



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CAMBIOS EN LA COMUNIDAD MICROBIANA DE GRÁNULOS AEROBIOS DURANTE
LA DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES INHIBITORIAS APLICANDO UNA
ESTRATEGIA DE CONTROL ÓPTIMO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VÍCTOR SERVANDO GARCÍA REA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE ECOLOGÍA
COMITÉ TUTOR: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ, INSTITUTO DE ECOLOGÍA
DR. MIROSLAV MACEK, FES IZTACALA

MÉXICO, D.F. MAYO, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CAMBIOS EN LA COMUNIDAD MICROBIANA DE GRÁNULOS AEROBIOS DURANTE
LA DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES INHIBITORIAS APLICANDO UNA
ESTRATEGIA DE CONTROL ÓPTIMO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VÍCTOR SERVANDO GARCÍA REA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE ECOLOGÍA
COMITÉ TUTOR: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ, INSTITUTO DE ECOLOGÍA
DR. MIROSLAV MACEK, FES IZTACALA

MÉXICO, D.F. MAYO, 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 23 de febrero de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **GARCÍA REA VICTOR SERVANDO** con número de cuenta **303107695** con la tesis titulada **"CAMBIOS EN LA COMUNIDAD MICROBIANA DE GRÁNULOS AEROBIOS DURANTE LA DEGRADACIÓN DE AGUAS RESIDUALES INHIBITORIAS APLICANDO UNA ESTRATEGIA DE CONTROL ÓPTIMO"**, bajo la dirección del **DR. IVAN MORENO ANDRADE**:

Presidente	DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO
Vocal	DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA
Secretario	DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ
Sapiente	DRA. ANNE MARGRETHE HANSEN HANSEN
Suplente	DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 07 de mayo de 2015.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.o.p. Expediente del (la) interesado (-a).

Agradecimientos institucionales

Al posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM.

A CONACyT por la beca de maestría otorgada con número CVU/Becario: 486646/288490.

Al comité tutor, Dr. Iván Moreno Andrade, Dra. Luisa I. Falcón Álvarez, Dr. Miroslav Macek.

Agradecimientos académicos

Al Dr. Iván Moreno Andrade, por ser el tutor principal de este trabajo, por haberme aceptado en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de tratamiento de Agua (LIPATA) y permitido trabajar en su proyecto y en su grupo de investigación.

A la Dra. Luisa Falcón Álvarez, por ser parte del comité tutorial, por todo el apoyo brindado especialmente en el trabajo de biología molecular, gracias por ampliar mi visión de esta área con los conocimientos, tanto teóricos como prácticos, que tiene una investigadora de su nivel.

Al Dr. Miroslav Macek, por ser parte del comité tutorial, por todos sus valiosos comentarios y enseñanzas en estos dos años, incluido el semestre de clase que fue de tanto provecho para mi formación académica.

A los miembros del Jurado: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, Dr. Pedro Ramírez García, Dra. Patricia Bonilla Lemus y Dra. Anne Margrethe Hansen Hansen. Por los comentarios y observaciones realizadas al trabajo de tesis.

Al Dr. Víctor Manuel Arellano Badillo, por los conocimientos que me aportó en el área de granulación, operación de reactores y técnicas de monitoreo de estos. Su participación desde antes del inicio del proyecto fue clave para la investigación desarrollada en este trabajo de maestría.

Al Dr. Alejandro Vargas Casillas, por haber brindado siempre con la mejor disposición sus conocimientos tanto en el área de control —al arrancar la estrategia ED-TOC y dar solución a los problemas relacionados con el software de automatización de los reactores— como en puntos de vista de proceso, operación y estadística.

Al M. en B. Jaime Pérez Trevilla, por el apoyo técnico durante la realización de la investigación en el LIPATA, sin duda eres parte fundamental en el correcto y ameno funcionamiento del laboratorio.

A la M. en C. Ivonne Mar Álvarez, por el apoyo académico durante el desarrollo de la primer parte de la investigación, y por la realización de la técnica DGGE.

A la M. en I. A. Sonia Santiago Cruz, por el apoyo académico en la operación de los reactores y manejo de la biomasa granular.

A Carlos Lozano Flores, técnico académico del Instituto de Neurobiología, UNAM, por el tiempo, material y soporte brindado para la realización de las microscopías —desde la preparación, fijación y tinción de la muestra— tanto de fluorescencia como CLSM, gracias por los conocimientos compartidos y por el gusto y el ánimo con el que realizas tu trabajo.

