedios para polisacáridos libres y ligados para ambas relaciones DQO/N, tomados del día 22 al día 40. La condición limitada de nitrógeno promueve la formación de

polisacáridos. Bajo la condición R150, se observan incrementos del 58% y 300% con respecto a R20 para polisacáridos ligados y libres respectivamente.

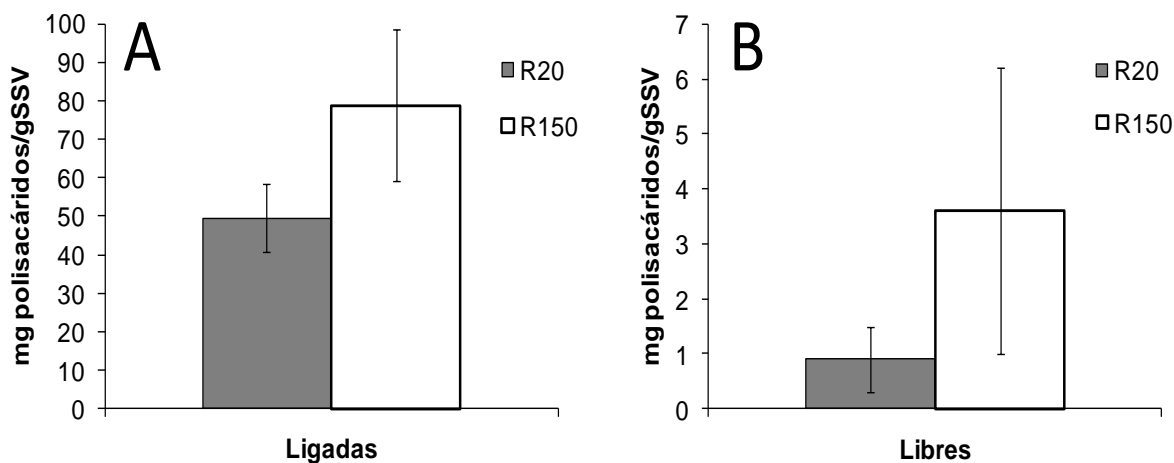


Figura 3.8 Cantidad promedio de polisacáridos por SSV para ligados (A) y libres (B) para ambas relaciones DQO/N, tomados del día 22 al día 40.

Se ha demostrado que bajo condiciones limitadas de nitrógeno, los microorganismos tienden a almacenar carbono en polímeros como el glicógeno, polihidroxialcanoatos y lípidos (Heldal *et al.*, 1996; van Loosdrecht *et al.*, 1997) y la producción de polisacáridos se incrementa (Flemming y Wingender, 2010). Los polisacáridos como el alginato y el curdlan son producidos por las bacterias bajo condiciones desbalanceadas de nitrógeno, por ejemplo, alta productividad de alginato se ha obtenido en cultivos limitados de nitrógeno de *Pseudomonas* (Shenga *et al.*, 1987), adicionalmente, una matriz de biofilm como curdlan se observó para *Cellulomonas* en cultivos bajo condiciones limitadas de nitrógeno (Young *et al.*, 2011). De modo que, la formación de gránulos grandes bajo condiciones limitadas de nitrógeno (R150) puede explicarse por el incremento en los polisacáridos, cuando se promueve la formación de una matriz de biopelícula.

Los EPS fueron evaluados por la suma del contenido de polisacáridos y proteínas. La figura 3.9 y 3.10 muestran los F-EPS y B-EPS en función del tiempo para las dos condiciones de relación DQO/N. Los resultados muestran que concentraciones mayores se obtienen para F-EPS con la relación R150, y después del día 35, se tiene un incremento considerable para los F-EPS. A su vez, la diferencia para B-EPS es menos considerable debido a la alta variación en los valores. Si se toma en cuenta los EPS totales, para el periodo en que se formaron los gránulos (día 20 al 40), se observa una mayor concentración (194 ± 27 mgEPS/gSSV) para el caso de R150 con respecto a R20 (171 ± 42 mgEPS/gSSV), respectivamente. Resultados similares se han obtenido para un reactor discontinuo

secuencial de membrana con flóculos (Li *et al.*, 2008). Estos autores reportan para B-EPS y F-EPS totales, concentraciones de 140 mgEPS/gSSV y de 2 a 14 mgEPS/gSSV, respectivamente. El incremento en los EPS se ha reportado como el inicio del proceso de granulación (Liu y Tay, 2002; Tu *et al.*, 2010), debido a la capacidad que tienen los EPS de atrapar a los microorganismos uno con otro e inmovilizarlos en gránulos. El incremento en los EPS también va de acuerdo a lo reportado por Tay *et al.*, 2001b, quienes encuentran que la cantidad de EPS en gránulos aerobios es de dos a tres veces mayor que para lodos floculentos.

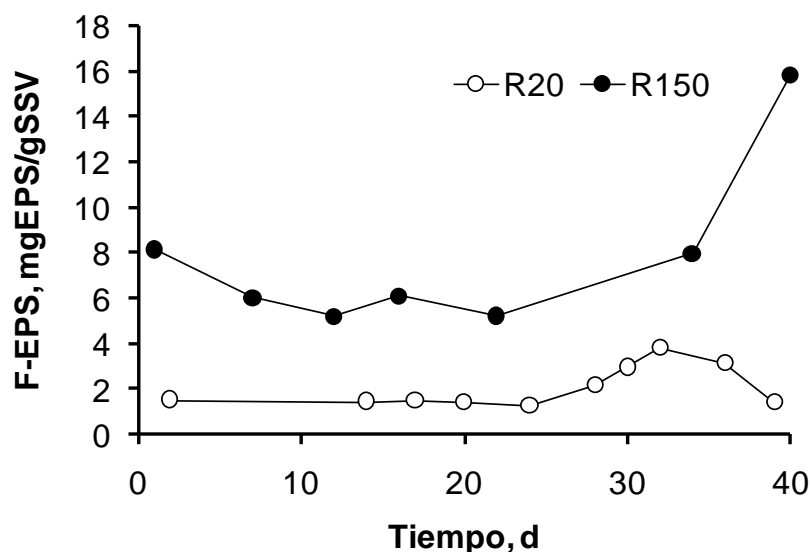


Figura 3.9 Producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) a diferentes relaciones DQO/N. EPS libres.

La relación proteínas (PN)/ polisacáridos (PS) se evaluó para R20 y R50 considerando ambos valores, las ligadas (B-PN/PS) y las libres (F-PN/PS). En el caso de R150, la relación B-PN/PS y F-PN/PS fue de 2.1 ± 0.9 y 2.1 ± 0.6 , respectivamente. Para R20 las concentraciones obtenidas fueron 2.5 ± 1.6 y 1.6 ± 0.6 para B-PN/PS y F-PN/PS, respectivamente. Valores similares para la relación PN/PS ha sido reportada por otros autores para biomasa granular (Li *et al.*, 2008; McSwain *et al.*, 2005), en este estudio se encontró una mayor cantidad de proteínas que de polisacáridos en los EPS para ambas relaciones DQO/N. Se ha propuesto que las proteínas representan el componente hidrofóbico mientras que los polisacáridos el componente hidrofílico de los EPS, siendo las proteínas responsables también de la formación de agregados microbianos (Li *et al.*, 2008). Este estudio demuestra que la limitación de nitrógeno tiene un efecto significativo sobre la relación PN/PS.

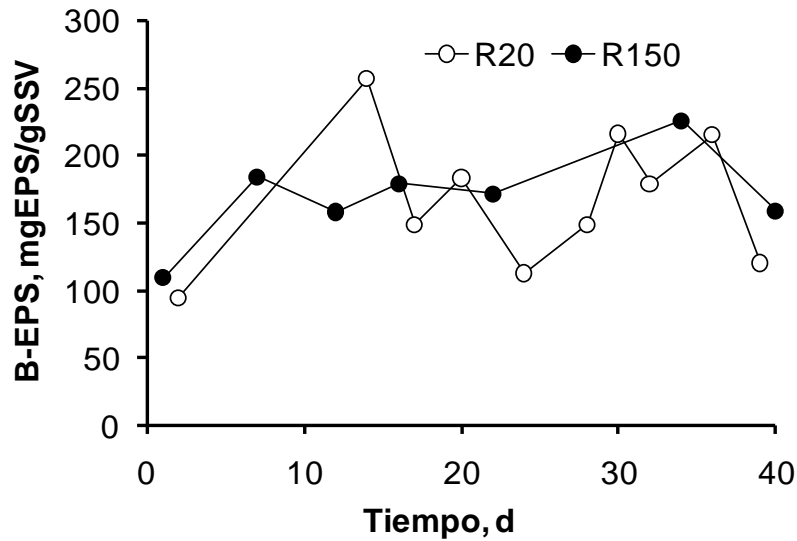


Figura 3.10 Producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) a diferentes relaciones DQO/N, EPS ligados.

3.3 Operación del biorreactor con membranas sumergidas

3.3.1 Aclimatación

En primer lugar, la biomasa se aclimató para degradar 100 mg/L de 4-CF por 20 ciclos y después a 200 mg/L por otros 20 ciclos. Una vez que la biomasa fue aclimatada a degradar 200 mg/L de 4-CF, se comenzó con la etapa de granulación, acortando gradualmente el tiempo de sedimentación desde 15 minutos y hasta llegar a 3 minutos al día 5 con la finalidad de aplicar una presión selectiva que permitiera eliminar del reactor a la biomasa floculenta.

La forma de operar el reactor ocasionó una disminución en la concentración de sólidos suspendidos. Al reproducirse los microorganismos, se observó que la concentración de SSV se mantuvo estable (Figura 3.11). En ese momento se aplicó una purga diaria de 200 mL con la finalidad de tener un tiempo de retención de sólidos de 20 días. El inóculo inicialmente tuvo una buena sedimentabilidad con un IVL de 130 mL/g, lo cual fue aprovechado para que desde el inicio aplicar un tiempo de sedimentación de 15 minutos, que fue disminuyendo conforme se redujo el IVL (Figura 3.12) 10, 5, hasta llegar a 3 minutos para el día 35.

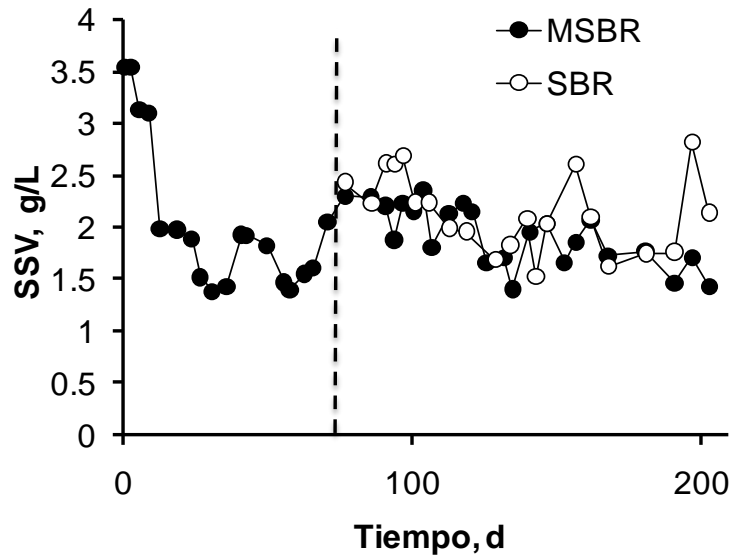


Figura 3.11 Variación de los sólidos suspendidos durante el tiempo de operación. La línea punteada indica el momento de introducción de la membrana.

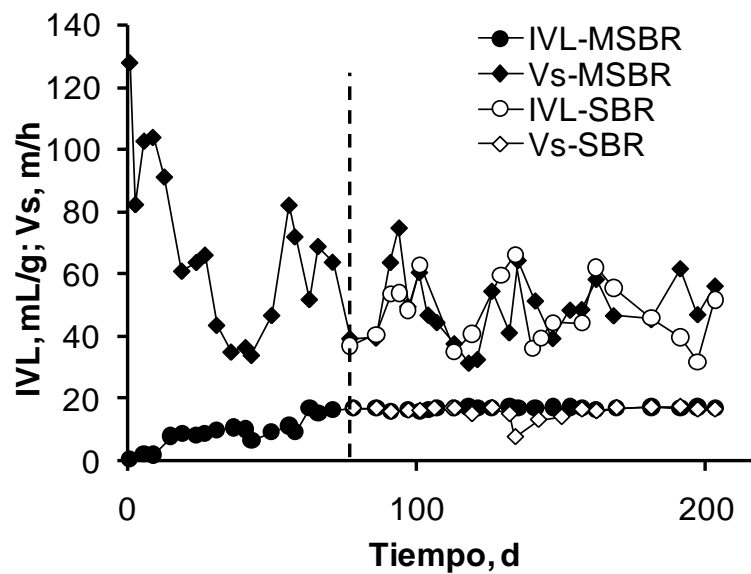


Figura 3.12 Variación del IVL durante el tiempo de operación. La línea punteada indica el momento de introducción de la membrana.

3.3.2 Granulación

La remoción de 4-CF se mantuvo superior al 99% durante el transcurso del experimento, a partir de la introducción de la membrana se observó una mejoría en la DQO total de salida que fue de 18.2 ± 4.8 en el MSBR, mientras que en el SBR fue de 78.6 ± 20.6 , esto debido a la retención de sólidos por la membrana en el MSBR (Figura 3.13).

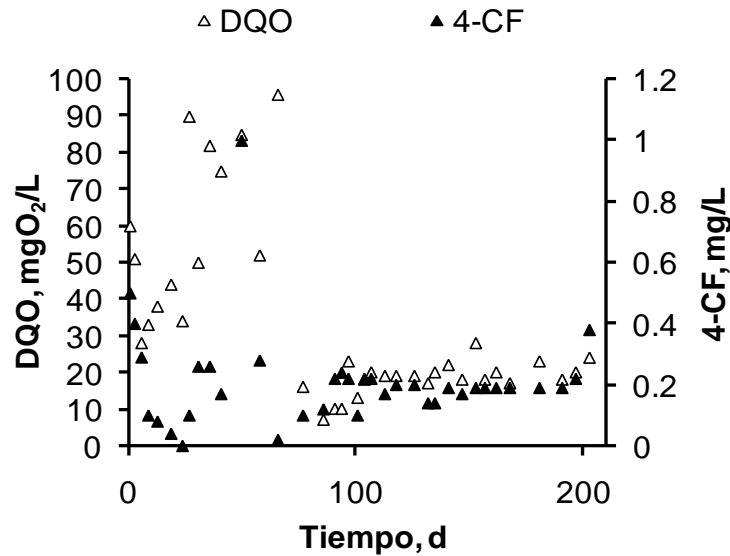


Figura 3.13 Concentración en el efluente de 4-CF y DQO para el reactor con membrana.

A los 7 días comenzaron a formarse los primeros aglomerados, y al día 24 los gránulos alcanzaron un tamaño aproximado a 0.5 mm con un porcentaje de granulación superior al 70 %. El tamaño de los gránulos se incrementó a partir del día 70 de 0.6 mm a 2.5 mm (Figura 3.15). En ese día se introdujeron las membranas al sistema (día 73). Al mismo tiempo como referencia se operó de manera simultánea otro reactor sin membranas. Como se observa en la figura 3.13, el diámetro de los gránulos no se vio afectado como consecuencia de la introducción de la membrana, manteniendo un promedio de 2.56 ± 0.3 mm y de 2.43 ± 0.39 mm para el SBR y el MSBR respectivamente, esto porque al mantener la alimentación y la regularidad de los ciclos se pudo estabilizar la carga orgánica, de forma que el porcentaje de gránulos fue de 90.6 ± 8.4 % y 86.2 ± 8.2 % para el SBR y el MSBR respectivamente (Figura 3.15).

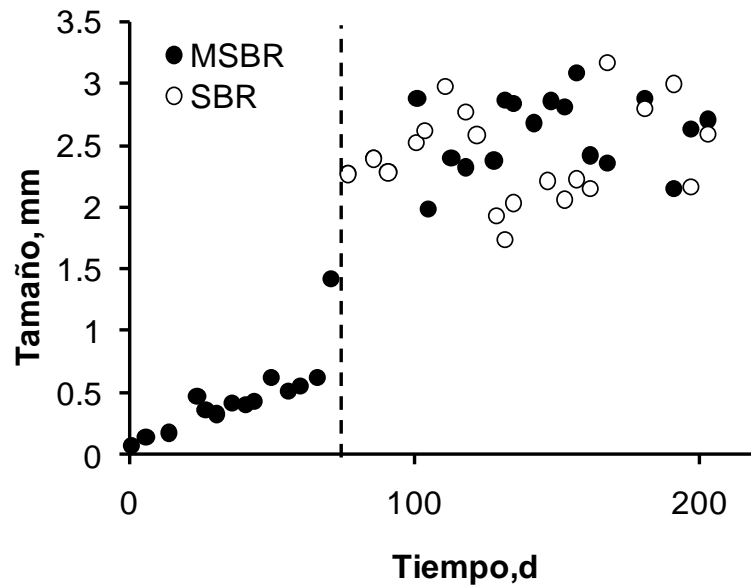


Figura 3.14 Variación del diámetro de los gránulos durante el tiempo de operación.

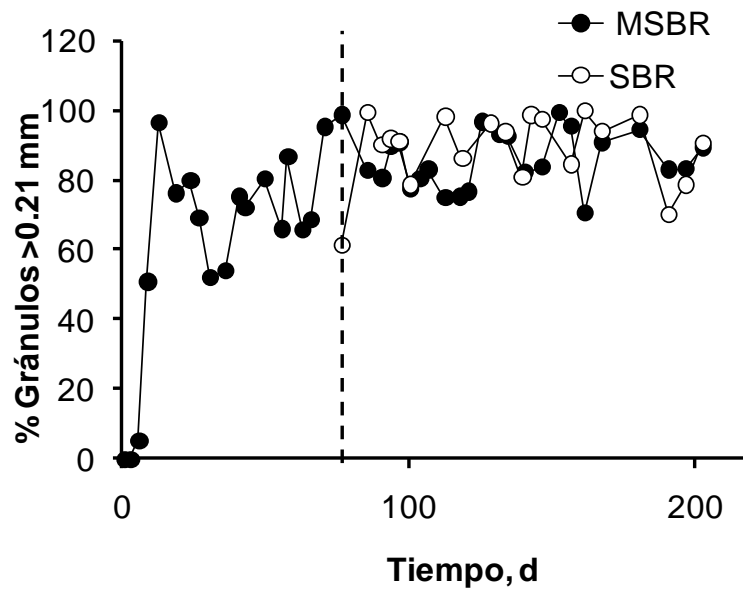


Figura 3.15 Variación del porcentaje de granulación durante el tiempo de operación.

Se dio seguimiento a la producción de EPS. Se observó un incremento en la concentración de los EPS libres desde 2 hasta 19.3 mgEPS/gSSV desde el día 3 al punto de granulación en el día 27, después se mantuvieron estables incluso se observa una pequeña disminución y al final del experimento se incrementa la concentración en el MSBR (Figura 3.16) teniendo algunos repentes que no se observaron en el reactor SBR y que coinciden con los puntos máximos de colmatación de las membranas, lo cual es importante, pues esto muestra que los EPS libres son retenidos por las membranas, como lo reportan

Moreno-Andrade y Buitrón 2012. Una variación similar se observó en los dos reactores para la concentración de EPS ligados hasta el día 100 (Figura 3.17).

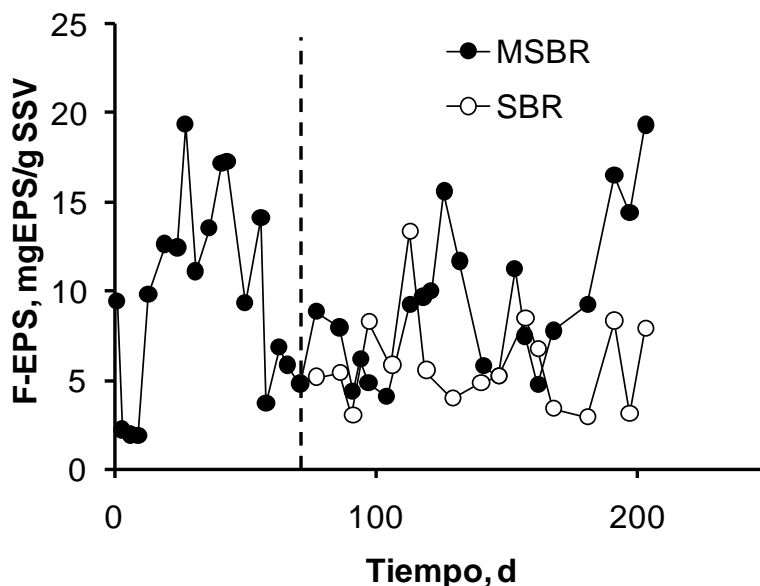


Figura 3.16 Concentración de EPS-libres durante el tiempo de operación.

Se consideró que carga másica C_m tiene un efecto importante en todo sistema de tratamiento, por lo que se procuró que fuera lo más uniforme posible manteniéndola entre 0.5 y 0.6 g4-CF/gSSV/d (Tabla 4.1), esto se logró fijando los ciclos en un tiempo cercano a 4 h. La velocidad de sedimentación de los gránulos obtenida fue a partir del día 73 de 15.7 ± 2.2 y 16.8 ± 2.4 m/s para el SBR y MSBR respectivamente, sedimentando prácticamente en un minuto.

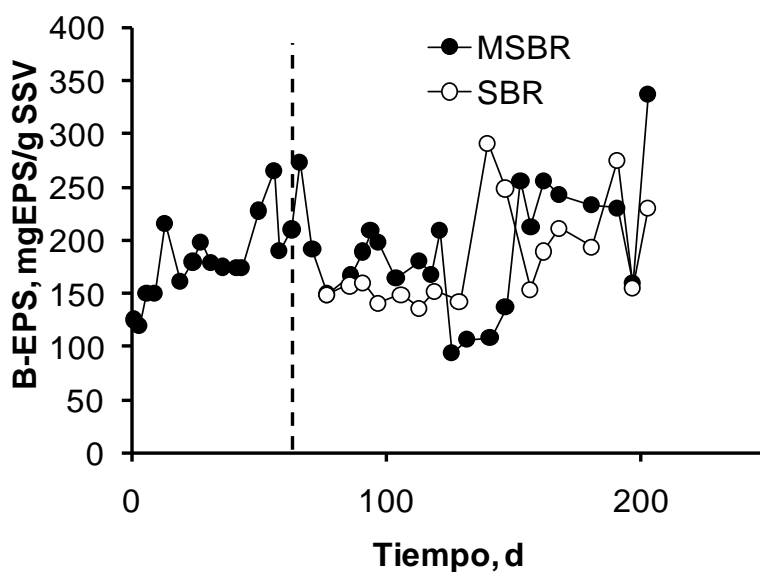


Figura 3.17 Concentración de EPS-ligados durante el tiempo de operación.