A la Ing. Nydia Hernández Ríos, técnico académico de la Unidad de Microscopía del Instituto de Neurobiología, UNAM, por su ayuda y disposición para realizar las microscopías de fluorescencia y CLSM.

Al Dr. Frédéric Thalasso, por la invitación para realizar una estancia de investigación en el laboratorio de Bioprocesos Ambientales del CINVESTAV, Unidad Zacatenco.

Al M. en C. Miguel A. Vital Jácome, por su importante colaboración en el trabajo realizado durante la estancia de investigación en el CINVESTAV y los conocimientos compartidos respecto al área de respirometría.

A la Dra. Patricia Valdespino, por el excelente apoyo brindado en la realización de técnicas de biología molecular, gracias por enseñarme las técnicas de clonación molecular y creación de librerías de clonas, así como por introducirme al análisis genético y filogenético. Fue un placer trabajar con usted Dra.

A la M. en C. Osiris Gaona Pineda, por todo el apoyo técnico en el laboratorio de Ecología Bacteriana y Epigenética del Instituto de Ecología de la UNAM. Gracias también por la ayuda en el mejoramiento de la redacción de carteles científicos.

Al M. en C. Daniel Cerqueda García, por la ayuda en el análisis filogenético, y por compartir tus conocimientos en el área de la bioinformática. El trabajo que realizas da un plus, a las excelentes investigaciones que se realizan en el grupo de trabajo de la Dra. Falcón.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM, en especial a la Unidad Académica Juriquilla, LIPATA.

Al Instituto de Ecología de la UNAM.

A la UNAM.

Agradecimientos personales

Al Dr. Iván Moreno, gracias por su apoyo Doc. Por la amistad que surgió desde esa llamada en mayo del 2012, que dio paso a este trabajo y a esta futura maestría. Gracias por todas las consideraciones que ha tenido conmigo desde que llegué al laboratorio, por los buenos momentos de pláticas CONCyTEQ, de partidos en Juriquilla, de limpiar reactores a la 1:00 am y transportar gránulos a las 6:00 am, de carnes asadas y cenas en la Vaka. Este trabajo concluye en una excelente amistad.

A la Dra. Luisa Falcón, gracias por darme la oportunidad de formar parte de su grupo, por permitirme aprender de usted, porque veo que gracias a personas como usted la Universidad sigue teniendo esa grandeza. Espero algún día tener la visión, la capacidad, la imaginación, la toma de decisiones, la entrega por su trabajo y el conocimiento que usted tiene. Pero le agradezco más por ser esa persona con la alegría, cariño y calidad humana que la distinguen.

Al Dr. Miroslav Macek, por la buena amistad que tuvimos, porque en usted encontré muchos conocimientos, un gran ingeniero y un gran científico. Es muy grato saber que personas como usted trabajan para este país.

Al Dr. Alejandro Vargas Casillas, muchas gracias por todo el apoyo que me dio, por siempre tener un comentario, una sugerencia, una idea o una solución para mi proyecto. Por mostrar interés en mi investigación y en mi desarrollo profesional aun cuando usted no era mi tutor. Gracias por las clases, por sus conocimientos y por las excelentes pláticas que tuvimos. Usted es un ejemplo de profesionista para mí, pero principalmente un ejemplo de ser humano.

A los miembros del LIPATA, Dr. Germán Buitrón, M. en C. Gloria Moreno, Dr. Ixbalank Torres, Dra. Glenda Cea.

Al M. en B. Sir. James Pérez Parker. Gracias por el apoyo que me diste, tanto académico como personal, por las bromas y las risas, las retas, los super tazones y las finales de los torneos, la mayoría de ellas perdidas. Gracias mi estimado James.

A mi familia, Luis Ángel Rosales, a mi tía Araceli Rea López y a mi padrino Jesús Rea López.

A mis abuelitas Mercedes López Mendiola y Delfinita Bazán Morales, las quiero mucho mucho.

A mi amigo, Armando Guerrero Elías, gracias por siempre estar a mi lado, sabes que de la misma manera yo estoy al tuyo.

Al Dr. Víctor Manuel Arellano Badillo, muchas gracias por todo tu apoyo tocayito, por tus enseñanzas, por todas las pláticas y por el cariño con el que me diste tus conocimientos y tu amistad desde que llegué a la primer estancia de investigación. Como lo escribí anteriormente, fuiste una parte esencial para el desarrollo de este proyecto.

A un futuro PhD. que es un ejemplo de superación y constancia, muestra de que el esfuerzo siempre tiene sus recompensas, y aparte de eso, a un excelente amigo, al M. en I. A. Israel López Prieto.