La tasa de degradación disminuyó a partir del momento de la introducción de la membrana, sin embargo, ésta disminución se observa en ambos reactores (Figura 3.18) por lo tanto, la disminución no es causada por el hecho de introducir la membrana, como se podría suponer, sino que se debe más bien a las características de la biomasa, pues coincide con el crecimiento de los gránulos a un tamaño mayor a 2.5 mm. Se ha reportado que los microorganismos con mayor actividad se encuentran en la superficie del gránulo, mientras que los que se encuentran en el interior tienen una menor disponibilidad de sustrato por la resistencia de la matriz a la difusión (Tay *et al.*, 2002c), de manera que, la mayor parte de la biomasa del gránulo tiene una baja actividad.

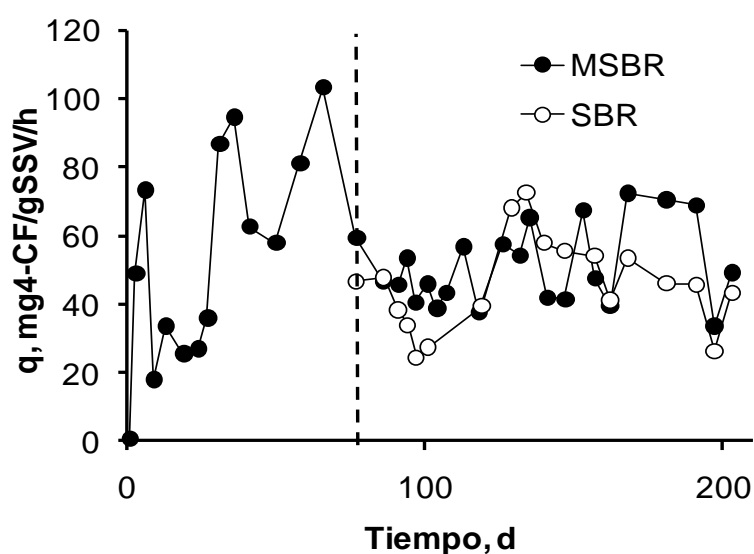


Figura 3.18 Variación de la Tasa de degradación durante el tiempo de operación.

3.3.3 Filtración

Con la finalidad de comparar las características de la biomasa granular y lodos activados convencionales, se realizaron pruebas preliminares de filtración a corto plazo de la siguiente manera: se colocó la misma cantidad de lodo floculento y de gránulos aerobios en una probeta de 1 L con aire suministrado mediante un difusor colocado en el fondo de la probeta, el flux se incrementó de manera escalonada y después descendente, se observó (Figura 3.19) que existe diferencia significativa en la resistencia entre los flóculos y los gránulos, llegando los primeros a impedir la filtración a más de 35.6 L/m²/h, debido al depósito de lodo floculento sobre la membrana, el aumento de la resistencia por la colmatación para lodos floculentos es mayor conforme se incrementa el flux, pasando de 4 a 8 x10¹² m⁻¹ en cambio en la filtración con gránulos el incremento en la resistencia es solamente de 1 x10¹² m⁻¹.

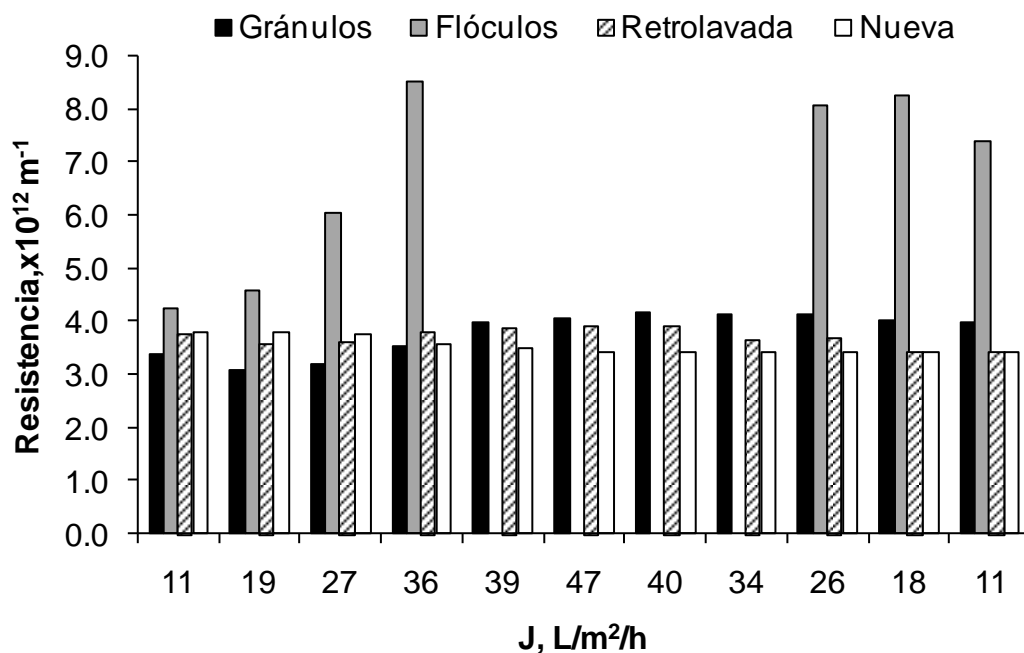


Figura 3.19 Resistencia de la membrana durante las pruebas de filtración a corto plazo.

De igual forma se evaluó en el reactor, mediante pruebas de filtración a corto plazo, el efecto de la intensidad de aireación con tres condiciones (0.5, 1 y 2 Lpm) y de de la cantidad de SSV (1.33, 2 y 4 g/L) en la PTM. En la Tabla 3.1 se observa que la cantidad de SSV ejerce una mayor influencia sobre la PTM y que a 4 g/L de sólidos, la variación en la intensidad de aireación prácticamente no afecta a la PTM, a partir de las pruebas de filtración a tiempos cortos se pudo determinar que lo que más afecta al desempeño de la membrana es la cantidad de sólidos suspendidos y la agregación de la biomasa.

Estos resultados contrastan con lo reportado por Le Clech *et al.*, 2003 quienes afirman que para reactores MBR con lodos flocculentos la cantidad de SST no tiene un efecto significativo en la colmatación de la membrana, posiblemente esa conclusión se deba a al efecto de la turbulencia ejercida por la aireación en éstos experimentos, sin embargo en los resultados aquí presentados se observa que ante una menor intensidad de aireación, el transporte y el depósito de la biomasa a la superficie, esto es la colmatación, está directamente relacionado con la cantidad de sólidos.

Tabla 3.1 PTM (kPa) en las pruebas de filtración a corto plazo.

| SSV \ aireación | 0.5 Lpm | 1 Lpm | 2 Lpm |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| J= 22 L/m ² /h | | | |
| 1.33 g/L | 5.4 ± 0.4 | 5.9 ± 0.16 | 5.1 ± 0.15 |
| 2 g/L | 8.2 ± 0.21 | 7.7 ± 0.21 | 7.9 ± 0.16 |
| 4 g/L | 10.1 ± 0.24 | 10.2 ± 0.23 | 10.2 ± 0.28 |
| J= 26 L/m ² /h | | | |
| 1.33 g/L | 6.4 ± 0.2 | 6.9 ± 0.2 | 6.6 ± 0.2 |
| 2 g/L | 9.1 ± 0.3 | 8.7 ± 0.2 | 8.8 ± 0.2 |
| 4 g/L | 10.8 ± 0.3 | 10.9 ± 0.2 | 11.0 ± 0.4 |
| J= 30 L/m ² /h | | | |
| 1.33 g/L | 7.3 ± 0.3 | 7.9 ± 0.3 | 7.0 ± 0.3 |
| 2 g/L | 9.1 ± 0.3 | 9.3 ± 0.3 | 9.6 ± 0.6 |
| 4 g/L | 11.5 ± 0.5 | 11.6 ± 0.5 | 11.7 ± 0.5 |

3.3.4 Colmatación de la membrana

La operación de la membrana en el reactor, inició con un flux de 30 L/m²/h, lo que ocasionó un rápido incremento en la presión transmembrana (PTM), llegando a 50 kPa, a la primer semana de operación, por lo tanto, tuvo que llevarse a cabo la limpieza química. Debido a ese comportamiento, se disminuyó el flux a 22 L/m²/h, y 18 L/m²/h, hasta que se estabilizó la operación en 12 L/m²/h, con una tasa de colmatación de 0.345 kPa/h de operación. Así se logró mantener la filtración por 14 días antes de aplicar el lavado químico (Figura 3.20).

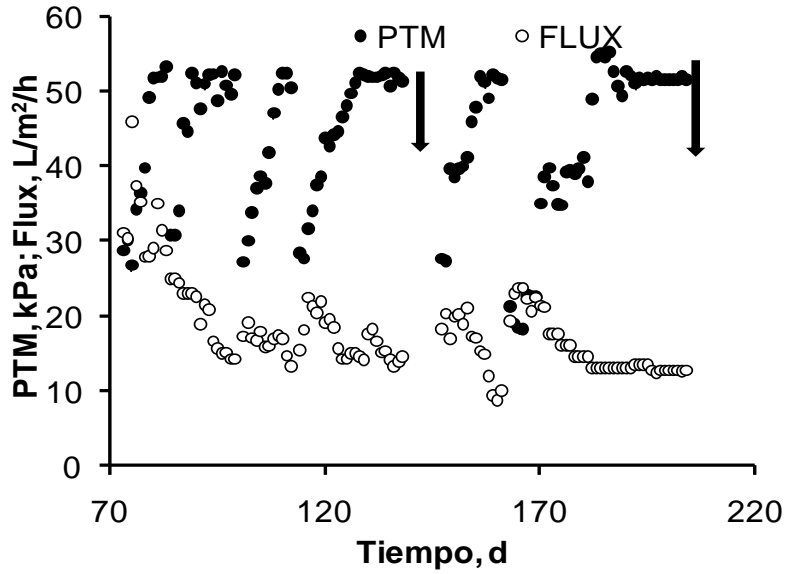


Figura 3. 20 Variación de la PTM y el Flux.

Las resistencias en serie se calcularon de manera previa al lavado químico, a 2 semanas de iniciada la operación y otra a 4 semanas de operación continua. Se observó que la resistencia por biotorta R_b se había incrementado del 45 al 65 %. Es posible que esa colmatación se deba al crecimiento de una biopelícula en la superficie de la membrana. Como puede verse en las imágenes de la Figura 3.21, la biomasa cubre casi la totalidad de la superficie de la membrana a las 4 semanas de operación.

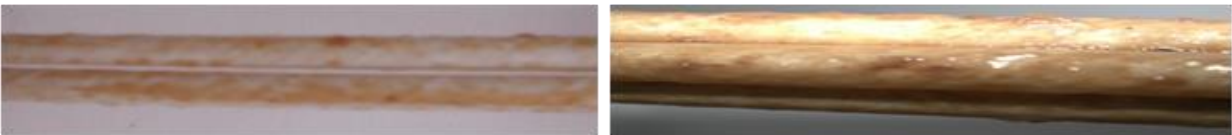


Figura 3. 21 Membrana colmatada, a) 2 semanas de operación, b) 4 semanas de operación.

En términos generales, el efluente obtenido en la operación MSBR tiene una mejor calidad en cuanto a sus propiedades físicas (Tabla 3.2) como son color, turbiedad y sólidos suspendidos, al ser estos últimos retenidos por las membranas se obtiene además una disminución en la DQO total del efluente, como se aprecia en la Figura 3.13.

Tabla 3.2 Comparación entre SBR y MSBR.

| | SBR | MSBR |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Q (mg4-CF/gSSV·h) | 51.1 ± 11.6 | 45.7 ± 13.3 |
| OLR (g4-CF/gSSV·día) | 0.62 ± 0.09 | 0.53 ± 0.12 |
| OLRv (Kg4-CF/m ³ ·día) | 1.17 ± 0.21 | 1.22 ± 0.21 |
| Turbiedad (FAU) | 61.7 ± 30 ^a | 0.5 ± 0.5 ^b |
| SS (mg/L) | 43.8 ± 15.2 ^a | 0.5 ± 0.5 ^b |
| Color (UPt-Co) | 133.5 ± 26.3 ^a | 12.7 ± 3.3 ^b |
| DQO Efl. (mgO/L) | 78.6 ± 20.6 ^a | 17.9 ± 5.04 ^b |
| Remoción DQO (%) | 97.2 ± 0.84 ^a | 88.3 ± 2.77 ^b |

^{ab} medias estadísticamente diferentes para un pueba ANOVA p, 0.05.

La biopelícula externa provocó que se redujera la colmatación reversible de los poros, esto hizo poco efectivos los retrolavados. De acuerdo con lo obtenido (Figura 3.22), se observó un incremento de casi un 20% en la resistencia debida a la biotorta (R_b) y una disminución del 90% en el bloqueo de poros reversible (R_{pr}) y de un 5 % en el irreversible (R_{pi}), esto hace suponer que la biotorta es en realidad una biopelícula que no se alcanza a desprender con los retrolavados, y para corregirlo se requiere de un lavado químico.

A pesar de lo importante que resulta la resistencia debida a la biotorta el valor de la resistencia es mucho menor a la reportada para los sistemas MBR con lodos activados convencionales, la cual puede llegar a valores que se encuentran entre el 80-90 % de la resistencia total (Chen *et al.*, 2007b).

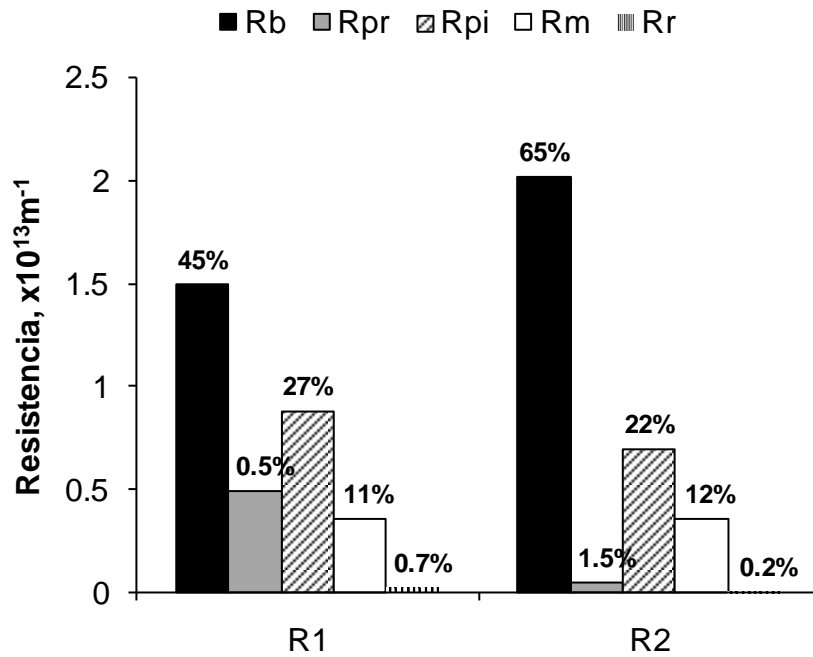


Figura 3. 22 Resistencias en serie para R1, una semana; R2 dos semanas de operación donde: R_b, resistencia de la biocapa; R_{pr}, resistencia de bloqueo de poros reversible; R_{pi}, resistencia de bloqueo de poro irreversible; R_m resistencia intrínseca de la membrana; R_r, resistencia residual.

La formación de biopelícula superficial no ha sido reportada en estos sistemas, en los cuales normalmente la colmatación se debe a una biotorta consistente en lodos depositados y posteriormente comprimidos por la corriente del flujo al filtrar, fenómeno difícil de ocurrir con los gránulos debido a sus características físicas, ya que éstos tienen mayor tamaño y peso, con una menor comprensibilidad que los flóculos. En este caso se observó el depósito en la membrana de los EPS, bacterias libres y flóculos que se encuentran en el licor mezclado y que se incrementan por el crecimiento bacteriano en la superficie y por la llegada de nuevas partículas. Una vez que la biopelícula crece, los microorganismos pioneros que se depositaron en los poros y en las zonas más cercanas a la membrana tienen poco acceso a los nutrientes, comparado con los que se encuentran en las capas superficiales, de manera que disminuye el bloqueo de poro, sin embargo también disminuye el flux al no ser eliminada la biopelícula por los retrolavados.

Zhou *et al.*, (2007), reportaron diferencias en pruebas de filtración a corto plazo entre lodos floculentos y lodos granulares, siendo para los lodos floculentos la R_b el principal componente en la resistencia con un 72.7% mientras que para los lodos granulares una R_b de 34.7 %, siendo para estos últimos la R_p de 44.2 y para floculentos 16.6%, la diferencia con el comportamiento reportado en este trabajo puede deberse a la efectividad de los retrolavados en eliminar el boqueo de poro.

Con la finalidad de observar la estructura de la colmatación, durante la operación del reactor de membranas sumergidas con lodos granulares, se tomaron varias muestras para realizar autopsias de las membranas. En las Figuras 3.23 se observan los cortes transversales tomados de la membrana operada el día 70 de la filtración con un TRH de 8 horas y una C_m de 0.63 mg4-CF/gSSV/d con ciclos de 4 horas. En estos cortes se observa la formación típica de las biopelículas con forma de hongo (Champiñón), el cual se encuentra enraizado en la estructura interna de la membrana, también se observan aglomerados de polisacáridos al interior de la membrana y del material de soporte.

Para el día 70 de la operación (Figura 3.23) con membrana, al término del experimento, se observa la membrana cubierta en un 64.8 % de biocapa y un 14 % de polisacáridos considerando el espacio que se encuentra sin biomasa. El modelo de resistencias en serie (Rosenberger *et al.*, 2005) hace una distinción ente los distintos tipos de resistencia, sin embargo al utilizar la microscopia CLSM para saber las causas de cada tipo de resistencia, se observó que la R_p se debe principalmente a exopolímeros que se depositan en los poros hasta hacer impermeable la membrana, mientras que la R_b se debe principalmente a bacterias depositadas en la superficie y que crecen hasta formar una biopelícula.

La formación de biopelícula interna ha sido reportada previamente por Juang *et al.*, (2010), estos autores determinaron que está formada por microorganismos de diámetro pequeño los cuales pueden cruzar la membrana y establecerse en el espacio interno de la membrana. En el presente estudio se encontró a manera de hipótesis que posiblemente existe una competencia en el crecimiento tanto de la biopelícula externa como interna a largo plazo, propiciada principalmente por la disponibilidad de sustrato. En otros estudios, se ha reportado un mejor desempeño en la filtración de los gránulos aerobios que los lodos activados convencionales al corto plazo (Li *et al.*, 2005), sin embargo éstos autores observaron un incremento a largo plazo en la colmatación irreversible, debido a la adsorción y depósito de los EPS en el interior y la superficie de la membrana, lo cual coincide con los resultados de éste estudio.

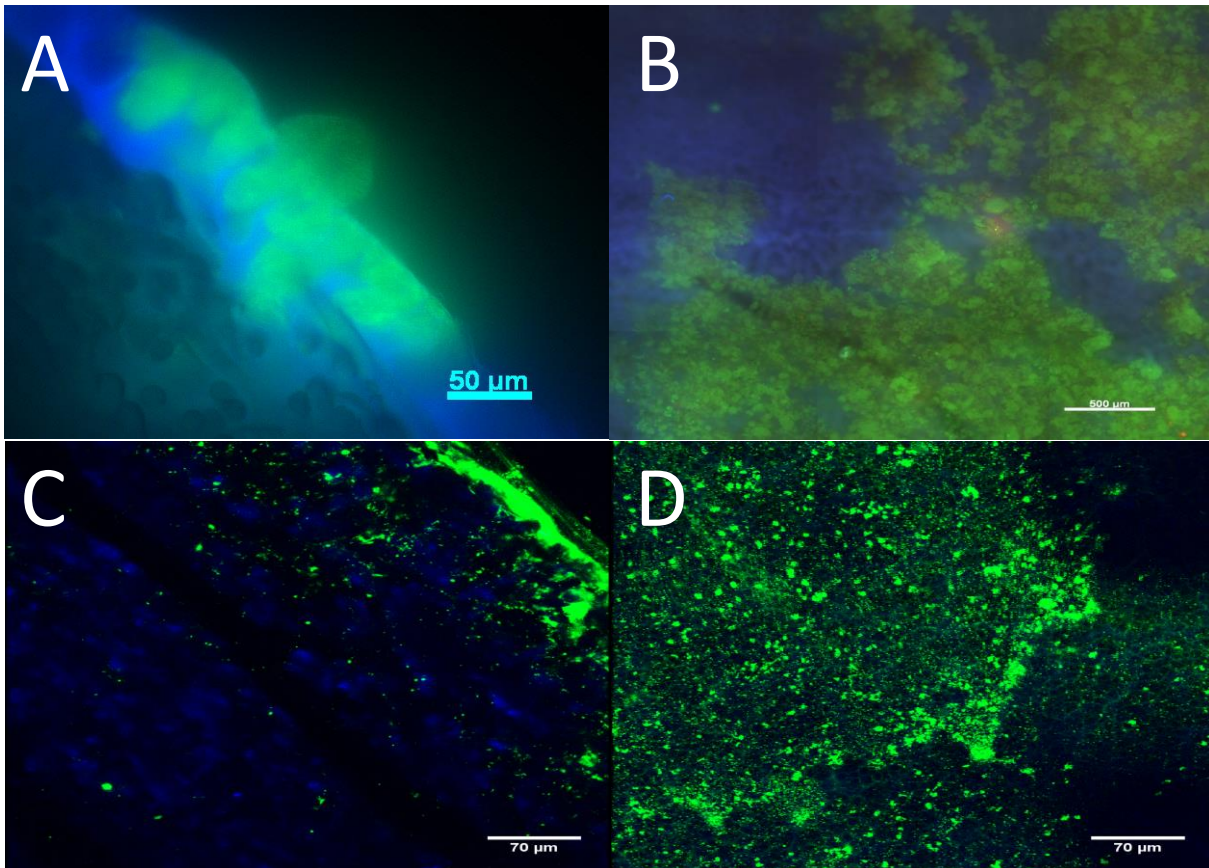


Figura 3. 23 A)) Proyección de corte transversal de la membrana colmatada en el microscopio de fluorescencia con objetivo 40X. B) Imagen de un crecimiento superficial de biopelícula en la membrana teñida con CW (polisacáridos, azul) y Sytox Green (células, verde) con objetivo, 25X al día 70 de la operación. Imagen de CLSM transversal (C) y superficial (D), CW con Sytox Green 10X cortes de la membrana del día 130 de la filtración de color verde se observan los microorganismos teñidos con Sytox Green y de azul los polisacáridos teñidos con Calcofluor White (barra 70 µm) 20X.

En un estudio previo (Moreno-Andrade y Buitrón, 2012) se comparó el desempeño de un reactor con membranas y otro sin membranas usando lodos floculentos, estos autores reportan que en ese caso la membrana no otorga beneficios suficientes al sistema y causa una acumulación de EPS. En esto coinciden con las observaciones de Li *et al.*, 2007, en el presente estudio se observó también acumulación de EPS cuando se opera con lodos granulares, lo cual se propone evitar mediante la intercalación de ciclos de decantado (SBR) entre los ciclos de filtración (MSBR), como una estrategia de anticólmatación (sección 3.5).

3.4 Estructura y morfología del proceso de colmatación

3.4.1 Resultados de la evaluación de la estructura en la colmatación

Se operó el reactor con membranas sumergidas y gránulos aerobios dando continuidad al experimento anterior por 80 días sin lavado químico con la finalidad de evaluar el proceso de colmatación. Durante ese tiempo la eficiencia en la remoción de la DQO fue de 97.5 ± 1.1 y de 99.9 ± 0.1 para el 4CF, se observó una disminución en la cantidad de sólidos durante los primeros 25 días de operación, por lo que se optó por no retirar lodo de purga, hasta alcanzar una concentración estable de aproximadamente 1 g/L de SSV (Figura 3.24). El porcentaje de gránulos con un tamaño mayor a 0.21 mm en la biomasa fue en promedio de 78.6 ± 16.4 %, que disminuyó hasta alcanzar 46% al día 60 cuando se observó lodo floculento en el reactor, sin embargo no hubo variaciones importantes en el tamaño de los gránulos los cuales mantuvieron un promedio de 2.46 ± 0.16 mm en el diámetro, esto significa, que aunque hubo menos gránulos, el tamaño permaneció igual.

A partir de día 65 se tiene un repunte en el porcentaje de granulación el cual aumenta del 46% hasta el 75 %, siendo aún bajo, de acuerdo con la teoría de las biopelículas (Flemming *et al.*, 1988), la falta de nutrientes puede ser un factor de estrés que propicie la aglomeración de los microorganismos.

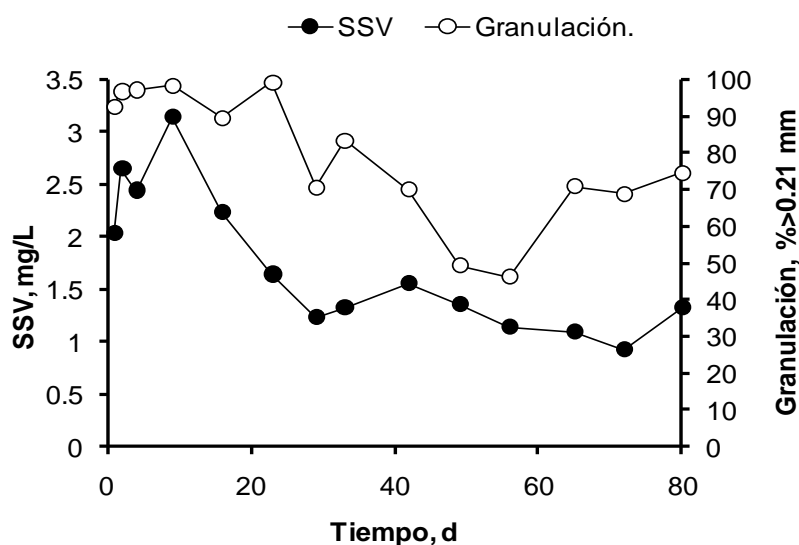


Figura 3. 24 Sólidos suspendidos y por ciento de granulación durante el tiempo de operación.

El comportamiento irregular del reactor, se debe principalmente a la disminución de la carga orgánica volumétrica C_v (Figura 3.25) que estuvo entre 1.2 y 0.3 kg de 4-CF/m³·día. La disminución no se observó en la tasa de carga orgánica que fue de 0.67 ± 0.35 kg4CP/m³/d, debido a que la biomasa

disminuyó proporcionalmente a la carga volumétrica. La velocidad de sedimentación V_s fue de 29.9 ± 2.7 m/h demostrando las excelentes características de sedimentación de los gránulos aerobios.

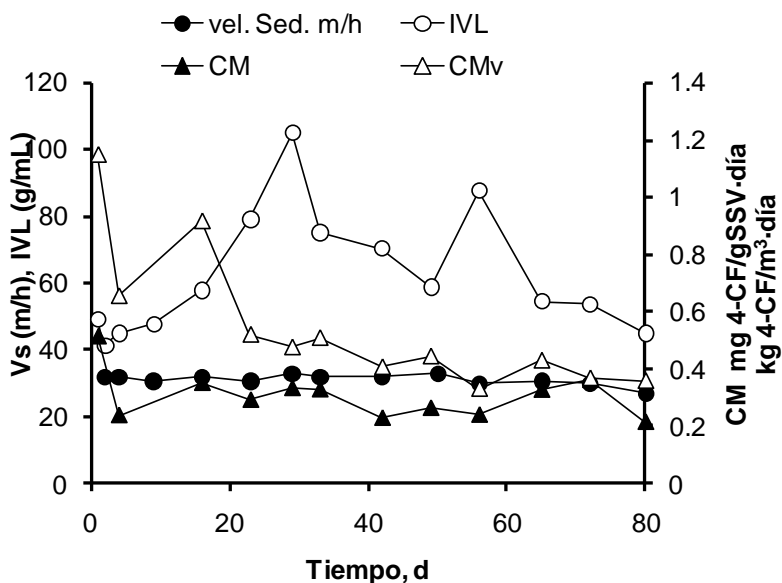


Figura 3. 25 Carga másica del reactor, velocidad de sedimentación e IVL de la biomasa.

La degradación del 4-CF se llevó a cabo en 2.5 ± 0.7 h, pero la colmatación de las membranas ocasionó un alargamiento de los tiempos de filtrado, prolongando los tiempos de los ciclos desde 4 h (día 1), hasta 13 horas al día 50 (Figura 3.26), para el día 15, la PTM alcanzó el valor límite de 50 kPa mientras que el flux disminuyó de $12.25 \text{ L/m}^2/\text{h}$ (día 1) hasta $2.8 \text{ L/m}^2/\text{h}$ (día 25). La colmatación causó un aumento en la frecuencia de los retrolavados, ya que el sistema se retrolava automáticamente cuando se alcanza una PTM de 55 kPa, esto con la finalidad de proteger la integridad de la membrana.

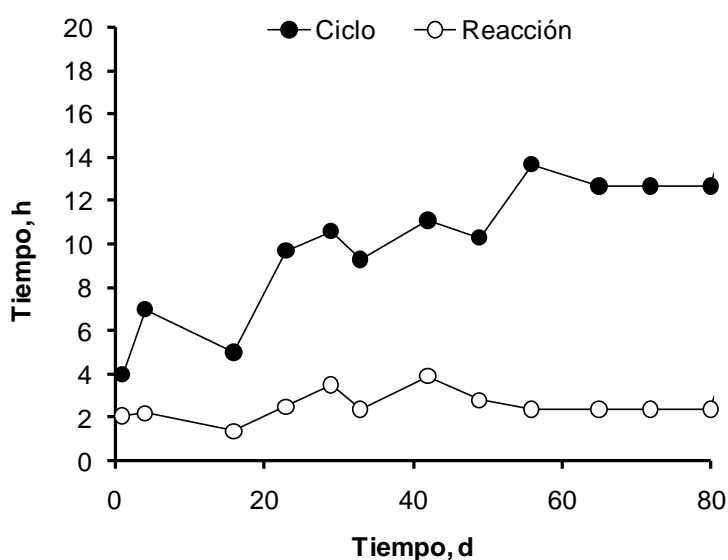


Figura 3. 26 Duración de los ciclos y del tiempo de reacción.

Al igual que en experimentos anteriores se observa en el comportamiento de los promedios de los máximos de la presión transmembrana (PTM), antes de los retrolavados, un incremento gradual hasta el sexto día de operación y después un incremento acelerado hasta el décimo día, en donde la membrana alcanza la presión máxima (Figura 3.27), entonces es necesario disminuir el flux o aplicar un lavado químico para mantener la operación.

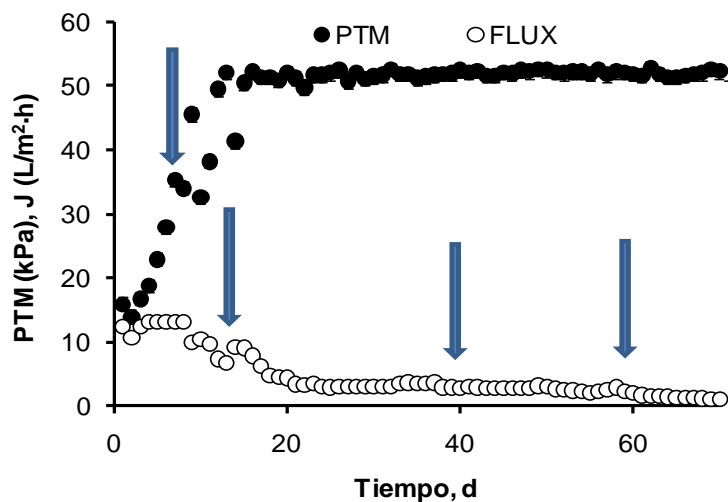


Figura 3. 27 Desempeño de la presión transmembrana y el flux. Las flechas señalan los puntos de las autopsias a las membranas.

Con la finalidad de observar la dinámica de la colmatación se hicieron autopsias a la membrana al día 0, 10, 18, 40 y 60 (Figuras 3.28, 3.29, 3.30, 3.31, 3.32) de la operación. En la imagen de microscopía láser confocal de barrido (CLSM), Figura 3.28B, se muestra como la colmatación inicia a los 10 días de operación con un depósito de manera casi uniforme de polisacáridos (color azul) a los cuales se asocian los microorganismos pioneros y comienzan a producir proteínas para formar agregados (color verde en la Figura 3.28 F). Al día 18 de la operación, cuando existen problemas para filtrar, se observa, una importante cantidad de microorganismos embebidos dentro de una matriz compuesta principalmente de proteínas (color verde en la Figura 3.29 F). Se observa también que los polisacáridos se encuentran en la superficie y al interior de la membrana.

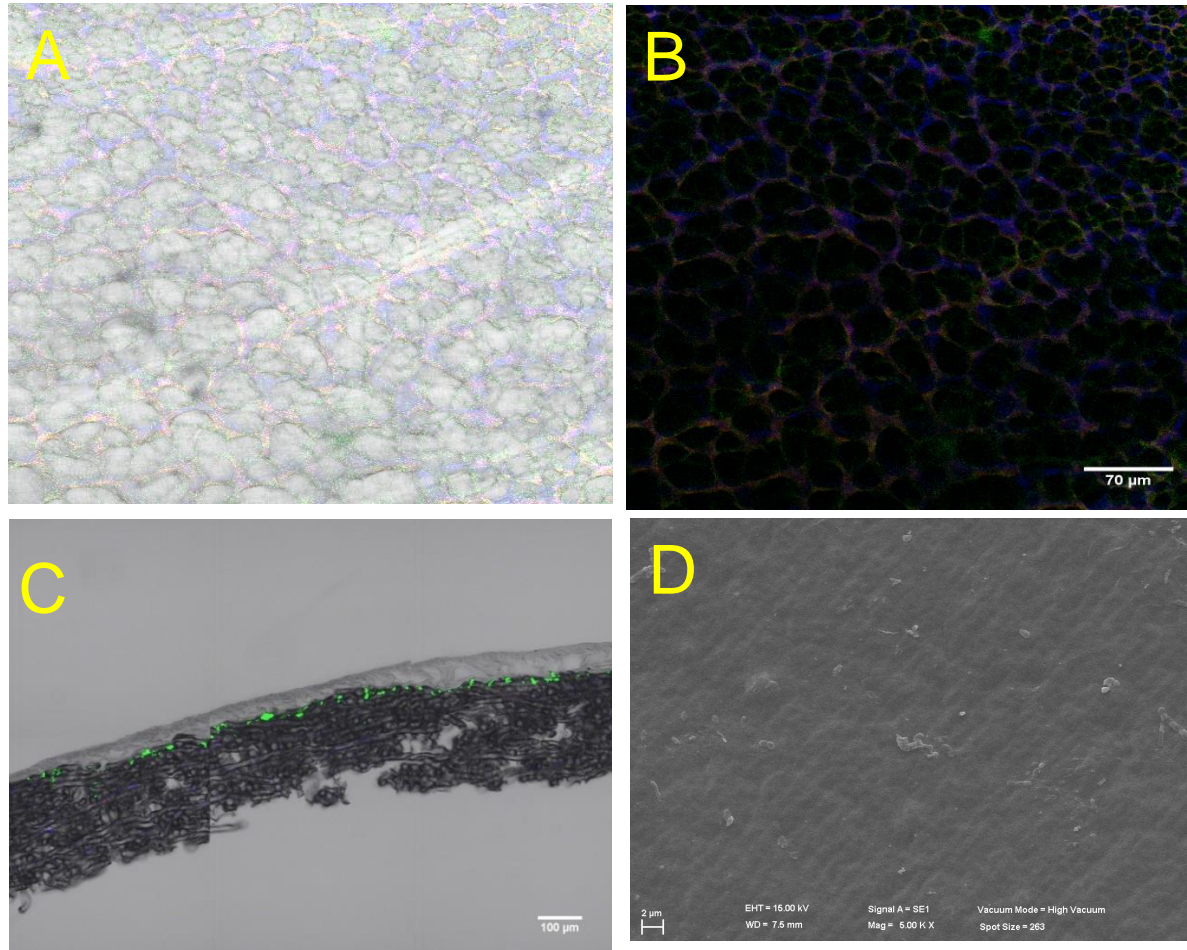


Figura 3. 28 Día 0 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte transversal, D) SEM superficial.

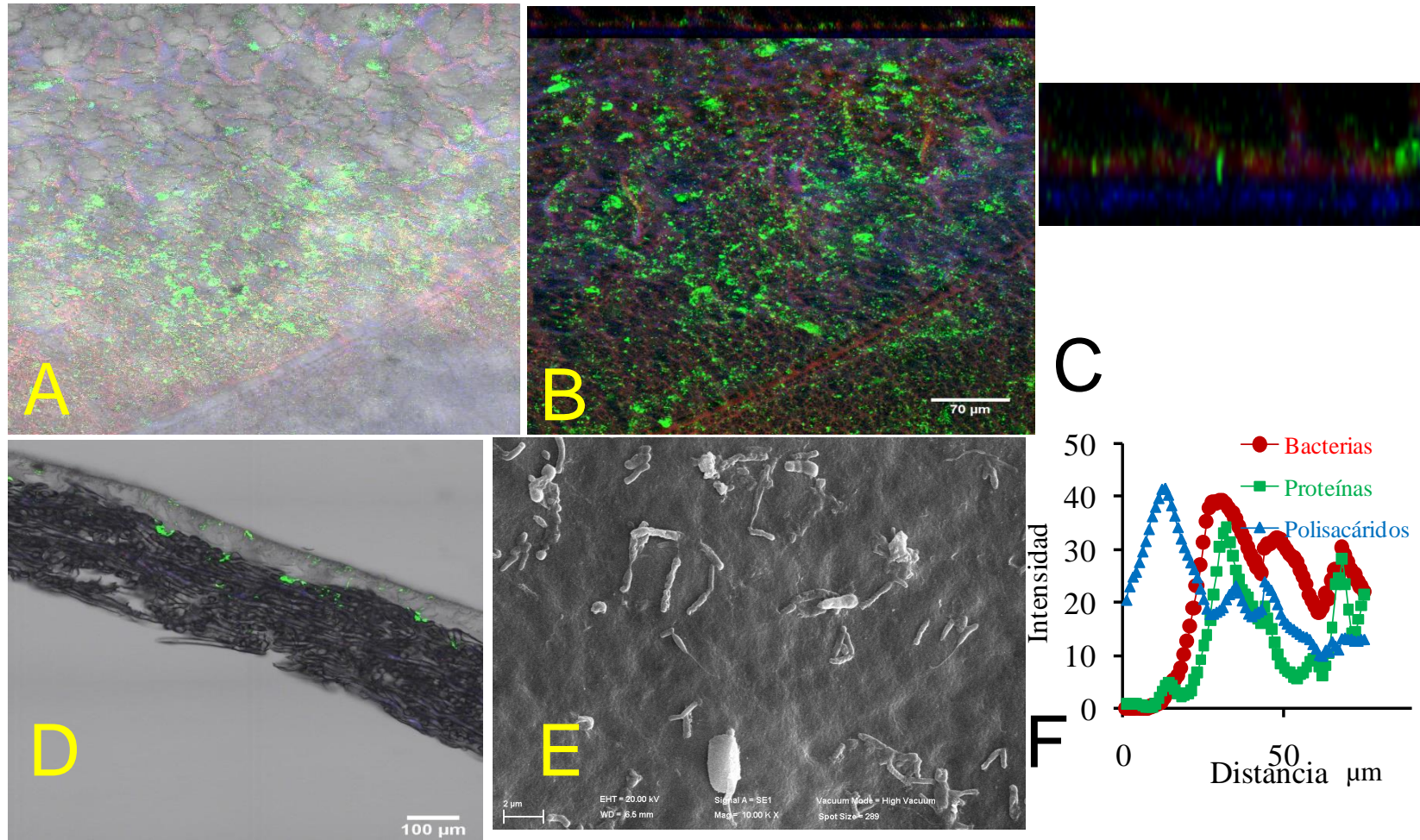


Figura 3. 29 Día 10 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte óptico transversal, D) CLSM corte transversal, E) SEM superficial, F) intensidad en el corte óptico transversal.

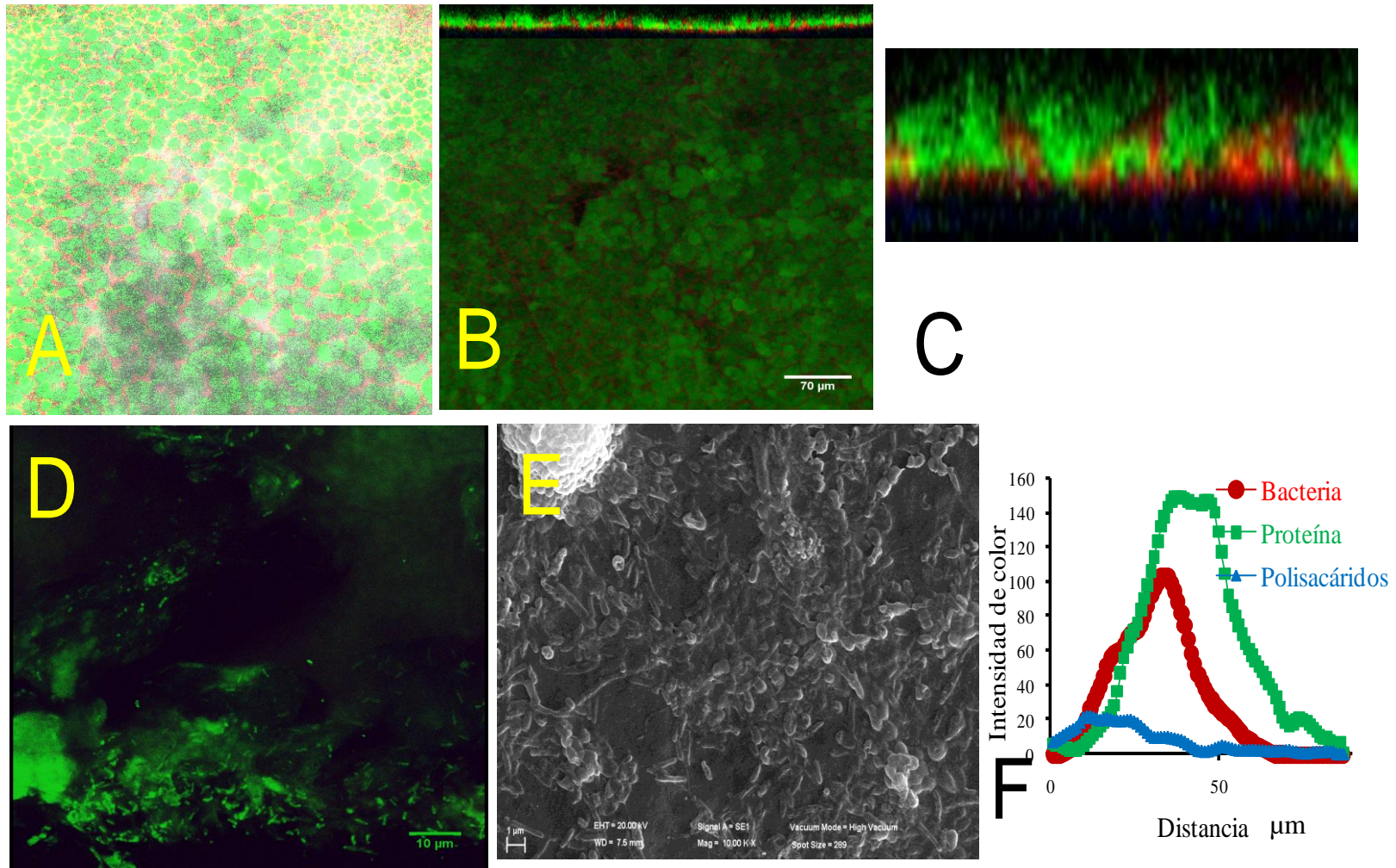


Figura 3. 30 Día 18 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte óptico transversal, D) CLSM corte transversal, E) SEM superficial, F) intensidad en el corte óptico transversal.