A mi segunda familia en estos dos años, los integrantes deL LIPATA con los que conviví tanto tiempo, algunos ya maestros en ingeniería, algunos próximos doctores y otros próximos maestros en ingeniería ambiental: Alberto Villa, Alfonso Castillo, Isaac Rivera, Liz Arango, Juan Sebastián Arce, Julián Oviedo, José Natanael Rivera, Manuel Alejandro Marín, Elidee Guevara, Rodolfo Cortés, Andrés Martínez y Axel Cervantes. Gracias por su amistad, de cada uno de ustedes me llevo excelentes recuerdos, risas, viajes,

bromas, fiestas, sushi, partidos, clases, congresos. Todo un gusto haber compartido esta etapa tan especial de mi vida con ustedes.

A Ivonne Mar, gracias por tu amistad, gracias por tu apoyo, por tus recordatorios, por los conocimientos que me diste, por las pruebas con las que me ayudaste, pero sobre todo, gracias por el cariño que me has tenido desde aquel día de ese examen de maestría en el Instituto de Biología.

A Sonia Santiago, por su apoyo, por su amistad, por el tiempo que me dedicó, por su cariño y por todos los momentos que compartimos.

A mis amigos de la Facultad de Química, que a pesar del tiempo seguimos, y seguiremos, con esta amistad que los años y la distancia solo harán más fuerte. Son un ejemplo de la calidad que se tiene en la FQ, Guillermo Zerón, Icken Hernández y Oscar Ortiz.

A los nuevos integrantes del LIPATA, Eduardo Vidal, Martín Barragán, Jorge Mota, Citlali Pérez, Aldo Díaz y Roberto Muñoz. Fue poco el tiempo que coincidimos pero el suficiente para tener una buena amistad.

A mis alumnas, especialmente a Erika Viridiana Alonso y a Brenda Valenzuela.

A los invitados del LIPATA que a pesar de tener una corta estancia en el laboratorio pudimos lograr una muy buena amistad, Ignacio López Apodaca, Gopalakrishnan Kumita y Miguel Ángel Vital.

A los integrantes del laboratorio de Ecología Bacteriana y Epigenética, Daniel Cerqueda por su amistad, los conocimientos compartidos y por ese toque de picardía y gracia que tienen sus comentarios. A Yislem Beltrán y Mariana García por el apoyo y amistad que me dieron. Al igual que a Mauricio Valdés, Mario Carrillo, Osiris Gaona y el Dr. Octavio Moreno.

A la Dra. Patricia Valdespino, como te lo dije, eres una gran investigadora, pero principalmente una gran persona, llena de conocimientos, cariño, éxitos y humildad. Muchas gracias por haberme ayudado tanto, y en especial por la forma en la que lo hiciste.

A Querétaro y al LIPATA, dos lugares que siempre van a tener un sitio especial en mi memoria, porque allí viví una nueva etapa de mi vida, llena de experiencias que me ayudaron a madurar tanto personal como académicamente.

A la gente de mi país, que a través del CONACyT y el CONCyTEQ, financió el pago de mis estudios, de mi beca y actividades académicas.

A mi Universidad, la UNAM. Gracias por estos 13 años que he sido parte de ti, me has dado mucho en todos los sentidos desde hace ya algún tiempo atrás, cuando entré a la Prepa 9... cuando tenía apenas 14 años. Con este trabajo termino aquí mi etapa como estudiante, pero mi vida como universitario, así como el amor a mi *alma mater* me van a acompañar a donde vaya, y como lo dije en mi protesta profesional: “recordando en todo momento mi responsabilidad social frente a la comunidad que me ha formado, procurando siempre la solidaridad profesional, el progreso de la Química y el prestigio de MI Universidad”.

“Por mi raza hablará el espíritu”

Dedicatorias

Para los dos luceros de mi vida, para mis dos amores, para mis padres: Flor Arminda Rea López y Víctor Manuel García Bazán. El regalo más grande que Dios me pudo dar fue el haber sido su hijo. Pronto vendrán los momentos de mirar atrás y hacer el juicio de los padres que han sido, y será tan fácil saber su desempeño como voltear y observar a su niña, y observarme a mí, porque lo que nosotros, sus hijos, somos, es gracias a ustedes.

Gracias por su amor, gracias por su tiempo, gracias por dedicarnos sus vidas a mi hermana y a mí. Pueden estar seguros, que en cada paso que he dado, siempre he tratado de estar a la altura de lo que ustedes me han enseñado y me han inculcado, y así lo seguiré haciendo.