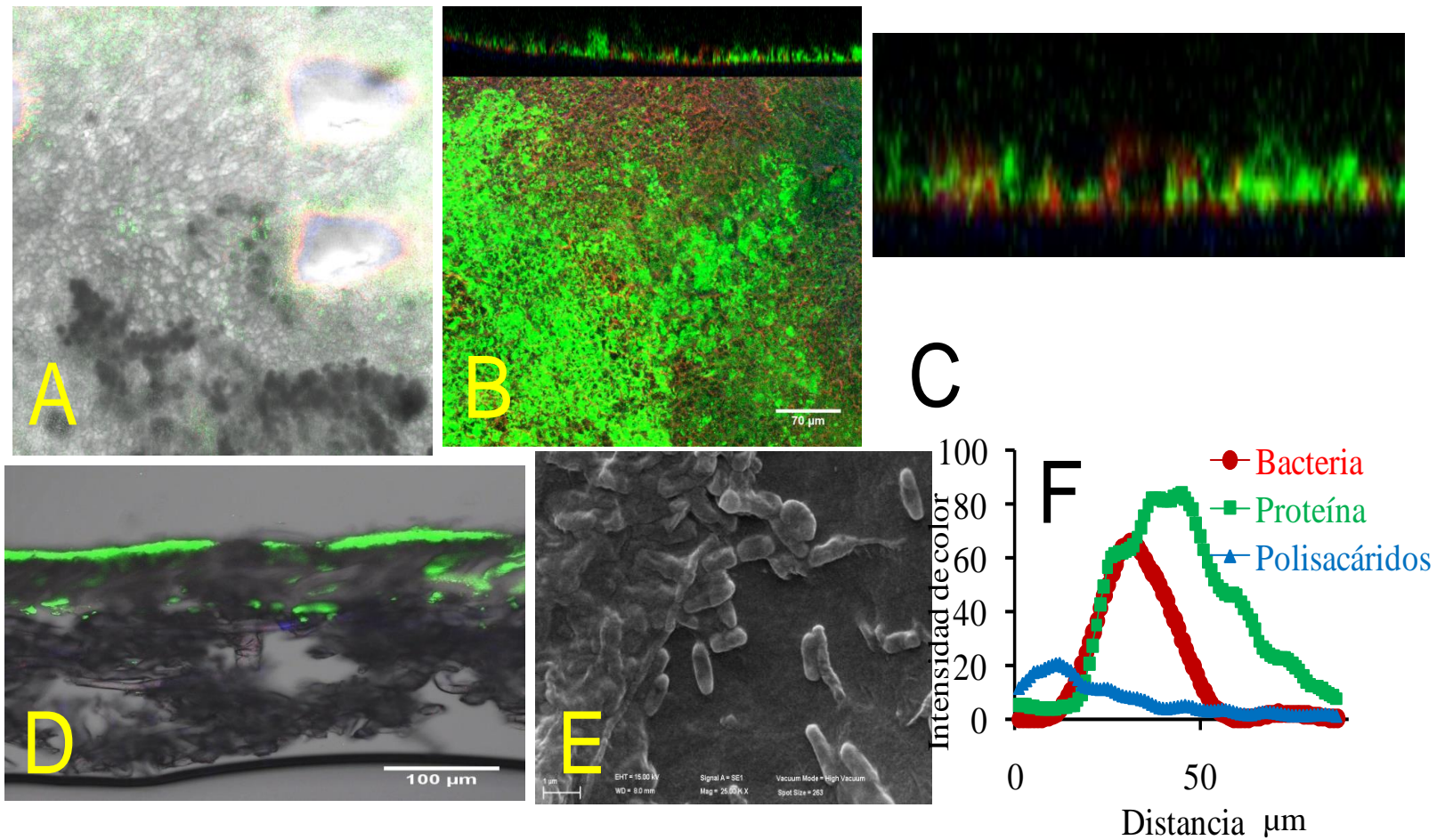


Figura 3. 31 Día 40 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte óptico transversal, D) CLSM corte transversal, E) SEM superficial, F) intensidad en el corte óptico transversal.

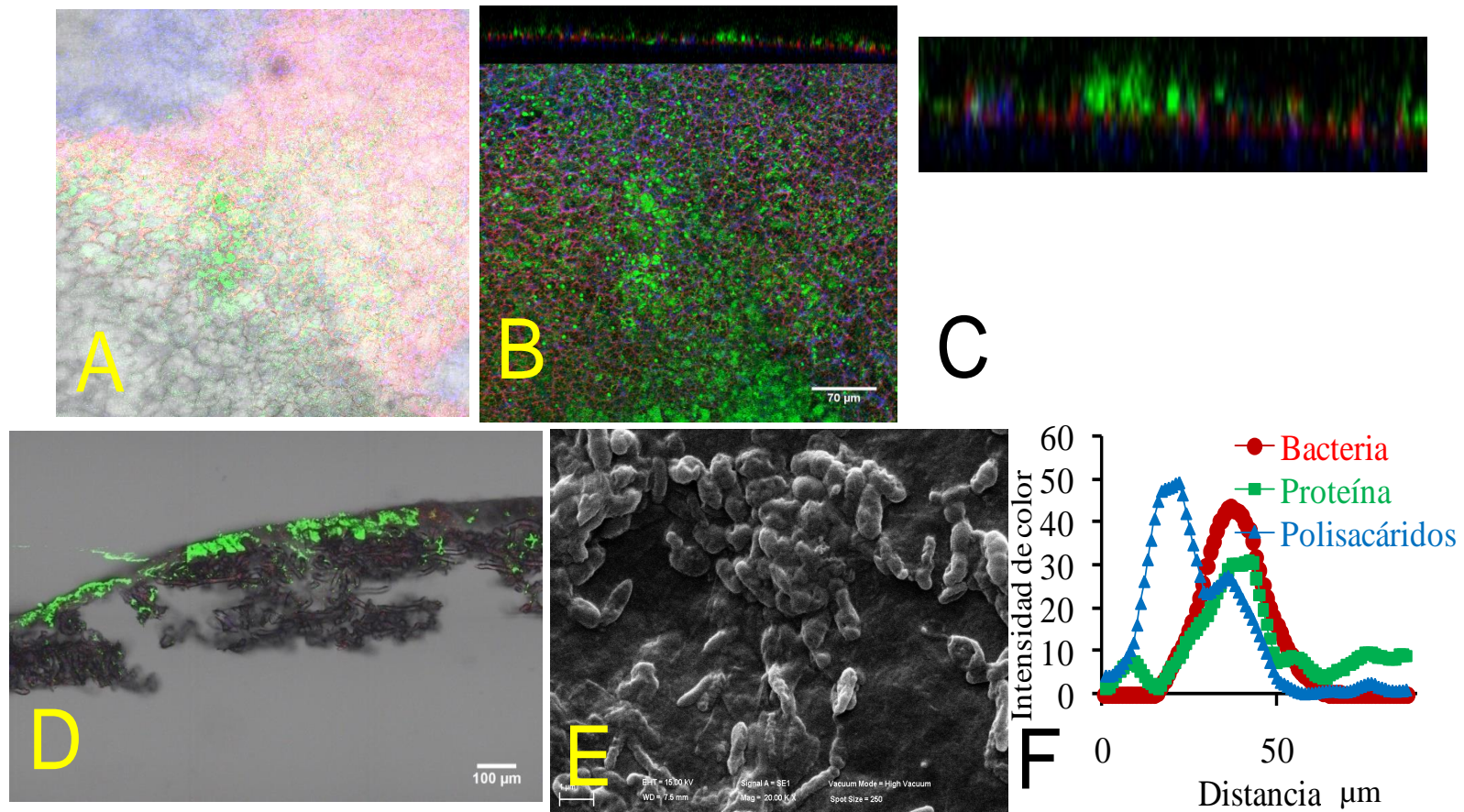


Figura 3. 32 Día 60 de la operación FITC-CW-Topro3 (verde proteínas, azul polisacáridos, rojo bacterias) 20X, A) CLSM corte superficial con campo claro, B) CLSM corte superficial, C) CLSM corte óptico transversal, D) CLSM corte transversal, E) SEM superficial, F) intensidad en el corte óptico transversal.

La biocapa no se encuentra de manera uniforme sino que forma aglomerados en algunas zonas y se observan canalizaciones a la manera descrita para las biopelículas y para los gránulos (Lemaire *et al.*, 2008), el crecimiento se mantiene hasta el día 40 (Figura 3.31) de la operación. El día 60 (Figura 3.32) se observa menor cantidad de biomasa, sin embargo la membrana está totalmente impermeabilizada por la capa de polisacáridos depositada y una gran cantidad de proteínas formando agregados de una apariencia más compacta que en los días anteriores, esto se puede relacionar con el tiempo de retención de sólidos que es mayor a 40 días y al alto tiempo de residencia hidráulica, de 28 horas, que según se ha reportado (Lee *et al.*, 2003) hacen que disminuya a la actividad microbiana y causan una disminución de los EPS, al mismo tiempo se observa en la Figura 3.33 que existen algunos desprendimientos de la biopelícula.

De acuerdo con Chen *et al.*, (2011) la colmatación irreversible se debe principalmente a los EPS solubles, los cuales son liberados a la fase líquida por diversos mecanismos, primero los EPS que mantienen unidos a los microorganismos, se hidrolizan en pequeños trozos los cuales se solubilizan, también contribuyen a esto algunos productos del metabolismo (Meng *et al.*, 2009), que posteriormente son adsorbidos por la membrana haciendo que se forme una capa molecular de acondicionamiento y propiciando así una mayor y fácil adhesión de las bacterias a la superficie, haciendo cada vez más difícil que sean desprendidas por la turbulencia y los retrolavados.

3.4.2 Evaluación de la morfología de la colmatación

La microscopía electrónica tanto de barrido como de transmisión permite observar espacialmente en donde se encuentran los microorganismos en la membrana, en las imágenes de SEM obtenidas de las autopsias a los 15 días de operación, se pueden distinguir 3 tipos de estructuras que no se observan en la membrana virgen: a) formas estructuradas formando racimos con un diámetro de entre 30 y 60 μm (Figura 3.33B), b) formaciones de gránulos adheridos incluyendo protozoarios y restos de gránulos con EPS y c) bacterias con forma de bacilos de un tamaño entre 0.3 a 0.5 μm de ancho y de 1 a 2 μm de largo, adheridas mediante EPS (Lemaire *et al.*, 2008) a la superficie de la membrana a la manera de una monocapa, en ciertas regiones se tiene un engrosamiento de la monocapa llegando a formar agregados amorfos (Figura 3.33B).

La microscopía de transmisión brinda un corte transversal de la biopelícula, en la cual se puede apreciar la organización de las células al interior de la matriz exopolimérica, también se observan los espaciamentos que hay entre las células y entre los diferentes tipos de colonias, el hecho del espacio entre las células se encuentre ocupado por EPS, sugiere que las bacterias que se encuentran más separadas tienen una mayor capacidad de generar exopolímeros (Figura 3.33A). También se pueden

observar diferencias entre la abundancia e integridad de las células en las que se encuentran en la superficie de la membrana y las que se encuentran al interior de la estructura de esta, de manera que las que están al interior se encuentran destruidas debido posiblemente a la limitación de nutrientes, los cuales son captados preferentemente por las colonias superficiales (Figura 3.33B).

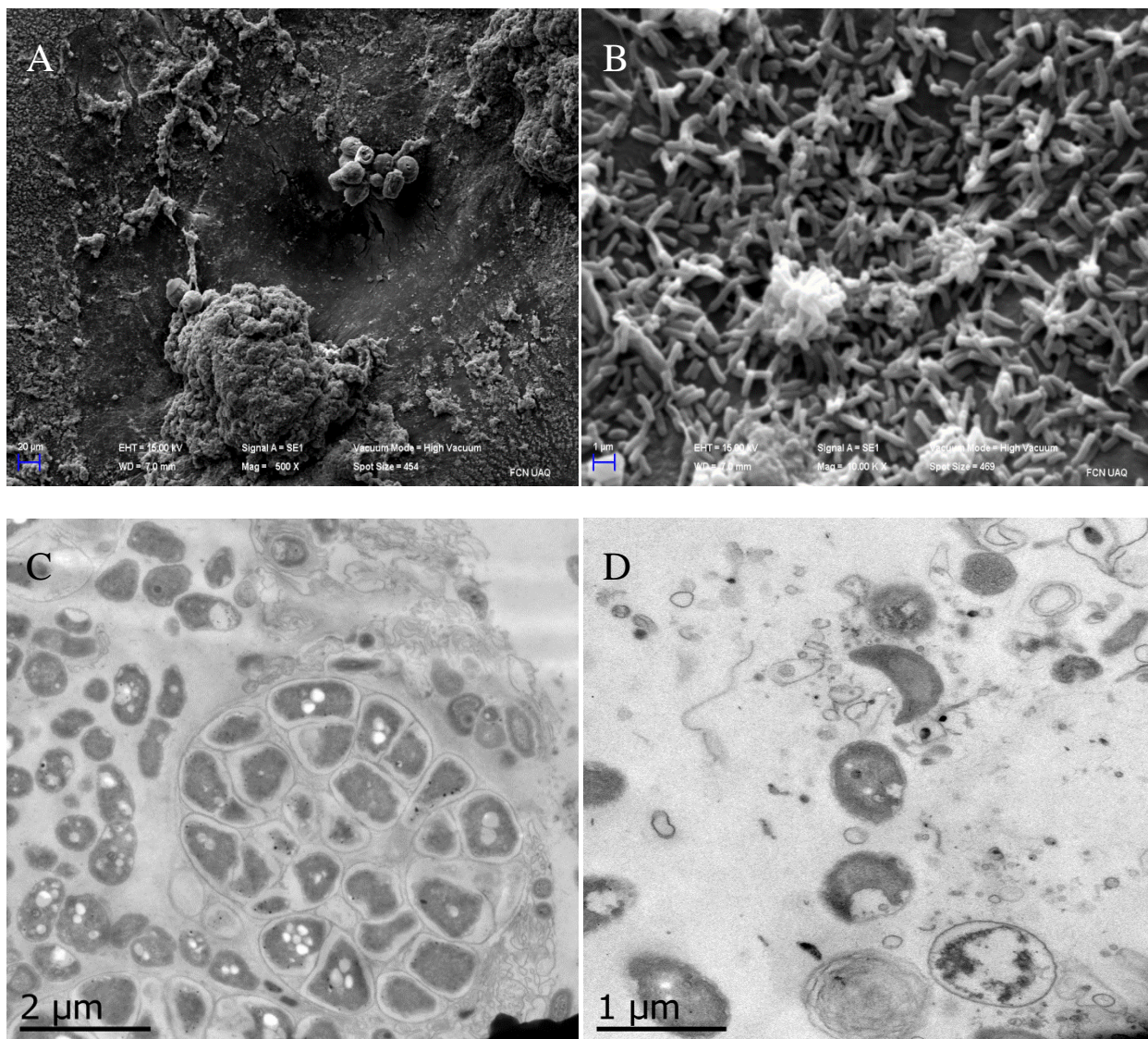


Figura 3. 33 Fotomicrograffías A) SEM gránulos adheridos a la membrana, B) monocapa bacteriana, C) TEM parte externa de la membrana colmatada. D) TEM interior de la membrana colmatada.

También se observa la presencia de canales entre las colonias de células, ese tipo de canales han sido reportados en tanto en gránulos aerobios (Lemaire *et al.*, 2008) como en biopelículas, los cuales sirven para el transporte de nutrientes en el líquido y como drenaje para los productos de desecho; observando la forma en que se encuentran las células en la Figura 3.33C, se observa un posible patrón de

crecimiento, por lo que estas colonias pueden ser producto de la reproducción de las células que originalmente se instalaron en la superficie de la membrana.

Tomando en cuenta lo observado en las fotomicrografías, se sugiere que la colmatación de la membrana se debe por una parte al depósito de material biológico, microorganismos libres o floculados y sustancias poliméricas extracelulares y principalmente al desarrollo de una biopelícula. Lee *et al.*, (2008), definen el término capa de torta (cake layer) a la acumulación y compresión del material biológico rechazado por la membrana y depositado en la superficie de ésta. Por otro lado una biopelícula (biofilm) es una comunidad de microorganismos asociados a una superficie, encapsulados en una matriz extracelular, éstos autores describen el término biotorta (bio-cake) como la combinación de los dos anteriores para nombrar la capa colmatante de un sistema MBR. Sin embargo parece más adecuado el término biocapa (bio-layer) para describir lo observado en la superficie de la membrana, Una biocapa se puede definir como un recubrimiento de material biológico y microorganismos, siendo así la biopelícula parte principal de la biocapa y la biotorta formada por flóculos, EPS y PMS en menor medida.

La mayor adsorción de los polisacáridos por parte de la membrana se puede deber a la hidrofiliidad de estos. Aunque el PVDF es hidrofóbico, las membranas son modificadas superficialmente para hacerlas hidrofílicas, con la finalidad de evitar la colmatación debida por microorganismos y proteínas que son también de carácter hidrofóbico. El proceso de colmatación no se detiene con el crecimiento de la biocapa, ya que al estar formado el glicocalix hasta en un 90 % de agua (Flemming y Wingeder, 2010), los polisacáridos pueden ser transportados a través de éste hasta depositarse en la superficie, engrosando la capa hasta que llega a bloquear los poros, Para un sistema MBR con lodos activados convencionales Drews *et al.*, (2007) reportan una mayor retención de los carbohidratos (75 - 100%) comparado con las proteínas (20 - 70 %) al igual Dvorak *et al.*, (2011) encuentran una mayor concentración de carbohidratos (58 -.60 %) a pesar de no ser el principal componente en el sobrenadante. Otro efecto de los EPS es el aumento de la viscosidad del líquido (Chu *et al.*, 2010) y por lo tanto una menor filtración.

El incremento de polisacáridos acumulados en la superficie de la membrana también puede deberse al incremento de la lisis celular debida a la falta de sustrato, ya que al impedir la filtración, también disminuye el transporte de nutrientes a los microorganismos que se encuentran en la cercanía de la membrana, observando que entre el día 40 y 60 de la operación continua, aumentó el área cubierta por polisacáridos, mientras el área cubierta por proteínas disminuyó.

Existen dos modelos para describir la estructura de una biopelícula, el primer modelo se basa en la idea de que ésta se desarrolla mediante un comportamiento biológico determinado, el cual se puede explicar

y controlar mediante los procesos genéticos, de manera que cada etapa de la formación de la biopelícula (pegado, formación de microcolonias, maduración y desprendimiento) se lleva a cabo mediante cambios en los genes expresados y la regulación de la síntesis de factores específicos de las bacterias, incluyendo flagelos, proteínas de las membranas o cápsulas de polisacáridos etc. (O'Toole y Kolter 1998). En ese modelo la formación de los EPS tienen un papel importante tanto en la adherencia como en el subsecuente desarrollo de la matriz, en la cual la biopelícula crece debido tanto a la división celular como a la captura de otros microorganismos que quedan atrapados. Todo ese proceso es regulado de manera molecular por las señales del quórum -sensing (Davies *et al.*, 1998), el cual es en parte responsable de la arquitectura de la biopelícula. El segundo modelo se basa en la suposición de que la estructura exacta de la biopelícula es probablemente el resultado de las condiciones ambientales en la cual se desarrolla. De acuerdo con Flemming (1988), estas condiciones son los cambios en la concentración de nutrientes, fuerzas de corte, temperatura y otros factores, causan el crecimiento de la biomasa o disminución de la biopelícula. Una integración de ambas teorías parece ser la posición más razonable para entender los fenómenos asociados a la formación de la biocapa colmatante de acuerdo a lo que se observa en la práctica.

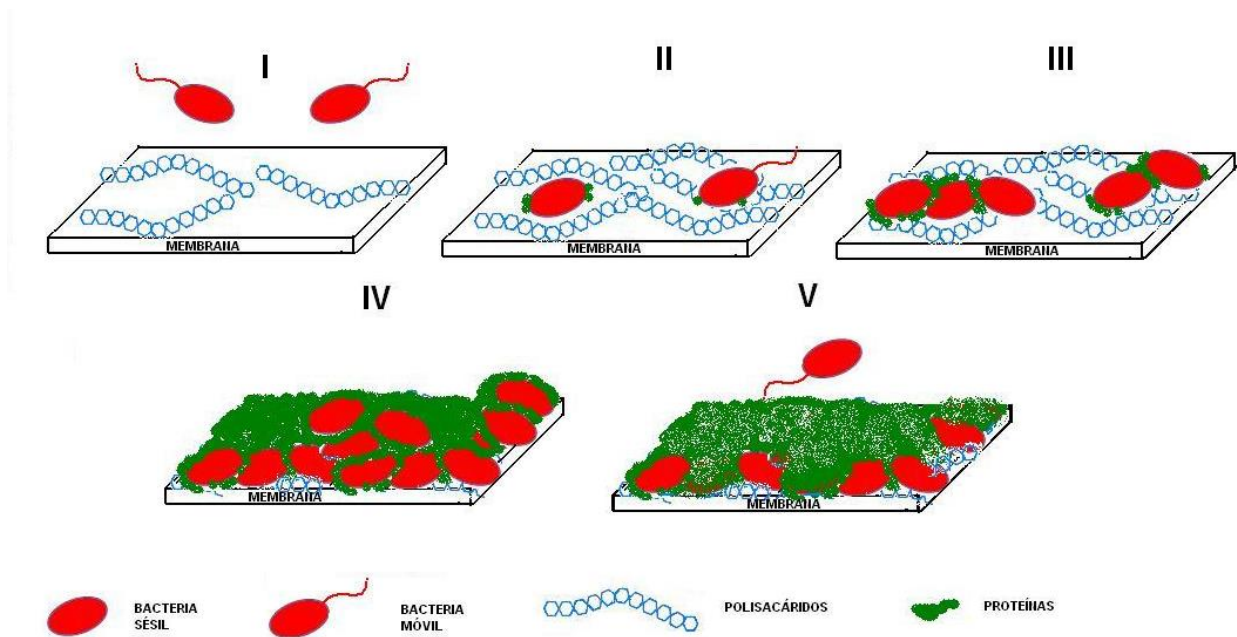


Figura 3. 34 Dinámica de la colmatación de la membrana.

Haciendo una aproximación de la colmatación de un reactor discontinuo secuencial de membranas sumergidas con lodos granulares a la formación de una biopelícula, se pueden establecer las siguientes 5 etapas (Figura 3.34):

- I. Adsorción de β -polisacáridos por parte de la membrana y su depósito en los poros y la superficie acondicionándola para una subsecuente colonización.
- II. Depósito de microorganismos libres y algunos flóculos ligeros en la superficie de la membrana (formación de biocapa).
- III. Crecimiento de una biopelícula por la multiplicación de los microorganismos hasta formar una monocapa y formación de la matriz exopolimérica constituida principalmente por proteínas (Berk *et al.*, 2012) con aglomeración y retención de microorganismos, la cual crece también por la captura de más microorganismos, flóculos y algunos gránulos pequeños formando protuberancias en la biopelícula.
- IV. Taponamiento que causa impermeabilización de la membrana debido al depósito de restos celulares, carbohidratos, productos microbianos y precipitados salinos originados por la mineralización inducida por EPS.
- V. Decadencia de la biocapa con desprendimiento de células y partes de la biopelícula.

3.5 Estrategias anticolmatación

3.5.1 Operación del reactor

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente en el apartado 3.4 y contrastándolos con la literatura, lo que más influye en el proceso de colmatación de las membranas son: los sólidos finos (bacterias, EPS, etc.) y el crecimiento de biopelícula, en base a esto se diseñaron dos posibles estrategias anticolmatación que consisten en: A) intercalar ciclos SBR entre los ciclos MBR, esto con la finalidad de eliminar sólidos finos, bacterias y flóculos, y B) colocar las membranas en un módulo externo, esto para tener una menor concentración de sólidos y evitar el contacto de la biomasa con el sustrato.

Se inoculó el reactor con lodos activados de la planta de tratamiento Municipal de la terminal de autobuses de Querétaro con 2 g/L de SSV, evitando la pérdida de biomasa, manteniendo estable la concentración de sólidos suspendidos de 2.3 ± 0.3 (Figura 3.35).

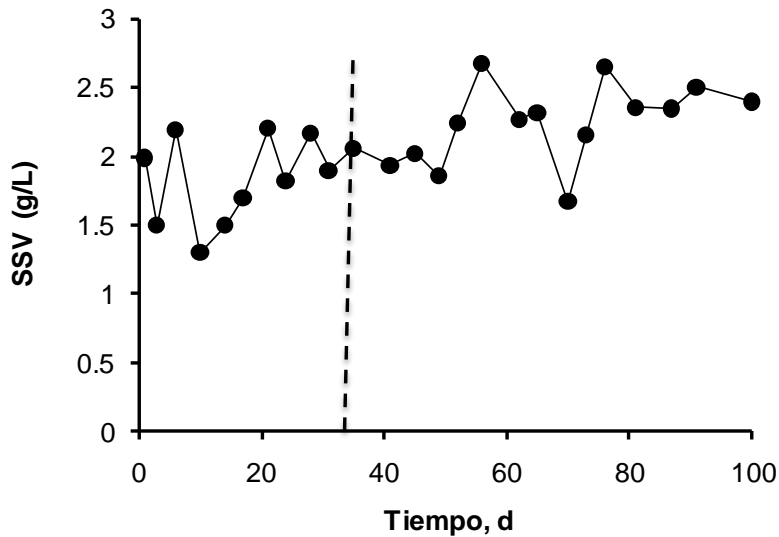


Figura 3. 35 Variación de los sólidos durante el tiempo de operación.

La aclimatación se llevó a cabo de la misma manera como fue descrita en el apartado 3.1. A los 8 días de inoculado se observaron los primeros gránulos el IVL de los lodos disminuyó conforme aumentó la granulación (Figura 3.36), para el día 10 se alcanzó un porcentaje de granulación mayor al 50%, al día 35 se tuvieron las condiciones para introducir la membrana con gránulos de 2 mm de diámetro promedio, con las membranas, el tamaño del gránulo continuó incrementándose de manera lineal hasta obtener un tamaño superior a 4 mm para el día 100 (Figuras 3.37 y 3.38).

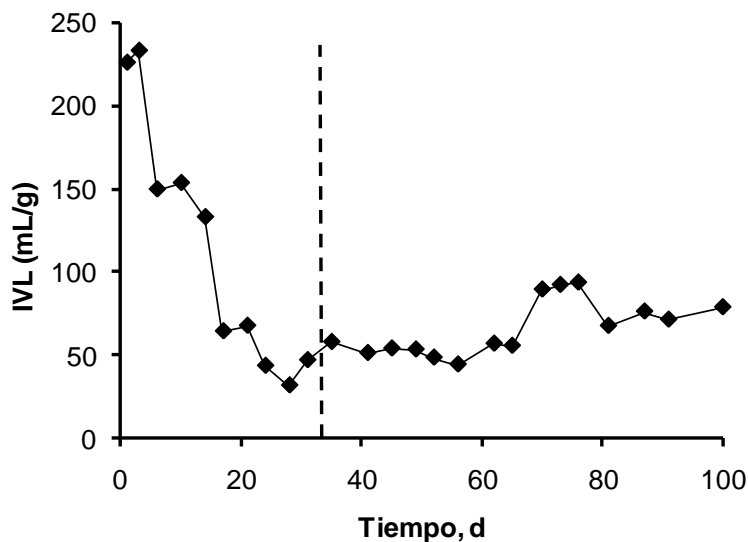


Figura 3. 36 Variación del índice volumétrico de lodos durante el tiempo de operación.

La membrana se introdujo al sistema en el día 35 y comenzó la operación intercalando por cada dos ciclos de MSBR 1 ciclo de SBR (2:1). Durante la operación, se obtuvieron dos efluentes, uno del filtrado con la membrana y otro de menor calidad del decantado. En la Tabla 3.3 se muestra que en algunos de los parámetros como la tasa de remoción (q) y la carga másica, se tuvo poca variación cuando el reactor operó en forma combinada intercalando por cada dos de MSBR un ciclo SBR (2:1). Al día 38 de la filtración, alcanzó la PTM máxima de 50 kPa (ver figura 3.42), debido a esto las membranas fueron lavadas químicamente con un tratamiento que consistió en 12 horas con HClO 0.05 % y pH 11 y 12 horas con ácido cítrico 0.1 M pH 2. La operación se reinició el día 40 intercalando por cada ciclo de MSBR un ciclo de SBR (1:1).

La cantidad de ciclos SBR intercalada se ve limitada por la calidad del efluente que se desea obtener, por ejemplo para un intercalado de 2:1 se tiene una turbiedad promedio de 7.5 NTU, mientras que para un intercalado 1:1 la turbiedad se incrementa a 24.4 NTU, siendo significativa la diferencia con respecto a la operación con membrana.

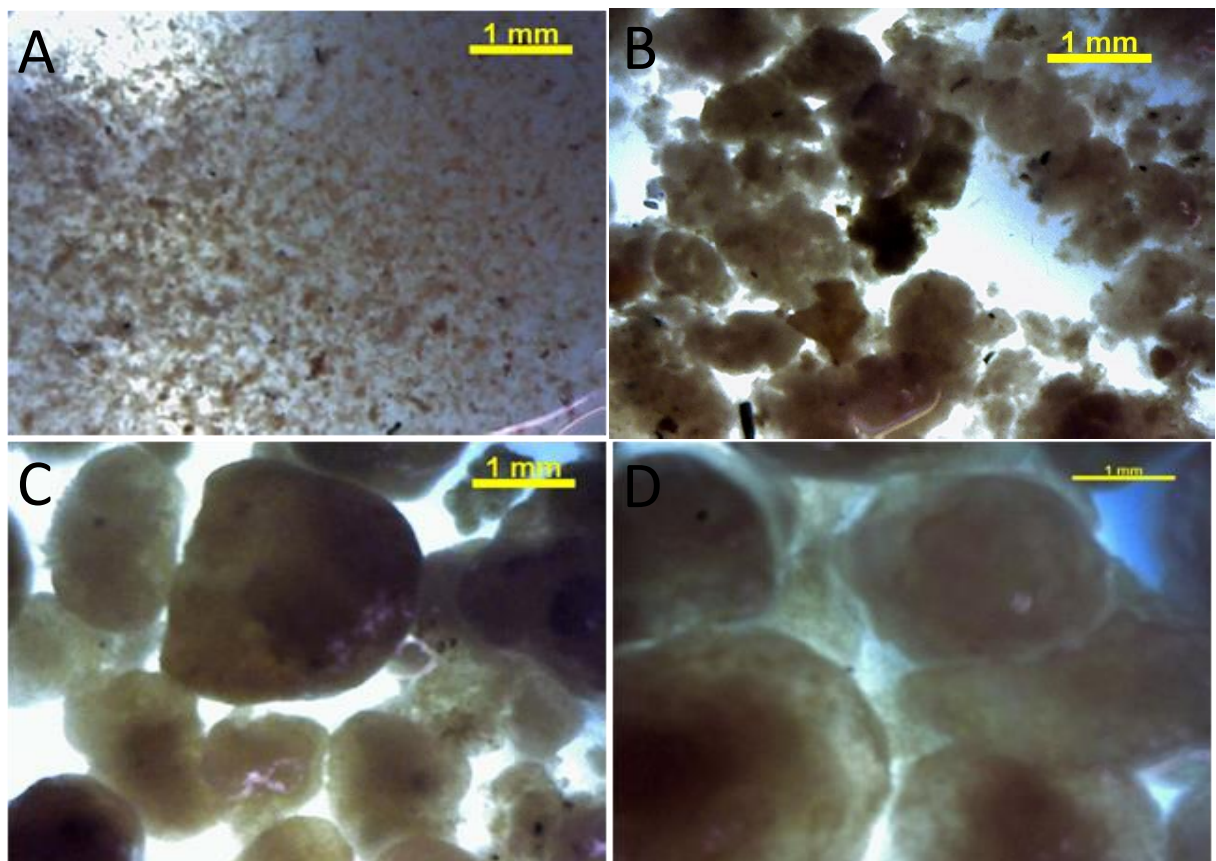


Figura 3. 37 A) Fotomicrografía de los gránulos al, A) día 3, B) día 28, C) día 40, D) día100.

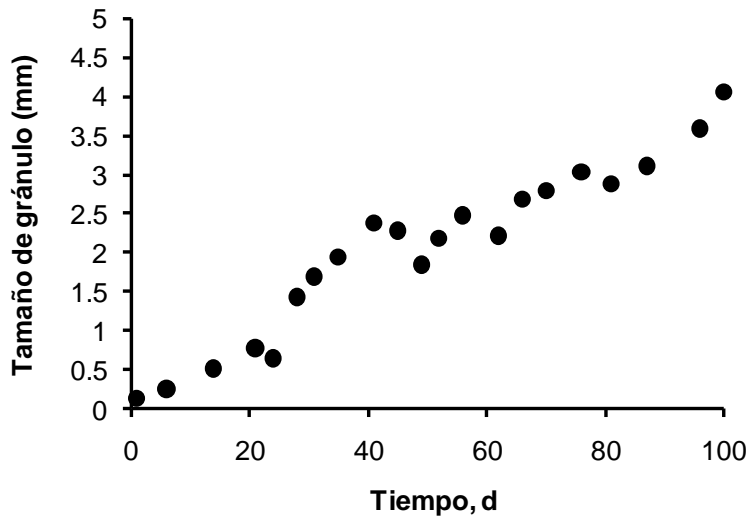


Figura 3. 38 Incremento en el tamaño de gránulo durante el tiempo de operación.

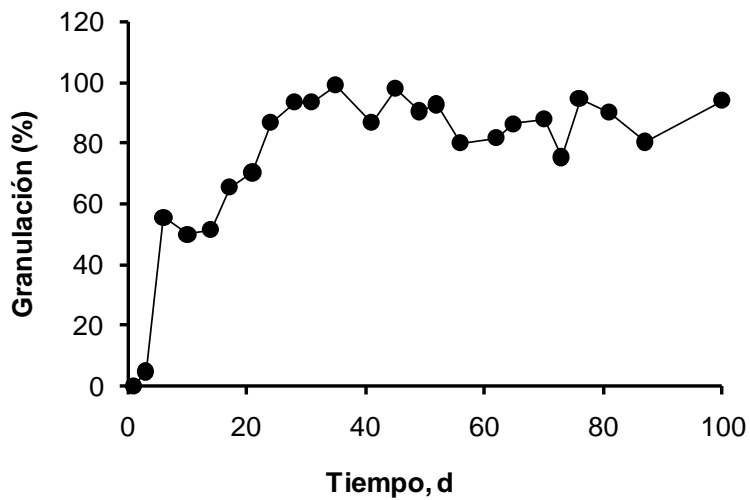


Figura 3. 39 Porcentaje de granulación en el reactor durante el tiempo de operación.

En las sustancias poliméricas extracelulares se muestra que en los EPS libres o solubles no hubo una variación importante en todo el tiempo de operación (Figura 3.40), lo cual es importante pues la colmatación depende en gran medida de la concentración de los EPS solubles, en cambio la estabilidad de los gránulos depende de los EPS ligados, que se incrementaron los al inicio del proceso de granulación y se estabilizaron para el día 20 mostrando una disminución para el día 30, como se muestra en la Figura 3.41, para el periodo final del experimento se observó una tendencia a disminuir entre el día 70 y el 100 debido a la maduración y a la estabilidad de los gránulos, lo cual según lo observado causa una mayor dificultad para realizar la extracción.

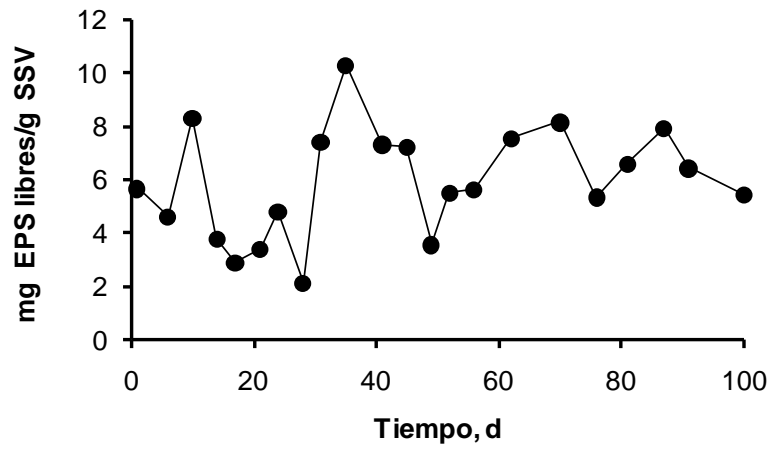


Figura 3. 40 EPS libres durante el tiempo de operación.

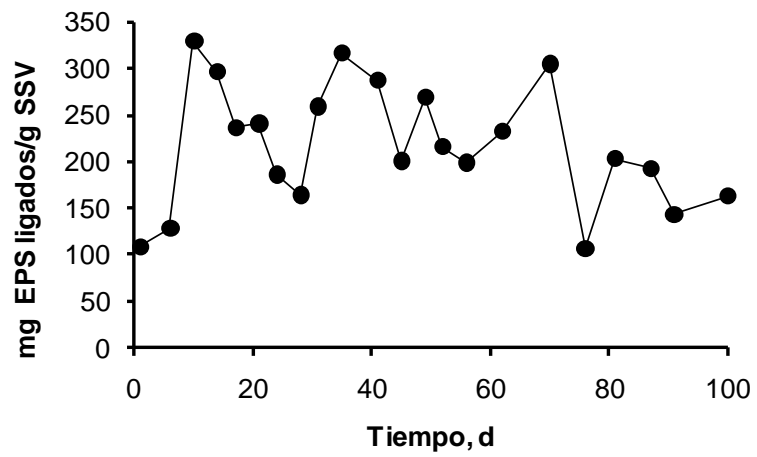


Figura 3. 41 EPS ligados durante el tiempo de operación.

Tabla 3.3 Resumen del desempeño entre los distintos procesos.

| Parámetro | SBR | MSBR | MBR/SBR 2:1 | MBR/SBR 1:1 | MBR EXT C/A |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SSV (mg/L) | 2124 ± 378 | 1957 ± 259 | 2522 ± 331 | 2390 ± 230 | 2771 ± 114 |
| Granulación (%) | 88.8 ± 10.2 | 85.4 ± 837 | 88.1 ± 7.14 | 89.9 ± 7.4 | 87 ± 8.68 |
| IVL (mL/g) | 46.8 ± 10.2 | 48.9 ± 11.1 | 41.5 ± 5.23 | 52.7 ± 4.7 | 80.3 ± 10.8 ^b |
| DQO S (mgO/L) | 78.6 ± 20.6 ^a | 17.9 ± 5.04 ^b | 25.3 ± 5.18 ^b | 56 ± 9.6 | 10.7 ± 3.8 ^b |
| Turbiedad (NTU) | 22.3 ± 6.7 ^a | 4.6 ± 1 ^b | 7.5 ± 1.17 | 25.4 ± 18.2 ^a | 0.33 ± 0.78 ^b |
| Sólidos susp. (mg/L) | 15.4 ± 3.5 ^a | 0.4 ± 0.4 ^b | 3.9 ± 1.2 | 15.2 ± 11.3 ^a | 0 ± 0 ^b |
| Color | 95.4 ± 5.7 ^a | 17.3 ± 2.6 ^b | 63.7 ± 7.2 ^a | 78 ± 22 ^a | 11.3 ± 1.5 ^b |
| 4-CF-S (mg/L) | 0.2 ± 0.13 | 0.18 ± 0.04 | 0.08 ± 0.17 | 0.27 ± 0.19 | 0.02 ± 0.01 |
| Remoción DQO (%) | 88.3±2.77 | 97.2 ± 0.84 | 95.7 ± 0.91 | 89 ± 2 | 98.3 ± 0.8 |
| Remoción 4-CF (%) | 99.9 ± 0.04 | 100 ± 0.01 | 100 ± 0.04 | 99.9 ± 0.05 | 100 ± 0 |
| Ciclo (h) | 4.11 ± 0.76 | 4.2 ± 0.52 | 3.94 ± 0.12 | 4.03 ± 0.05 | 4.3 ± 0.2 |
| q (mg4-CF/(gSSV·h) | 45.7 ± 13.3 | 50.8 ± 11.3 | 40.7 ± 4.1 | 62 ± 16.5 | 44.8 ± 9 |
| TCO g4CF/gSSV·d | 0.58 ± 0.14 | 0.63 ± 0.09 | 0.48 ± 0.06 | 0.5 ± 0.06 | 0.4 ± 0.04 |
| TCO(vol)kg4CF/m ³ ·d | 1.22 ± 0.21 | 1.2 ± 0.15 | 1.19 ± 0.04 | 1.18 ± 0.04 | 1.08 ± 0.1 |

^{ab} hay diferencia significativa entre ellos ANOVA p, 0.05.

3.5.2 Filtración

En la Figura 3.42 se muestra el comportamiento de la PTM durante la operación como MBR por 17 días, con el intercalado 2:1 por 21 días y 1:1 MSBR/SBR por 16 días, y con módulo externo sin aire por 7 días. Durante la operación de 60 días (Figura 3.42) se requirieron de 4 lavados químicos consistiendo en 12 horas con HClO 0.05 % y pH 11 y 12 horas con ácido cítrico 0.1 M pH 2. La operación con módulo externo con aire suministrado con un difusor en la base de las membranas se muestra en la Figura 3.43.

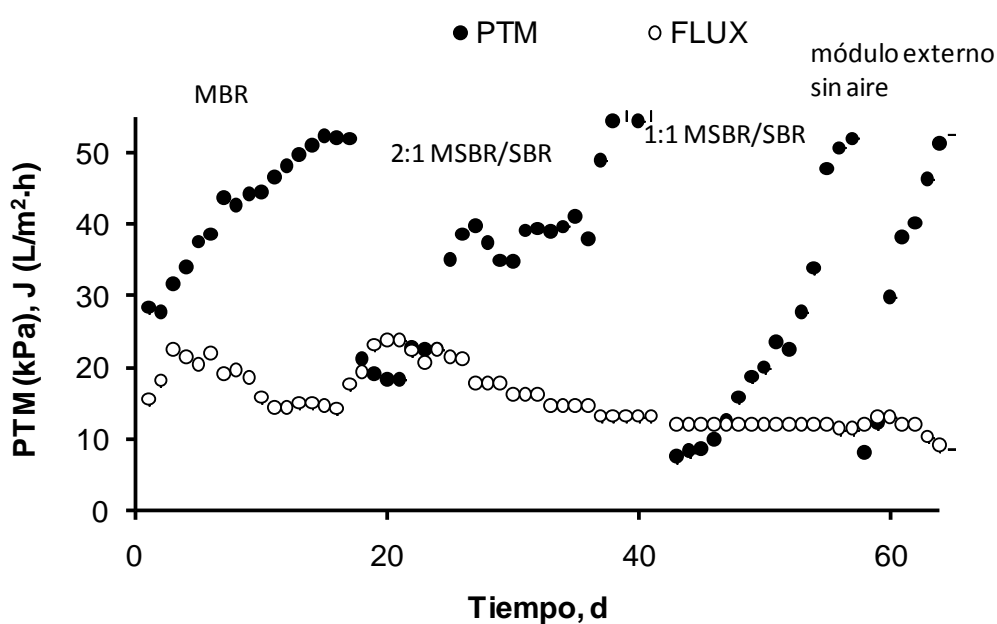


Figura 3. 42 Variación de la PTM y el flux durante el tiempo de operación.

La tasa de colmatación (T_c) obtenida a partir de la pendiente de la línea de tendencia de la gráfica de PTM contra tiempo (Figura 3.44), cuando se introduce un ciclo SBR por cada 2 ciclos de MBR fue de 0.258 kPa/h, ese valor es 25% menor que para la operación con MBR que fue de 0.345 kPa/hora, no se observó diferencia significativa para T_c cuando se intercaló 1 ciclo SBR por 1 de MSBR (2.56 kPa/h), demostrando con esto que la dinámica de colmatación con las membranas sumergidas dentro del reactor, no se encuentra determinada principalmente por la presencia de partículas finas, sino por el crecimiento de biopelícula.

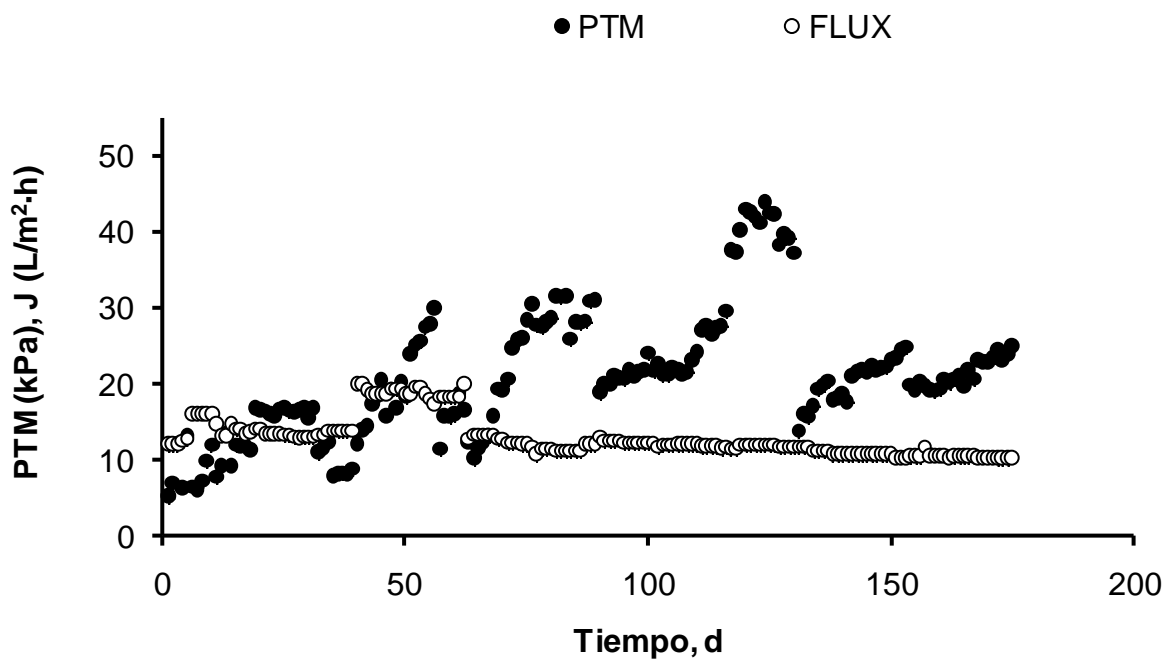


Figura 3. 43 Variación de la PTM y el flux durante el tiempo de operación para la operación con módulo externo con aireación.

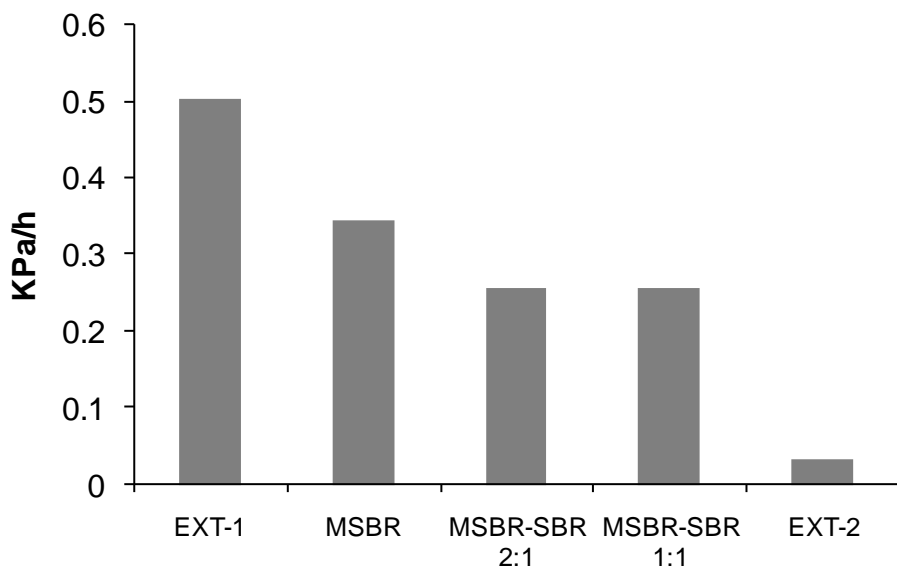


Figura 3. 44 Tasa de colmatación de la membrana durante distintas estrategias de operación.