Te amo mamita, te amo pa.

Para ustedes.

Los amo.

Su hijo, Víctor Servando García Rea.

Para mi admiración, para mi modelo a seguir, para mi orgullo, para la alegría y el amor que la fuerza suprema mandó a nuestra familia. Gracias por dejarme ver lo que significa éxito, gracias por dejarme ver lo que es pasión, lo que es determinación, lo que es coraje, lo que es tener una meta, lo que es ser un triunfador. Siempre será un honor decir que soy tu hermano, siempre será hermoso saber que caminamos juntos, que somos un equilibrio, que estás a mi lado.

Gracias por tu amor hermanita.

Te amo reina mía.

Para ti.

Flor Arminda García Rea.

“Estás haciendo lo que te apasiona, disfrútalo, sonríe, aprovéchalo, sé el mejor”.
F.A.G.R.

Dedicatoria extra

Para la persona con el ser más limpio que conozco, nunca pierdas tu alegría, nunca pierdas tu sonrisa, ni permitas que ese, tu don, que es tu nobleza, no juegue a tu favor. Recuerda siempre, que tienes el amor y el apoyo de tu primo, recuerda que vamos hombro con hombro.

Para mi primo.

Salvador O. Rea López.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XVII
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. MARCO TEÓRICO	7
4.1. Tratamiento primario de las aguas residuales	8
4.2. Tratamiento secundario (tratamiento biológico)	8
4.3. Clasificación de los tratamientos biológicos	8
4.3.1. Por tipo de metabolismo	8
4.3.2. Por procesos de crecimiento	9
4.4. Tratamiento terciario	9
4.5. Aguas residuales industriales	9
4.6. Tratamiento de las aguas residuales industriales	10
4.7. Tecnología SBR (Sequencing Batch Reactor)	11
4.8. 4-clorofenol (4-CF)	12
4.9. Gránulos aerobios	13
4.10. Caracterización biológica	14
4.11. Interacción entre cepas	15
4.12. Cometabolismo e inhibición	15
4.13. Conceptos básicos de la granulación aerobia	15
4.13.1. Granulación en SBR	16
4.13.2. Pasos para la granulación	17
4.13.3. Granulación aumentada por EPS	17
4.13.4. Composición del alimento	18
4.13.5. Carga Orgánica (OLR)	18
4.13.6. Concentración de oxígeno disuelto	19
4.13.7. Tiempo de sedimentación	19
4.13.8. Ayuno aerobio	19
4.13.9. Relación sustrato microorganismo (F/M)	20
4.13.10. Relación H/D (altura/diámetro) del reactor	20
4.13.11. Tiempo de retención hidráulico	21
4.13.12. Volumen de intercambio	21
4.13.13. Efectos del pH	21
4.13.14. Efecto de la temperatura	22

4.14.	Aplicaciones de los gránulos	22
4.14.1.	Tratamiento de agua residual municipal	22
4.14.2.	Remoción de nitrógeno y fósforo	22
4.14.3.	Tratamiento de aguas con contaminantes orgánicos tóxicos	23
5.	ANTECEDENTES	24
5.1.	Degradación biológica de 4-CF	24
5.2.	Degradación óptima de 4-CF	26
5.3.	Crecimiento celular y compuestos tóxicos	28
5.4.	Tasa de crecimiento	29
5.5.	ED-TOC	30
5.6.	Biología molecular aplicada al estudio de sistemas de tratamiento de aguas	32
5.7.	Dinámica poblacional microbiana en reactores biológicos	34
5.8.	Dinámica poblacional en la degradación de 4-CF	36
6.	HIPÓTESIS	38
7.	OBJETIVO	39
7.1.	Objetivos particulares	39
8.	METODOLOGÍA	40
8.1.	Esquema general de trabajo	40
8.2.	Estrategia experimental	41
8.3.	Operación del biorreactor	41
8.4.	Técnicas analíticas	43
8.4.1.	Fenoles totales	43
8.4.2.	Sólidos totales y sólidos suspendidos totales	43
8.4.3.	Velocidad de sedimentación e índice volumétrico de lodos	43
8.4.4.	Respirometría	43
8.4.5.	Tamaño de gránulo	44
8.4.6.	Coeficiente de integridad	44
8.4.7.	Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)	45
8.4.8.	Actividad deshidrogenasa	45
8.4.9.	Análisis por microscopía de fluorescencia y CLSM	46
8.5.	Parámetros de operación del reactor	48
8.6.	Análisis estadístico	48
8.7.	Biología molecular	48
8.7.1.	