En cambio cuando se opera en módulo externo sin aire, la membrana se colmata rápidamente por el transporte de partículas finas y coloides a la interface de la membrana debido al flujo de la filtración. Al introducir turbulencia generada por aire, se evitó éste depósito, y se mejoró la tasa de colmatación en un 90% con respecto a la operación con la membrana interna, manteniéndose estable el sistema sin

evidencia del crecimiento de biopelícula, la tasa de colmatación que se obtuvo fue de 0.033 kPa/h, con esa tasa de colmatación el tiempo teórico requerido para el lavado químico de las membranas es de 101 días. El resultado es comparable con el reportado por Thanh *et al.*, en el 2013, quienes obtuvieron una tasa de colmatación de 0.027 kPa/d utilizando un módulo separado de membranas y un módulo de sedimentación previo, la desventaja de ese sistema es que con el módulo de sedimentación se incrementan los costos y la inversión inicial.

3.5.3 Colmatación

Al comparar los resultados de las resistencias en serie en los ciclos intercalados (R3) con la operación MSBR (R1, colmatación a los 7 días y R2, colmatación a los 14 días), se observó que en la resistencia por biocapa R_b disminuye de 45 a 36% al intercalar los ciclos SBR, aumentó la colmatación irreversible por bloqueo de los poros R_{pi} de 25 a 40 %, haciendo poco efectivos los retrolavados como puede observarse en la Fig. 3.46. Estos resultados coinciden con lo reportado por Zhou *et al.*, (2007), quienes obtuvieron una R_p de 44.2% y una R_b de 34.7% con lodos granulares.

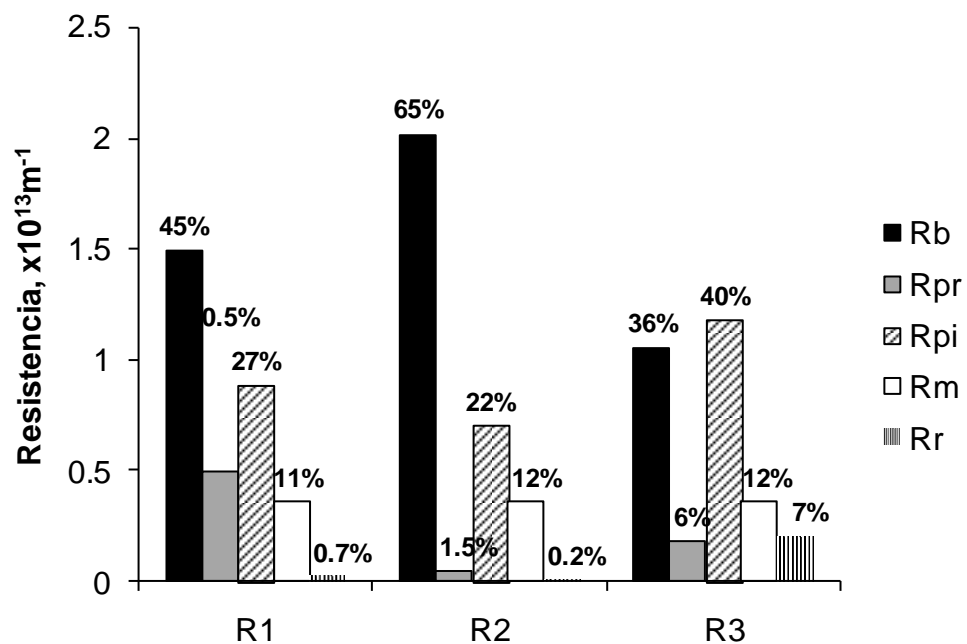


Figura 3. 45 Porcentajes de aporte a la resistencia total para colmatación a los 7 días (R1), colmatación a los 14 días (R2) y con ciclos intercalados (R3) debido a R_b , resistencia de la biocapa; R_{pr} , resistencia de bloqueo de poros reversible; R_{pi} , resistencia de bloqueo de poro irreversible; R_m resistencia intrínseca de la membrana; R_r , resistencia residual.

Se observa además, en la Figura 3.45 que la resistencia residual se incrementó, debido al incremento en la resistencia de poro irreversible, esto significa que los lavados químicos no fueron lo suficientemente

efectivos como para remover todo el material depositado en el interior de la membrana, por tanto para operar con ciclos intercalados MSBR/MBR se deben modificar las condiciones del lavado químico para hacerlo más eficiente.

En los experimentos realizados previamente se determinó que la colmatación de un sistema de lodos granulares aerobios con membranas sumergidas es similar a la colonización de una superficie por una biopelícula (Flemming y Schaule, 1988) consistiendo en las siguientes 4 etapas: a) transporte de material biológico hacia la superficie de la membrana y adsorción de éste material principalmente polisacáridos, b) adhesión y establecimiento de los primeros colonizadores como bacterias libres, c) formación de los primeros agregados formados por la reproducción de los primeros colonizadores y llegada de más y diferentes microorganismos, y d) desarrollo de una biocapa compleja y con diferentes especies embebidas en una matriz de exopolímeros compuesta principalmente por proteínas, por lo que la colmatación depende grandemente de la concentración de partículas pequeñas y bacterias libres en la fase líquida.

La intercalación de ciclos SBR dentro de la operación de un sistema MBR evitó la retención de partículas finas suspendidas y biomasa floculenta, previniendo así depósito de estas partículas en la superficie de la membrana, se retardó la colmatación, además hizo más robusto el sistema, esto debido a que se compensa con el ciclo SBR la dificultad para mantener los niveles en la operación con membranas.

El aumento de la colmatación irreversible por bloqueo de poros posiblemente se debe a que ante la falta del recubrimiento superficial de la biotorta, queda la membrana accesible para las partículas que aún permanecen en la fase líquida además de una posible precipitación de compuestos disueltos, aunque después de un retardo inicial, la membrana es finalmente colonizada por los microorganismos, causando un aumento exponencial de la PTM y la consecuente caída del flux, lo cual se podría mitigar haciendo más eficientes los retrolavados o disminuir el flux afectando a la eficiencia del sistema. La combinación de los ciclos SBR con ciclos MBR da como resultado dos efluentes uno de mejor calidad que el otro, sin embargo muchas veces para una planta de tratamiento se requiere de un efluente para el uso con contacto directo humano y otro de menor calidad para riego o para descargar al colector.

En la operación con módulo externo, se tiene una menor tasa de colmatación debido a que la falta de sustrato, evita el desarrollo de biopelícula, de manera que los microorganismos al estar altamente especializados a la degradación de 4-clofófenol, ante la ausencia de éste no alcanzan a mantenerse con la degradación de biomasa y productos microbianos solubles, ya que según ha reportado Moreno-Andrade y Buitrón, 2004, al aclimatarse la biomasa al 4-clorofenol, se hace incapaz de consumir

incluso sustratos fácilmente biodegradables como el acetato de sodio, a diferencia de lo observado con la biomasa que degrada agua residual municipal o sustratos fácilmente biodegradables como el acetato o la glucosa.

En la literatura se reportan distintas tasas de colmatación que van desde 0.4 kPa/h por Zhang *et al.*, (2006) o 0.6 kPa/h por Sombatsompop *et al.*, (2006). Con gránulos aerobios se han reportado tasas de colmatación aún menores como Tu *et al.*, (2010), quienes reportan 0.03 kPa/día utilizando membranas con un tamaño de poro de 0.4 μm . Dividiendo la diferencia de la PTM máxima con la PTM inicial entre la tasa de colmatación, da un tiempo de regeneración teórico de la membrana de 96 días, superior al reportado por Yu *et al.*, (2008) que requirió de un lavado químico a los 17 días.

Coincidentemente, la mayoría de los estudios reportan un mejor desempeño de las membranas con biomasa granular que con lodo floculento (Tay et al, 2007, Li *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2008), ya que no se observa la formación de biotorta, ni la compresión de ésta, que son la causa principal de la colmatación, por el contrario, cuando han reportado que no hay diferencia (Sánchez *et al.*, 2010, Zhou *et al.*, 2007), posiblemente sus resultados son afectados por un problema de arrastre de sólidos o una alta proporción de productos microbianos solubles causados por una incompleta degradación en el reactor, suficiente para el crecimiento de los microorganismos.

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De los resultados publicados en los apartados del Capítulo 3, se llegó a las siguientes conclusiones parciales:

La granulación aerobia se lleva a cabo satisfactoriamente cuando el lodo activado es inicialmente aclimatado al 4-CF sin un co-sustrato, después cuando se aplica la presión de selección hidrodinámica se generan los gránulos. Se evaluó la influencia de la relación DQO/N en el desempeño de un sistema SBR con gránulos, encontrando que la limitación de nitrógeno no tiene efecto en las eficiencias de remoción de 4-CF (mayores al 99.7 %) y sobre las tasas específicas de degradación, que varían de 87 a 91 mg4-CF/mgSSV/h.

Gránulos aerobios de mayor diámetro fueron obtenidos a una relación DQO/N de 150 (R150, 0.741 mm diámetro) que en una relación DQO/N de 20 (R20, 0.328 mm diámetro). El IVL₅ presentó un valor menor (56 ± 12 mL/g) para R150 que el obtenido para R20 (76 ± 14 mL/g). Estos resultados indican que la limitación de nitrógeno tiene un efecto positivo en el tamaño del gránulo y genera biomasa densa cuando se utiliza como sustrato un compuesto inhibitorio. Los resultados muestran que las condiciones limitadas de nitrógeno afectan la relación proteínas/polisacáridos (PN/PS).

La biomasa granular tiene mejores condiciones físicas para el filtrado a corto tiempo con membranas sumergidas que los lodos activados convencionales, y la capacidad de filtración disminuye cuando se incrementa la cantidad de sólidos suspendidos totales (entre 2 y 4 gSST/L).

La introducción de una membrana en un sistema SBR con lodos granulares mejora la calidad del efluente sin afectar a las propiedades de la biomasa, no se encontró diferencia significativa en términos de las propiedades físicas (tamaño, porcentaje de gránulos, IVL, Vs) y de remoción (q, OLR) entre un sistema SBR con gránulos y un MSBR con gránulos.

La principal causa de la colmatación superficial de un sistema de lodos granulares con membranas sumergidas es la formación de una biopelícula. Las imágenes del CLMS revelan una estratificación de los EPS, observando polisacáridos en la superficie y en el interior de la membrana, mientras que las proteínas se localizan en la parte externa de la membrana, de manera que el crecimiento de los microorganismos en la superficie de la membrana forman una matriz que incluye a los EPS que son los principales responsables del taponamiento de las membranas.

La intercalación de un ciclo SBR entre dos ciclos MBR disminuye la tasa de colmatación de las membranas hasta un 25%, manteniendo una baja concentración de partículas finas en el medio.

Con la intercalación de ciclos SBR, el proceso se hace más robusto que el MBR y mantiene estables la mayoría de los parámetros de operación del reactor, con la desventaja de tener un segundo efluente de menor calidad, producto del ciclo SBR.

La intercalación del ciclo SBR disminuye la colmatación por biocapa, sin embargo el problema se traslada hacia la colmatación irreversible y no evita la formación de biopelícula.

La operación del módulo externo con membranas sumergidas con aireación, es una excelente opción para evitar la colmatación de las membranas en un sistema de lodos granulares, ya que disminuye la tasa de colmatación hasta en un 90%.

Los gránulos mantienen una alta remoción del 4-clorofenol superior al 99 % y de carga orgánica 1.19 kg 4-CF/m³·día, lo cual considerando la naturaleza inhibitoria del compuesto alimentado, es un proceso viable para ser aplicado a mayor escala con aguas residuales industriales.

A lo largo de esta Tesis en que se llevó a cabo la implementación de un proceso aerobio con membranas sumergidas en un reactor piloto SBR, se llegó a demostrar lo siguiente como conclusiones generales:

Es posible formar gránulos aerobios con baja aireación, debido al efecto inhibitorio del 4-CF y la limitación de nitrógeno, por tanto mediante el control de la carga orgánica y la relación DQO/N, se puede estabilizar el proceso para degradar compuestos tóxicos y así operar con membranas sumergidas obteniendo efluentes de alta calidad.

Al operar un proceso MBR con gránulos se obtiene un mejor desempeño que con lodos floculentos al retardarse la colmatación por el tamaño de partícula, sin embargo tiene un carácter mayormente irreversible. Los gránulos se mantienen estables con alta capacidad de degradación en un proceso SBR con membranas sumergidas, sin tener diferencia significativa con los gránulos de un proceso SBR.

La colmatación de las membranas en un reactor discontinuo secuencial de lodos granulares aerobios con membranas sumergidas (AGMSBR) se da principalmente por la adsorción de polisacáridos por parte de la membrana y el posterior desarrollo de una biopelícula tanto en el interior como en la superficie de la membrana.

Con la introducción de un ciclo SBR en la operación MBR, se retarda un poco la colmatación de la membrana (25%), al operar con la membrana sumergida en un módulo externo con aireación se logra mitigar la colmatación (90%) y se tienen buenas condiciones para el mantenimiento de los gránulos en el reactor.

RECOMENDACIONES

A partir de la experiencia adquirida en este trabajo, se puede comentar que el proceso de lodos granulares con membranas sumergidas puede tener un gran potencial de aplicación en los efluentes industriales que contengan aguas inhibitorias, como las petroquímicas, sin embargo se requiere realizar pruebas a nivel piloto con aguas.

Para obtener una mayor comprensión y control del proceso, es conveniente el modelado tanto de la degradación como de la filtración, para que de esa manera se pueda realizar la optimización encontrando los mejores parámetros de operación y eficiencia en los retrolavados.

Se requiere investigación en el área de los materiales de la membrana con la finalidad de obtener membranas que tengan un mayor potencial de inhibición en la formación y el crecimiento de biopelículas, así como resistencia a la adsorción de polisacáridos que las que están actualmente en el mercado, con ese tipo de membranas se podría operar con la membrana sumergida dentro del reactor.

REFERENCIAS

- Adav S. S., Chen M. Y., Lee D.J., Ren N. Q. (2007) Degradation of phenol by aerobic granules and isolated yeast *Candida tropicalis*, *Biotechnology Bioengineering*, 96,844–852.
- Adav S. S., Lee D. J., Lai J. Y. (2009) Treating chemical industries influent using aerobic granular sludge: recent development, *Journal Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(3), 333– 336.
- Adav S. S., Lee D. J., Show K. Y., Tay J. H. (2008) Aerobic granular sludge: recent advances, *Biotechnology Advances*, 26(5), 411–423.
- Adav S. S., Lee D.-J., Tay J.-H. (2008b) Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule, *Water Research*, 42(6-7), 1644–1650.
- Adav S. S., Lin J. C., Yang Z., Whiteley C. G., Lee D. J., Peng X. F., Zhang Z. P. (2010) Stereological assessment of extracellular polymeric substances, exo-enzymes, and specific bacterial strains in bioaggregates using fluorescence experiments, *Biotechnology Advances*, 28, 255–280.
- AFNOR. Evaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie “ultime” des produits organiques solubles, *Normalisation française*, NFT 90-312. France, 1985
- APHA. (2005) Standard methods for examination of water and wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. 20 th ed., Baltimore, Port City. part. 2000 y 5000.
- Arden E., Lockett W. T. (1914) Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters, *Journal of the Society of Chemical Industry*, 33(10), 523–538.
- Arrojo B., Mosquera-Corral A., Garrido J. M., Mendez R. (2004) Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors, *Water Research*, 38(14–15), 3389–3399.
- Atlas R. M., Bartha R. (2002) Ecología microbiana y microbiología ambiental, *Ed. Addison Wesley*, pp. 178-180.
- Bali U., Şengül F. (2002) Performance of a fed-batch reactor treating a wastewater containing 4-chlorophenol, *Process Biochemistry*, 37(11), 1317–1323.
- Bereschenko L. A., Stams A. J. M., Euverink G. J. W., van Loosdrecht M. C. M. (2010) Biofilm formation on reverse osmosis membranes is initiated and dominated by *Sphingomonas* spp. *Applied Environmental Microbiology*, 76, 2623-2632.

- Berk V., Fong J. C. N., Dempsey G. T., Develioglu O. N., Zhuang X., Liphardt J, Fitnat H., Yildiz F. H., Chu S. (2012) Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science* 337, 236-239
- Beun J. J., Hendriks A., Van Loosdrecht M. C. M., Morgenroth E., Wilderer P. A., Heijnen J. J. (1999) Aerobic granulation in a sequencing batch reactor, *Water Research*, 33(10), 2283-2290.
- Beun J. J., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (2002) Aerobic granule formation in a sequencing batch airlift reactor, *Water Research*, 36(3), 702-712.
- Buitrón G., Capdeville B. (1995) Enhancement of the biodegradation activity by the acclimation of the inoculums, *Environmental Technology*, 16, 1175-1184.
- Buitrón G., Razo-Flores E., Meraz M. Alatríste-Mondragón F. (2006) Biological wastewater treatment, advanced biological treatment processes for industrial wastewater, IWA publishing; 142-162.
- Buitrón G., Schoeb M. E., Moreno J. (2003) Automated sequencing batch bioreactor under extreme peaks of 4-chlorophenol, *Water Science and Technology*, 47, 175–181.
- Buitrón G., Schoeb M. E., Moreno-Andrade I., Moreno J. (2005) Comparison of two control strategies for an automated sequencing batch reactor under extreme peaks of 4-chlorophenol, *Water Research*, 39(6), 1015–1024.
- Burdman S., Jurkevitch E., Soria-Díaz M. E., Serrano A. M. G., Okon Y. (2000) Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation, *FEMS Microbiological Letters*, 189(2), 259–264.
- Campos J. L., Figueroa M., Mosquera A., Méndez R. (2009) Aerobic sludge granulation: state-of-the-art, *International Journal of Environmental Engineering*, 1(2), 136–151.
- Carucci A., Milia S., De Gioannis G., Piredda, M. (2009) Acetate-fed aerobic granular sludge for the degradation of 4-chlorophenol, *Journal of Hazardous Materials*, 166(1), 483–90.
- Carucci A., Milia S., De Gioannis G.D., Piredda M. (2008) Acetate-fed aerobic granular sludge for the degradation of chlorinated phenols, *Water Science and Technology*, 58, 309-315.
- Carucci A., Milia S., Giovanna G., Muntoni A. (2010) A direct comparison amongst different technologies (aerobic granular sludge, SBR and MBR) for the treatment of wastewater contaminated by 4-chlorophenol, *Journal of Hazardous Materials*, 177 (1-3), 1119- 1125.

- Cassidy D. P., Belia E. (2005) Nitrogen and phosphorus removal from an abattoir wastewater in a SBR with aerobic granular sludge, *Water Research*, 39(19), 4817–23.
- Chang, I., Clech, P. Le, Jefferson, B., Judd, S. (2002) Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment, *Journal of Environmental Engineering*, 128 (12), 1018–1029.
- Chen M. Y, Lee D. J., Tay J. H. (2007) Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 467–474.
- Chen M. Y., Lee D. J., Tay J. H. (2007b) Distribution of extracellular polymeric substances in aerobic granules, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1463–1469.
- Chen M. Y., Lee D. J., Yang Z., Peng X. F. (2006) Fluorescent staining for study of extracellular polymeric substances in membrane biofouling layers, *Environmental Science Technology*, 40, 6642–6646.
- Chen S.W., Lee C. M. (2011) Correlation between fouling propensity of soluble extracellular polymeric substances and sludge metabolic activity altered by different starvation conditions, *Bioresource Technology*, 102, 5375–5380
- Chen Y. C., Chen D., Peng., L. C., Fu S.Y., Zhan H.Y. (2009) The microorganism community of pentachlorophenol (PCP)-degrading coupled granules, *Water Science and Technology*, 59, 5987-5994.
- Chen Y., Jiang W., Liang D.T., Tay J.H. (2008) Aerobic granulation under the combined hydraulic and loading selection pressures, *Bioresource Technology*, 99, 7444–7449.
- Cho B. D., Fane A. G. (2002) Fouling transients in nominally sub-critical flux operation of a membrane bioreactor, *Journal of Membrane Science*, 209, 391-403.
- Choo K. H., Lee C. H. (1996) Membrane fouling mechanisms in the membrane coupled anaerobic bioreactor, *Water Research*, 30(8), 1771-1780
- Chu H., Cao D., Jin W., Dong B. (2008) Characteristics of bio-diatomite dynamic membrane process for municipal wastewater treatment, *Journal of Membrane Science*, 325(1), 271–276.
- Chu Y., Juang N., Adav S. S., Lee D. J., Lai J. Y.,H. (2010) Influence of internal biofilm growth on residual permeability loss in aerobic granular membrane bioreactors., *Environmental Science and Technology*, 44, 1267-1273.
- Comisión Nacional del Agua. (2011) Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Edición 2011. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, Tlalpan, México, D.F., p.53

Damayanti A., Ujang Z., Salim M. R., Olsson G. (2011) The effect of mixed liquor suspended solids (MLSS) on biofouling in a hybrid membrane bioreactor for the treatment of high concentration organic wastewater, *Water Science and Technology*, 63(8), 1701.

Dangcong P., Bernet N., Delgenes J., Moletta R. (1999) Rapid communication aerobic granular sludge a case report, *Water Research*, 33(3), 890–893.

Davies D. G. (1998) The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm, *Science*, 280(5361), 295–298.

de Kreuk M. K., Kishida N., van Loosdrecht M. C. M. (2007) Aerobic granular sludge state of the art, *Water Science and Technology*. 55 (8–9), 75–81.

De Kreuk M. K., Picioreanu C., Hosseini M., Xavier J. B., Van Loosdrecht M. C. M. (2007b) Kinetic model of a granular sludge SBR: influences on nutrient removal, *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4), 801–815.

de Kreuk M. K., Pronk M., van Loosdrecht M. C. M. (2005) Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures, *Water Research*, 39(18), 4476–4484.

de Kreuk M. K., van Loosdrecht M. C. M. (2004) Selection of slow growing organisms as a means for aerobic granular sludge stability, *Water Science and Technology*, 49(11-12), 9-19.

Drews A. (2010) Membrane fouling in membrane bioreactors—Characterization, contradictions, cause and cures, *Journal of Membrane Science*, 363, 1–28.

Drews A., Mante J., Iversen V., Vocks M., Lesjean B., Kraume M. (2007) Impact of ambient conditions on SMP elimination and rejection in MBRs, *Water Research*, 41, 3850–385

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28, 350-356

Duque A .F., Bessa V. S., Carvalho M. F., de Kreuk M. K., van Loosdrecht M. C. M., Castro P. M. (2011) 2-Fluorophenol degradation by aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor, *Water Research*, 45, 6745-6752.

Dvorák L. Gómez M., Dvoráková M., Ruzicková I, Wanner J. (2011) The impact of different operating conditions on membrane fouling and EPS production, *Bioresource Technology*, 102, 6870–6875

Etterer T., Wilderer P. A. (2001) Generation and properties of aerobic granular sludge, *Water Science and Technology*, 43(3), 19–26

- Feng S., Zhang N., Liu H., Du X., Liu Y., Lin H. (2012) The effect of COD/N ratio on process performance and membrane fouling in a submerged bioreactor, *Desalination*, 285, 232–238
- Flemming H. C., (2002) Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 629–640.
- Flemming H. C., Schaule G. (1988) Biofouling on membranes a microbiological approach, *Desalination*, 7, 95-119
- Flemming H. C., Schaule G., Griebe T., Schmitt J., Tamachkiarowa A. (1997) Biofouling the Achilles heel of membrane processes, *Desalination*, 113, 215-225
- Flemming H. C., Wingender J. (2010) The biofilm matrix, *Nature Reviews in Microbiology*, 8, 623–633.
- Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H. (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin, *Water Research*, 30, 1749–1758.
- Gao D. W., Liu L., Liang H. (2013) Influence of aeration intensity on mature aerobic granules in sequencing batch reactor, *Applied. Microbiology and Biotechnology*, 97:4213–4219.
- Gao D., Liu L., Liang H., Wu W. M. (2011) Aerobic Granular sludge: characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment, *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(2), 137–152.
- Gong A. S., Bolster C. H., Benavides M., Walker S. L. (2009) Extraction and analysis of extracellular polymeric substances: comparison of methods and extracellular polymeric substance levels in *Salmonella pullorum* SA 1685, *Environmental Engineering Science*, 26(10), 1523–1532.
- Ghangrekar M. M., Asolekar S. R., Joshi S. G. (2005) Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation, *Water Research* 39, 1123–1133
- Green F. J. (1990) Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators, *Sigma Handbooks*, p. 377
- Hashino, M., Katagiri, T., Kubota, N., Ohmukai, Y., Maruyama, T., Matsuyama, H. (2011). Effect of surface roughness of hollow fiber membranes with gear-shaped structure on membrane fouling by sodium alginate, *Journal of Membrane Science*, 366(1-2), 389–397.
- He S., Xue G., Wang B. (2006) Activated sludge ozonation to reduce sludge production in membrane bioreactor (MBR), *Journal of Hazardous Materials*, 135(1-3), 406–11.

- Heldal M., Norland S., Fagerbakke K. M., Thingstad F., Bratbak G. (1996) The elemental composition of bacteria: a signature of growth conditions? *Marine Pollution Bulletin*, 33, 3–9.
- Herrera-Robledo M., Arenas C., Morgan-Sagastume J. M., Castaño V., Noyola A. (2011) Chitosan/albumin/CaCO₃ as mimics for membrane bioreactor fouling: genesis of structural mineralized-EPS-building blocks and cake layer compressibility, *Chemosphere*, 84(2), 191–198.
- Ho K. L., Chen Y. Y., Lin B., Lee D. J. (2010) Degrading high-strength phenol using aerobic granular sludge, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 2009–2015.
- Hwang B.-K., Lee W.-N., Park P.-K., Lee C.-H., Chang I.-S. (2007) Effect of membrane fouling reducer on cake structure and membrane permeability in membrane bioreactor, *Journal of Membrane Science*, 288(1-2), 149–156.
- Iversen V., Mehrez R., Horng Y., Chen C.H., Feng F., Drews A., Lesjean B., Ernst M., Jekel M., Kraume M. (2009) Fouling mitigation through flocculants and adsorbents addition in membrane bioreactors: comparing lab and pilot studies, *Journal of Membrane Science*, 345, 21–30.
- Jang A., Yoon Y. H., Kim I. S., Kim K. S., Bishop P. L. (2003) Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor, *Journal of Biotechnology*, 105(1-2), 71–82.
- Jiang H. L., Maszenan A. M., Zhao Z. W., Tay J. H. (2010) Properties of phenol-removal aerobic granules during normal operation and shock loading, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 253-262.
- Jiang H. L., Tay J. H., Tay S. T. L. (2002) Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic degradation of phenol, *Letters in Applied Microbiology*, 35, 439–445.
- Jiang H. L., Tay J. H., Tay S. T. L. (2004) Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 602-608.
- Jiang T., Kennedy M. D., Van der Meer W. G. J., Vanrolleghem P. A., Schippers J. C. (2003) The role of blocking and cake filtration in MBR fouling, *Desalination*, 157(1-3), 335–343.
- Juang Y .C., Adav S. S, Duu-Jong L., Tay J. H. (2010c) Stable aerobic granules for continuous-flow reactors: Precipitating calcium and iron salts in granular interiors, *Bioresource Technology*, 101, 8051–8057.

- Juang Y .C., Su A., Fang L.H., Lee D.J., Lai J.Y. (2011) Fouling with aerobic granule membrane bioreactor, *Water Science and Technology*, 64, 1870-1875.
- Juang Y. C., Adav S.S ., Lee D. J.; Lai J. Y. (2009) Biodiversity in aerobic granule membrane bioreactor at high organic loading rates, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 383–388.
- Juang Y. C., Adav S.S ., Lee D. J.; Lai J. Y. (2010) Influence of internal biofilm growth on residual permeability loss in aerobic granular membrane bioreactors, *Environmental Science and Technology*, 44, 1267–1273.
- Juang Y. C., Lee D. J., Lai J. L. (2008) Fouling layer on hollow-fibre membrane in aerobic granule membrane bioreactor, *Journal of Chinese Institute of Chemical. Engineers*, 39, 657-661.
- Juang, Y. C, Adav S. S, Duu-Jong L. (2010b) Strains of internal biofilm in aerobic granular membrane bioreactors, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1987–1993.
- Khan M. Z., Khan F., Sabir S. (2011) Aerobic granular treatment of 2,4-dichlorophenol, *Canadian Journal of Chemical Engineers*, 89, 914–920.
- Kim I. S., Kim S. M., Jang A. (2008) Characterization of aerobic granules by microbial density at different COD loading rates, *Bioresource Technology*, 99(1), 18–25.
- Kim J., Jung J., Yeom I., Aoh G. (2006) Effect of fouling reduction by ozone backwashing in a microfiltration system with advanced new membrane material, *Desalination*, 202, 361–368.
- Kong Y., Liu Y. Q., Tay J. H., Wong F. S., Zhua J. (2009) Aerobic granulation in sequencing batch reactors with different reactor height/diameter ratios, *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 379–383.
- Koros W. J., Ma Y. H., Shimidzu T. (1996) Terminology for membranes and membrane processes (IUPAC Recommendations 1996), *Pure and Applied Chemistry*, 68(7), 1479-1489.
- Laguna A., Ouattara A., Gonzalez R. O., Baron O., Fam G., El Mamouni R., Guiot S., Monroy O., Macarie H. (1999) A simple and low cost technique for determining the granulometry of upflow anaerobic sludge blanket reactor sludge, *Water Science and. Technology*, 40, 8, 1–8.
- Lapidou C. S., Rittmann B. E.. (2002) Non steady state modeling of extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass, *Water Research*, 36, 1983–1992
- Le-Clech P. (2010) Membrane bioreactors and their uses in wastewater treatments, *Applied microbiology and biotechnology*, 88(6), 1253–1260.
- Le-Clech P., Chen V., Fane T. A. G. (2006) Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment, *Journal of Membrane Science*, 284, 17–53.

- Le-Clech P., Jefferson B., Chang I. S., Judd S. (2003) Critical flux determination by the flux-step method in a submerged membrane bioreactor, *Journal of Membrane Science*, 227, 81–93.
- Lee D. J., Chen Y. Y., Show K.Y., Whiteley C. G., Tay J. H. (2010) Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation, *Biotechnological Advances*, 28, 919–934.
- Lee J., Ahn W. Y., Lee C. H. (2001) Comparison of the filtration characteristics between attached and suspended growth microorganisms in submerged membrane bioreactor, *Water Research*, 35(10), 2435–4245.
- Lee W. N. Chang I. S., Hwang B. K., Park P. K., Lee C. H., Yeon K. M., Oh H.S., Huang X., (2008) Correlation of biofouling with the bio-cake architecture in an MBR, *Desalination*, 231, 115–123
- Lee W., Kang S., Shin H. (2003) Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors, *Journal of Membrane Science*, 216, 217–227
- Lemaire R., Webb R., Yuan Z. (2008) Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater, *The ISME Journal*, 2, 528–541
- Li A. J., Zhang T., Li X. Y. (2010) Fate of aerobic bacterial granules with fungal contamination under different organic loading conditions, *Chemosphere*, 78, 500–509.
- Li S., Heijman S. G. J., Verberk J. Q. J. C., Verliefde a. R. D., Kemperman J. B., Van Dijk J. C., Amy, G. (2009) Impact of backwash water composition on ultrafiltration fouling control, *Journal of Membrane Science*, 344(1-2), 17–25.
- Li X. F., Gao F. S., Hu Z. Z. (2005) Treatment of synthetic wastewater by a novel MBR with granular sludge developed for controlling membrane fouling, *Separation and Purification Technology*, 46(1–2), 19–25.
- Li X. F., Li Y. J., Liu H., Hu Z. Z., Du G. C., Chen J. (2008) Correlation between extracellular polymeric substances and aerobic biogranulation in membrane bioreactor, *Separation and Purification Technology*, 59(1), 26–33.
- Li X. F., Li Y., Liu H., Hu Z. Z., Du G., Chena J. (2007) Characteristics of aerobic biogranules from membrane bioreactor system, *Journal of Membrane Science*, 287, 294–299.
- Li, W.-W., Wang, Y.-K., Sheng, G.-P., Gui, Y.-X., Yu, L., Xie, T.-Q., Yu, H.-Q. (2012). Integration of aerobic granular sludge and mesh filter membrane bioreactor for cost-effective wastewater treatment, *Bioresource Technology*, 122, 22–6.

- Liao B. Q., D. G. Allen I. G. Droppo G., Leppard G., Liss S. N. (2001) Surface properties of activated sludge and their role in bioflocculation and settleability, *Water Research*, 35, 339–350.
- Liu H., Li, Y., Yang C., Pu W., He L., Bo F. (2012c) Stable aerobic granules in continuous-flow bioreactor with self-forming dynamic membrane, *Bioresource Technology*, 121, 111–118.
- Liu Q. S., Liu Y., Show K. Y., Tay J. H. (2009b) Toxicity effect of phenol on aerobic granules, *Environmental Technology*, 30(1), 69–74.
- Liu Q. S., Yang S. F., Tay J. H., Liu Y. (2004) Stressful Conditions Induced Production of Extracellular Polysaccharides in Aerobic Granulation Process, *Civil Engineering Research*, 17, 49–51.
- Liu T., Chen Z., Yu W., You S. (2011) Characterization of organic membrane foulants in a submerged membrane bioreactor with pre-ozonation using three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy, *Water Research*, 45(5), 2111–2121.
- Liu X. W., Sheng G. P., Yu H. Q. (2009) Physicochemical characteristics of microbial granules, *Biotechnology Advances*, 27, 1061–1070.
- Liu Y. J., Sun D. D. (2012) Particles size-associated membrane fouling in microfiltration of denitrifying granules supernatant, *Chemical Engineering Journal*, 181–182, 494–500
- Liu Y. Q., Tay J. H. (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge, *Water Research*, 36(7), 1653–65.
- Liu Y. Q., Tay J. H. (2006) Variable aeration in sequencing batch reactor with aerobic granular sludge, *Journal of Biotechnology*, 124, 338-346.
- Liu Y., Wang Z. W., Tay J. H. (2005) A unified theory for up scaling granular sludge sequencing batch reactors, *Biotechnology Advances*, 23, 335-344.
- Liu Y.-J., Sun D. D. (2012b) Membrane fouling mechanism in dead-end microfiltration of denitrifying granular sludge mixed liquors developed in SBRs at different calcium concentrations, *Journal of Membrane Science*, 396, 74–82.
- Liu Y.-Q., Tay J.-H., Ivanov V., Moy B. Y.-P., Yu L., Tay S. T.-L. (2005b) Influence of phenol on nitrification by microbial granules, *Process Biochemistry*, 40(10), 3285–3289.
- Lowry O. H.; Rosenbrough N. J.; Farr A. L.; Randall R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biology Chemistry*, 193, 265-175.
- Maszenan A. M., Liu Y., Ng W. J. (2011) Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules, *Biotechnological Advances*, 29(1), 111–123.

- McSwain B. S., Irvine R. L., Hausner M., Wilderer P. A. (2005) Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge, *Applied Environmental Microbiology*, 71(2), 1051–1057.
- McSwain B. S., Irvine R. L., Wilderer P. A. (2004) The effect of intermittent feeding on aerobic granule structure, *Water Science and Technology*, 49, 19-25.
- Meng F., Chae S. R., Drews A., Kraume M., Shin H. S., Yang F. (2009) Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material, *Water Research*, 43(6), 1489–1512.
- Mishima I., Nakajima J. (2009) Control of membrane fouling in membrane bioreactor process by coagulant addition, *Water Science and Technology*, 59(7), 1255–1262.
- Mishima K., Nakamura M. (1991) Self-immobilization of aerobic activated sludge—a pilot study of the aerobic upflow sludge blanket process in municipal sewage treatment, *Water Science and Technology*, 23(4–6), 981–990.
- Monsalvo, V. M., Mohedano, A. F., Casas, J. A., Rodríguez, J. J. (2009) Bioresource Technology
Cometabolic biodegradation of 4-chlorophenol by sequencing batch reactors at different temperatures, *Bioresource Technology*, 100(20), 4572–4578.
- Moreno G., Buitrón G. (2004) Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol, *Bioresource Technology*, 94, 215-218.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2004) Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol, *Water Science and Technology*, 50(10), 251–258.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2012) Comparison of the performance of membrane and conventional sequencing batch reactors degrading 4-chlorophenol, *Water Air and Soil Pollution*, 223, 2083–2091
- Moreno-Andrade I., Buitron G., Betancur M., Moreno J (2006) Optimal biodegradation of inhibitory wastewaters in a fed-batch bioreactor, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 713–720.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G., Pérez J., Betancur M. J., Moreno J. A. (2006b) Biodegradation of high 4-chlorophenol concentrations in a discontinuous reactor fed with an optimally controlled influent flow rate, *Water Science and Technology*, 53(11), 261–268.
- Morgan J. W., Foster C. F., Evison L. (1990) A Comparative Study of the Nature of Biopolymers Extracted from Anaerobic and Activated Sludges, *Water Research*, 24(6), 743 –750.

- Morgenroth E., Sherden T., Van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J.J., Wilderer A. (1997) Rapid communication: aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor, *Water Research*, 31(12), 3191-3194.
- Mosquera-Corral A., de Kreuk M. K., Heijnen J. J., and van Loosdrecht, M. C. M. (2005) Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor, *Water Research*, 39(12), 2676–2686.
- Nancharaiah Y. V., Schwarzenbeck N., Mohan T. V. K., Narasimhan S. V., Wilderer P. A., Venugopalan V. P. (2006) Biodegradation of nitrilotriacetic acid (NTA) and ferric–NTA complex by aerobic microbial granules, *Water Research*, 40, 1539-1546.
- Neu T. R., Woelfl S., Lawrence J. R. (2004) Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy single-photon and two-photon excitation, *Journal of Microbiological Methods*, 56, 161–172.
- Ng H. Y., Hermanowics S. W. (2005) Specific resistance to filtration of biomass from membrane bioreactor and activated sludge: effects of extracellular polymeric substances and dispersed microorganisms, *Water Environmental Research*, 77(2), 187-92
- Ng H., Wee T., Leong S. (2006) Membrane fouling of submerged membrane bioreactors: impact of mean cell residence time and the contributing factors, *Environmental Science and Technology*, 40, 2706-2713
- Ng H.Y., Guo W., Xing W. (2008) Evaluation of a novel sponge-submerged membrane bioreactor (SSMBR) for sustainable water reclamation, *Bioresource Technology*, 99, 2429–2435.
- Ni B., Yu H. (2010) Modeling and Simulation of the Formation and Utilization of Microbial Products in Aerobic Granular Sludge, *AIChE Journal*, 56(2) 546–559.
- Nielsen P. H., Jahn A., (1999) In *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function* (Eds.: J. Wingender, H. C. Flemming, T. R. Neu), Springer, Berlin, 258.
- Nosyk O., Ter Haseborg E., Metzger U., Frimmel F. H. (2008) A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization, *Journal of Microbiological Methods*, 75(3), 449–456.
- O’Toole G. A., Kolter R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis, *Molecular Microbiology*, 28, 449–461.

- Olmos A., Olguin P., Fajardo C., Razo E., Monroy O. (2004) Physicochemical characterization of spent caustic from the oximer process and sour waters from mexican oil refineries, *Energy and Fuels*, 18, 302-304
- Peiris, R. H., Budman, H., Moresoli, C., Legge, R. L. (2011) Fluorescence-based fouling prediction and optimization of a membrane filtration process for drinking water treatment, *ALChE Journal*, 00(0), 1–12. doi:10.1002/aic
- Pan J. R., Su Y. C., Huang C., Lee H. C. (2010) Effect of sludge characteristics on membrane fouling in membrane bioreactors, *Journal of Membrane Science*, 349(1-2), 287–294.
- Qin L., Liu Q. S., Yang S. F., Tay J. H., Liu Y. (2004) Stressful conditions induced production of extracellular polysaccharides in aerobic granulation process, *Civil Engineering Research*, 17, 49–51.
- Rosenberger S., Evenblij H., Poele S., Wintgens T., Laabs C. (2005) The importance of liquid phase analyses to understand fouling in membrane assisted activated sludge processes six case studies of different European research groups, *Journal of Membrane Science*, 263, 113-126.
- Sahinkaya E., Dilek F.B. (2005) Biodegradation of 4-chlorophenol by acclimated and unacclimated activated sludge-evaluation of biokinetic coefficients, *Environmental Research*, 99, 243-252.
- Sánchez A., Garrido J. M., Méndez R. (2010) A comparative study of tertiary membrane filtration of industrial wastewater treated in a granular and a flocculent sludge SBR, *Desalination*, 250, 810–814.
- Sánchez A., Garrido J. M., Méndez R. (2011) Tertiary membrane filtration of an industrial wastewater using granular or flocculent biomass sequencing batch reactors, *Journal of Membrane Science*, 382(1-2), 316–322.
- Schwarzenbeck N., Erley R., Wilderer P. A. (2004) Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter, *Water Science and Technology*, 49(11-12), 41–46.
- Sengha S. S., Anderson A. J., Hacking A. J., Dawes E. A. (1989) The Production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture, *Journal of General Microbiology*, 135(4), 795-804.
- Shen Y., Zhao W., Xiao K., Huang X. (2010) A systematic insight into fouling propensity of soluble microbial products in membrane bioreactors based on hydrophobic interaction and size exclusion, *Journal of Membrane Science*, 346(1), 187–193.

- Smith C. V., Gregorio D. O., Talcott R. M. (1969) The use of ultrafiltration membranes for activated sludge separation. *Proceedings 24rd Industrial Waste Conference*, Purdue University, Ann Arbor Science, Ann Arbor, USA, 1300-1310
- Sombatsompop K., Visvanathan C., Ben A. R. (2006) Evaluation of biofouling phenom in suspended and attached growth membrane biorreactor systems, *Desalination*, 201(1-3), 138-149
- Stoller, M. (2009) On the effect of flocculation as pretreatment process and particle size distribution for membrane fouling reduction, *Desalination*, 240(1-3), 209–217.
- Sun F. Y., Wang X. M., Li X. Y. (2011) Change in the fouling propensity of sludge in membrane bioreactors (MBR) in relation to the accumulation of biopolymer clusters, *Bioresource Technology*, 102, 4718–4725
- Sun F., Wang X., Li X. (2008) Visualisation and characterisation of biopolymer clusters in a submerged membrane bioreactor, *Journal of Membrane Science*, 325(2), 691–697.
- Sutherland I. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework, *Microbiology*, 147(1), 3–9.
- Tay J. H., Jiang H. L., Tay S. T. L. (2004) High rate biodegradation of phenol by aerobically grown microbial granules, *Journal of Environmental Engineering ASCE*, 130, 1415-1423.
- Tay J. H., Liu Q. S. Liu Y. (2001) The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 227-233.
- Tay J. H., Liu Q. S., Liu Y. (2001b) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules, *Letters in Applied Microbiology*, 33(3), 222–226.
- Tay J. H., Liu Q. S., Liu Y. (2002) Characteristics of aerobic granules grown on glucose and acetate in sequential aerobic sludge blanket reactors, *Environmental Technology*, 23(8), 931-936
- Tay J. H., Liu Q. S., Liu Y. (2004b) The effect of upflow air velocity on the structure of aerobic granules cultivated in a sequencing batch reactor, *Water Science and Technology*, 49(11–12), 35–40.
- Tay J. H., Pan S., Tay S. T. L., Ivanov V., Liu Y. (2003) The effect of organic loading rate on aerobic granulation: the development of shear force theory, *Water Science and Technology*, 47, 235-240.
- Tay J. H., Yang P., Zhuang W. Q., Tay S. T. L., Pan Z. H. (2007) Reactor performance and membrane filtration in aerobic granular sludge membrane bioreactor, *Journal of Membrane Science*, 304, 24–32.
- Tay J.-H., Ivanov V., Pan S., Tay S. T.-L. (2002c) Specific layers in aerobically grown microbial granules, *Letters in applied microbiology*, 34(4), 254–7.

- Tay J.-H., Yang S.-F., Liu Y. (2002b) Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 332–7.
- Tay S. T. L., Moy B. Y. P., Jiang H. L., Tay J. H. (2005) Rapid cultivation of stable aerobic phenol-degrading granules using acetate-fed granules as microbial seed, *Journal of Biotechnology*, 115, 387-395.
- Technobagolous, Metcalf and Eddy (2003). Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4th ed. McGRAW-HILL: ISBN 0-07-112250-8.
- Thanh, B. X., Visvanathan C., Ben Aim R. (2013) Fouling characterization and nitrogen removal in a batch granulation membrane bioreactor, *International Biodeterioration & Biodegradation*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.02.005>
- Thanh B. X., Visvanathan C., Sperandio M., Ben Aim R., Guigui C., Wan J., Visvanathan C. (2010) Coupling sequencing batch airlift reactor (SBAR) and membrane filtration: Influence of nitrate removal on sludge characteristics, effluent quality and filterability, *Desalination* 250, 850–854
- Thanh, B. X., Visvanathan C., Sperandio M., Ben Aim R. (2008) Fouling characterization in aerobic granulation coupled baffled membrane separation unit, *Journal of Membrane Science*, 318, 334–339.
- Tijhuis L., Van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (1994) Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors, *Biotechnology and Bioengineering* 44(5), 595- 608.
- Tsuneda S., Nagano T., Hoshino T., Ejiri Y., Noda N., Hirata A. (2003) Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor, *Water Research*, 37, 4965-4973.
- Tsuneda S., Ogiwara M., Ejiri Y., Hirata A. (2006) High-rate nitrification using aerobic granular sludge, *Water Science and Technology*, 53(3), 147-154.
- Tu X., Zhang S., Xu L., Zhang M., Zhu J. (2010) Performance and fouling characteristics in a membrane sequence batch reactor (MSBR) system coupled with aerobic granular sludge, *Desalination*, 261 (1-2), 191-196.
- van Loosdrecht M. C. M. , Eikelboom D. H., Gjaltema A., Mulder A., Tijhuis L., Heijnen J. J. (1995) Biofilm structures, *Water Science and Technology*, 32(8), 35–43.
- van Loosdrecht M. C. M., Pot M. A., Heijnen J. J. (1997) Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses, *Water Research*, 35(1), 41–47.

- Vargas A., Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2008) Controlled backwashing in a membrane sequencing batch reactor used for toxic wastewater treatment, *Journal of Membrane Science*, 320, 185-190.
- Visvanathan C., Ben Aim R., Parameshwaran K. (2000) Membrane separation bioreactors for wastewater treatment, Critical review, *Environmental Science and Technology*, 30(1), 1-48.
- Wang J. F., Qiu Z. G., Chen Z. Q., Li J.W., Zhang Y. H., Wang X., Zhang B. F. (2012) Comparison and analysis of membrane fouling between flocculent sludge membrane bioreactor and granular sludge membrane bioreactor, *PLoS ONE*, 7, art. no. e40819.
- Wang J., Bessiere Y., Sperandio M. (2009) Alternating anoxic feast/aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at reduced aeration rate, *Water Research*, 43, 5097-5108.
- Wang J., Wang X., Zhao Z., Li J. (2008) Organics and nitrogen removal and sludge stability in aerobic granular sludge membrane bioreactor, *Applied Microbiology Biotechnology*, 79, 679-685
- Wang Q., Du G., Chen J. (2004) Aerobic granular sludge cultivated under the selective pressure as a driving force, *Process Biochemistry*, 39, 557-563.
- Wang S.G., Liu X.W., Zhang H.Y., Gong W.X., Sun X.F., Gao B.Y. (2007) Aerobic granulation for 2,4-dichlorophenol biodegradation in a sequencing batch reactor, *Chemosphere*, 69, 769-775.
- Wang X., Zhang B., Shen Z., Qiu Z., Chen Z., Jin M., Li J., Wang J.F. (2010) The EPS characteristics of sludge in an aerobic granule membrane bioreactor, *Bioresource Technology*, 101, 8046-8050.
- Wang Y.-L., Yu S.-L. (2009b) Comparative performance between a novel aerobic granular sludge membrane bioreactor and a conventional activated floc sludge membrane bioreactor, *2009 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 1-4.
- Wang Z., Wu Z. (2009) A review of membrane fouling in MBRs: characteristics and role of sludge cake formed on membrane surfaces, *Separation Science and Technology*, 44, 3571-3596.
- Wilderer P. A., Irvine R. L., Goronszy M. C. (2001) Sequencing batch reactor technology. (scientific and technical report No 10). IWA Publishing, London, 76pp.
- Xavier J. B., De Kreuk M. K., Picioreanu C., Van Loosdrecht M. C. M. (2007) Multi-scale individual-based model of microbial and bioconversion dynamics in aerobic granular sludge, *Environmental Science and Technology*. 41(18), 6410-7.
- Yamamoto K., Hiasa M., Mahmood T., Matsuo T. (1989) Direct solid-liquid separation using hollow fibre membrane in an activated sludge aeration tank, *Water Science and Technology*. 24, 43-54

- Yang S. F., Tay J. H., Liu Y. (2003) A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater, *Journal of Biotechnology*, 106, 77–86
- Yang S. F., Tay J. H., Liu Y. (2005) Effect of substrate nitrogen/chemical oxygen demand ratio on the formation of aerobic granules, *Journal of Environmental Engineering*, 131, 86-92.
- Yang S. F., Tay J.-H., Liu Y. (2004) Inhibition of free ammonia to the formation of aerobic granules, *Biochemical Engineering Journal*, 17, 41–48.
- Yang X. L., Song H. L., Lu J. L., Fu D. F., Cheng B. (2010) Influence of diatomite addition on membrane fouling and performance in a submerged membrane bioreactor, *Bioresource Technology*, 101, 9178–9184
- Yi S., Zhuang W.Q., Wu B., Tay S. L. T, Tay J. H. (2006) Biodegradation of p-nitrophenol by aerobic granules in a sequencing batch reactor, *Environmental Science and Technology*, 40(7), 2396-2401.
- Young J. M., Leschine S. B. Reguera G. (2011) Reversible control of biofilm formation by *Cellulomonas spp.* in response to nitrogen availability, *Environmental Microbiology*, 14(3), 594-604.
- Yu H. Y., Liu L. Q., Tang Z. Q., Yan M. G., Gu J. S., Wei X. W. (2008) Mitigated membrane fouling in an SMBR by surface modification, *Journal of Membrane Science*, 310, 409–417.
- Zator M., Ferrando M., López F., Güell C. (2007) Membrane fouling characterization by confocal microscopy during filtration of BSA/dextran mixtures, *Journal of Membrane Science*, 301, 57-66.
- Zhang J., Chua H. C., Zhou J., Fane A. C. (2006) Factors Affecting the Membrane Performance in Submerged Membrane Bioreactors, *Journal of Membrane Science*, 284(1-2) 612–624.
- Zhou J., Yang, F. L., Meng F. G., Peng A., Wang D. (2007) Comparison of membrane fouling during short-term filtration of aerobic granular sludge and activated sludge, *Journal of Environmental Sciences China*, 19, 1281–1286.
- Zhuang W. Q., Tay J. H., Yi S., Tay S. T. L. (2005) Microbial adaptation to biodegradation of tert-butyl alcohol in a sequencing batch reactor, *Journal of Biotechnology*, 118(1), 45–53.

ANEXO I PRODUCTOS DE LA TESIS

Artículo publicado:

Effect of the organic matter to ammonia ratio on the aerobic granulation during the 4-chlorophenol degradation in a sequencing batch reactor, *CLEAN- Soil, Air, Water*. doi: [10.1002/clen.201200620].

Artículo sometido:

Membrane Biofouling Mechanism in an Aerobic Granular reactor degrading 4-Chlorophenol, para: *Water Science and Technology*.

Congresos:

Efecto de la Relación DQO/N en la formación de gránulos Aerobios, XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Juriquilla, Qro.

Presentación en forma de cartel del trabajo “Estrategias de anticolmatación en la operación de un MBR con gránulos aerobios” durante el III Congreso IWA México Young Water Professionals, San Luis Potosí. Abril 2013.

Presentación oral del trabajo “Implementación de un proceso aerobio de logros granulares con membranas sumergidas” en el primer congreso de alumnos de posgrado, UNAM. Mayo 2011.

Fouling in Membrane for 4-CP Remotion with Aerobic Granular Biomass, IWA Regional Membrane 2012 Congress, Buenos Aires, Argentina.

Membrane Biofouling Mechanism in an Aerobic Granular reactor degrading 4-Chlorophenol, 7th IWA Specialised Membrane Technology Conference and Exhibition for Water and Wastewater Treatment and Reuse, Toronto, Canadá.

Artículos en preparación:

Performance of Aerobic Granules with Submerged Membranes Bioreactor for Fenolic Wastes Degradation in a Sequencing Batch Reactor, para: *Journal of Membrane Science*.

Comparation of two Antifouling Strategies in the Operation of an MBR with Aerobic Granular Sludge, para: *Biofouling*.

ANEXO II OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

A1.1 Determinación de Fenoles Totales. (APHA, 2005)

Soluciones:

C) Solución tampón de fosfato: se disuelven 52.25g de K_2HPO_4 y 36.15g de KH_2PO_4 y aforar a 500mL. El pH debe ser 6.8

D) Solución 0.5N de hidróxido de amonio: 35mL NH_4OH aforar a 1lt. (3.5mL aforar a 100mL.) Ajustar a pH 7.9 con C)

E) Solución de 4-aminoantipirina: se disuelve 1g de aminoantipirina en agua destilada y aforar a 50mL (caduca en 4 semanas).

F) Solución de ferrocianuro de potasio: se disuelven 4g de $K_3Fe(CN)_6$ en agua destilada y aforar a 50mL. Filtrar si es necesario y guardar en frasco ámbar.

Procedimiento:

Preparación de la muestra. La concentración máxima que puede leerse es 5 mg/l. La muestra se debe diluir lo suficiente para que la concentración de fenol quede en el intervalo de 0 a 5 mg/L, considerando que el volumen final de la muestra debe ser 50mL.

Tratamiento: vaciar los 50mL en un vaso de precipitados y agregar: 1.25mL de solución D, 0.5mL de solución E, 0.5 mL de solución F.

Se prepara un blanco con agua destilada siguiendo el mismo procedimiento.

Mezclar bien y dejar reaccionar 15min.

Leer en el espectrofotómetro HACH usando el método que contiene la curva estándar.

A1.2 Productos microbianos solubles (PMS) o EPS sueltos

Obtener 30 mL de muestra del reactor al final de la reacción.

Centrifugar a 4000 rpm por 20 min. y recuperar el sobrenadante

Analizar el sobrenadante (polisacáridos y proteínas).

1.2.1 Extracción con NaCl de EPS ligados

Mezclar completamente con 50 ml NaCl al 0.9 %.

Calentar a 80°C por una hora y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Anotar los ml de solución.

Centrifugar la solución extraída a 4000 rpm por 20 min.

Analizar el sobrenadante para SPE ligados.

A1.2.2 Extracción con resina de EPS ligados. (Frolund *et al.*, 1996)

Obtener 30 mL de muestras del reactor al final de la reacción.

Centrifugar a 4000 g por 20 min y desechar el sobrenadante.

Resuspender la biomasa hasta 30 mL con buffer de fosfato recién preparado.

Transferir a un contenedor cerrado y agregar 70 g/g SSV de resina de intercambio catiónico (DOWEX 50 X 8). Agitar a 600 rpm por 2 horas en un baño de agua con hielo.

Centrifugar a 7,500 g por 30 min.

Analizar el sobrenadante (Carbohidratos y proteínas).

Buffer de fosfato

0.526 g NaCl

0.075 g KCl

0.328 g Na_3PO_4

0.479 g NaH_2PO_4

Aforar a 1 litro

A1.2.3 Análisis Polisacáridos (modificado de Dubois *et al.*, 1956)

Medir 1 ml de muestra.

Agregar 25 μ L de solución de fenol al 80 % y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Reposar los tubos 10 min.

Mezclar en agitador vortex y colocar en un baño de agua a temperatura ambiente.

Leer absorbancia a 490 nm después de 2 minutos y antes de 20 minutos.

A1.2.4 Determinación de Proteínas. (modificado de Lowry, 1951)

Reactivos:

Reactivo de cobre. Prepárese inmediatamente antes de usarse, mezclando las soluciones A, B y C en proporción 13:1:1; usar 5.2, 0.4, 0.4 mL respectivamente para 6 mL.

Solución A: $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ diluir 4.5 g en 50 mL de agua destilada.

Solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ diluir 1g en 50 mL de agua destilada.

Solución C: Tartrato de Sodio y Potasio en agua destilada diluir 0.6725 g en 50 mL de agua destilada.

Solución D: NaOH diluir 2 g en 50 mL de agua destilada.

Solución E: SDS diluir 0.536 g en 50 mL de agua destilada.

Reactivo de formación de complejo (2xLowry), Prepárese inmediatamente antes de usarse, mezclando las soluciones reactivo de cobre, D y E en proporción 3:1:1 respectivamente para 10 mL usar 6, 2, 2 mL.

Reactivo de Folín (disponible comercialmente): úsese en concentración 2N diluir 1:10.

Estándares: Use una solución madre de proteína estándar (por ejemplo fracción V de albúmina de suero bovino) conteniendo 4 mg/ml de proteína en agua destilada, almacenada a -20°C .

Procedimiento

A 1 ml de muestra o sol. Estándar, agréguele 1 ml del reactivo de formación de complejo recién preparado agite vigorosamente y deje reposar a temperatura ambiente por 10 min.

Adicionar 0.5 ml de reactivo de Folín, agite con un mezclador de vórtice y deje reposar a temperatura ambiente durante 30–60 min (no exceda ese tiempo) dentro de una bolsa negra.

Lea la absorbancia a 750 nm si la concentración de la proteína fuera menor a 500 mg/L, ó 550 nm si fuese entre 100 y 2000 mg/L.

A1.3 Prueba de respirometría

Preparar y calibrar el sensor de oxígeno disuelto.

Como medio de dilución se utilizar el permeado del reactor.

Airear el licor mezclado por 30 minutos con el fin de oxidar el sustrato remanente, la prueba se realiza a 20°C .

Determinar los SSV/L de la muestra.

Airear el lodo granular por una hora hasta alcanzar la respiración endógena. El OD se estabiliza en el punto de saturación 6- 8.5 mg/L.

Adicionar una cantidad de sustrato hasta alcanzar una relación S_0/X_0 de 0.01 – 0.2 mgDQO/mgSSV, el OD del respirómetro se debe mantener superior a 2 mg/L.

Monitorear la cantidad de OD consumida por los microorganismos a partir de las lecturas del oxímetro cada 10 segundos, el OUR y el SOUR se calcula a partir del cambio de la concentración de OD, a través del tiempo.

A1.4 Sólidos Suspendidos Totales (SST) y Sólidos Suspendidos Volátiles. (modificado de APHA, 2005)

Sólidos Totales (ST)

Preparación del filtro (tipo GF/A, 55mm diámetro):

Limpiar con agua destilada, por ambos lados, utilizando un matraz Kitasato conectado a la línea de vacío.

Depositar el filtro en una charola de aluminio y colóquelo en la estufa a 103 – 105°C durante 1 hora.

Transferir el filtro a una mufla a 550°C durante 15 minutos.

Colocar el filtro nuevamente en la estufa (15 minutos).

Colocar el filtro en un desecador (30 minutos).

Pesar el filtro (peso A).

Análisis de la muestra:

Depositar el filtro en el aparato de vacío y agregue despacio 10 ml de la muestra.

Evite que la muestra se pierda por el borde del filtro.

Secar la muestra en una estufa durante 1 hora a 103 – 105°C.

Transferir el filtro a un desecador (30 minutos).

Pesar el filtro (peso B).

Sólidos Suspendidos Totales (SST)

$$SST (mg/l) = \frac{(w_B - w_A)10^6}{ml}$$

Colocar el filtro con los ST en una mufla a 550°C durante 15 minutos.

Poner el filtro en una estufa a 103 – 105°C (15 minutos) y luego transfiera al desecador (30 minutos).

Pesar el filtro (peso C).

$$SSV (mg/l) = \frac{(w_B - w_C)10^6}{ml}$$

A1.6 Sólidos totales, porcentaje de granulación y coeficiente de integridad. (Ghangrekar *et al.*, 2005)

Se toma una alícuota de 300 mL del reactor en un matraz EM de 500 mL.

Agitando a manera de mantener la suspensión de los gránulos, se transfieren 25 mL a una probeta de 50 mL.

Preparación de la cápsula de porcelana:

Limpiar con agua destilada, por ambos lados, depositar la cápsula en la estufa a 103 – 105°C durante 1 hora.

Transferir la cápsula a una mufla a 550°C durante 15 minutos.

Colocar la cápsula nuevamente en la estufa (15 minutos).

Colocar la cápsula en un desecador (30 minutos).

Pesar la cápsula (peso A).

Análisis de la muestra:

Agregar despacio 30 ml de la muestra.

Secar la muestra en una estufa durante 1 hora a 103 – 105°C.

Transferir la cápsula a un desecador (30 minutos).

Pesar la cápsula (peso B).

Sólidos Suspendidos Totales (SST)

$$ST (mg/l) = \frac{(w_B - w_A)10^6}{ml}$$

Colocar la cápsula con los ST en una mufla a 550°C durante 15 minutos.

Poner el filtro en una estufa a 103 – 105°C (15 minutos) y luego transfiera al desecador (30 minutos).
Pesar el filtro (peso C).

$$SV (mg/l) = \frac{(w_B - w_C)10^6}{ml}$$

Colocar otra muestra de 25 mL en la probeta de 50 mL.

Tamizar en la malla 65, enjuagando suavemente con agua a chorro.

Colocar el retenido de la malla en un matraz EM de 250 mL y agregar agua destilada hasta un volumen de 150 mL.

Agitar 5 min. A 200 rpm.

Transferir a una probeta de 150 mL y dejar sedimentar 1 minuto.

Transferir el sobrenadante a una cápsula de porcelana puesta a peso constante y determinar los sólidos totales.

Transferir los gránulos sedimentados en la probeta a un filtro de fibra de vidrio GFA puesto previamente a peso constante y determinar los SST y SSV como en A.1.5.

El coeficiente de integridad se determina como sigue:

$$CI (\%) = \frac{(100)Sólidos\ sobrenadante}{SSG}$$

Y el porcentaje de granulación:

$$G (\%) = \frac{(100)SSG}{SST}$$

Los sólidos suspendidos granulares SSG son: Sólidos del sobrenadante más los sólidos sedimentados de la probeta.

A1.7 Índice Volumétrico de Lodos

Obtener una muestra de 1 L del reactor

Colocar la muestra en una probeta de 1 L.

Agitar la probeta e iniciar un cronómetro

Anotar a los 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 10.0, 20.0 y 30.0 minutos el volumen que ocupa el sedimentado (biomasa) en la probeta.

El volumen a los 30.0 min es el índice volumétrico de lodos.

$$IVL = \frac{1000V}{SST}$$

A1.8 Velocidad de Sedimentación

Empleando los resultados del IVL

Donde m es la pendiente máxima en el experimento de IVL

(cm^3/min), A_t es el área transversal de la probeta (cm^2) y 0.6 es el factor de conversión de tiempo y volumen (minutos a horas y cm a m).

$$Vs = 0.6 \left(\frac{m}{At} \right)$$

A1.9 Granulometría

La morfología de los lodos se observa con un microscopio óptico a 20X y el tamaño de los gránulos se determinó mediante el programa informático analizador de imágenes Axiovisión Rel. 4.8 de Karl Zeiss. Se realizan tinciones Gram para determinar el tipo de bacterias que en mayoría conforman los gránulos. Para determinar el porcentaje de granulación se hace uso de un tamiz con una abertura de 0.212 mm, considerando todas las partículas retenidas en el tamiz después de tres enjuagues con agua a chorro como biomasa granular, se hace una relación expresada como porcentaje entre los sólidos suspendidos totales y los sólidos suspendidos retenidos en el tamiz.

1.8 Buffer PBS 1x

Para preparar 1 litro de 1x buffer salino de fosfatos (1x PBS buffer) usar:

- 8.00 g de NaCl
- 0.20 g de KCl
- 1.44 g de Na₂HPO₄
- 0.24 g de KH₂PO₄
- Disolver en 800 ml de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7.2 con HCl o NaOH 0.1M
- Agregar agua destilada hasta 1 litro.

A1.10 Fluorescencia puesta a punto del método

En las tinciones realizadas a la albúmina Figura A1.1, la única que muestra fluorescencia es la teñida con FITC (Figura A1.1B) por lo que la tinción es efectiva para marcar las proteínas.

En la Figura A1.2 se observa que las tinciones resultaron conforme a lo esperado.

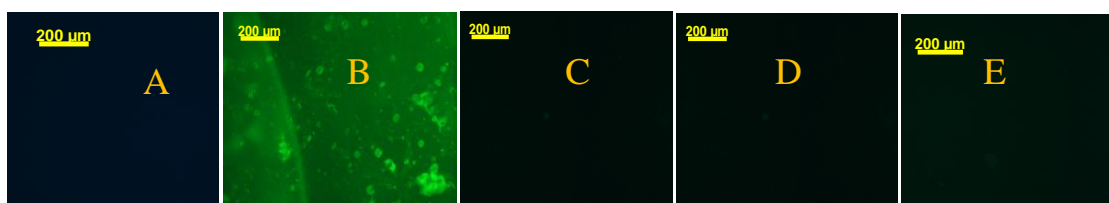


Figura A1.1 Imágenes del filtro con albúmina (ASB) A) autofluorescencia, y contrateñidas con B) FITC, C) DAPI D) CW, F) SYTOX green.

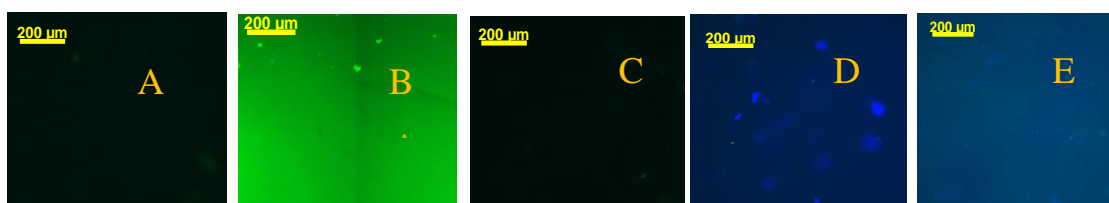


Figura A1.2 Imágenes del filtro con alginato; A) autofluorescencia, y contrateñidas con B) FITC, C) DAPI D) CW, E) SYTOX green.

En la Figura A1.3 se observa que en las tinciones a la biomasa, ésta muestra autofluorescencia (Figura A1.3A), sin embargo los fluorocromos sí llegan a resaltar los distintos componentes mediante las distintas tinciones, sobre todo las de color verde (SYTOX y FITC).

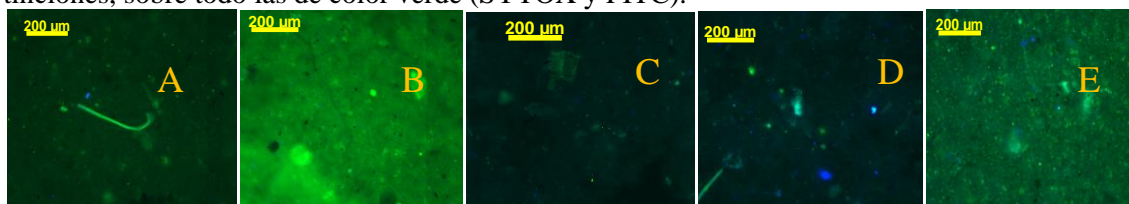


Figura A1.3 Imágenes del filtro con biomasa; A) autofluorescencia, y contrateñidas con B) FITC, C) DAPI D) CW, E) SYTOX green.

La utilización de los colorantes elegidos se encuentra ampliamente reportada en la literatura (Chen *et al.*, 2006, 2007a, 2007b); McSwain *et al.*, 2006, Aday *et al.*, 2010), sin embargo la dosificación puede variar de acuerdo a las características de la muestra de que se trate (flóculos, gránulos, biopelícula, etc.).

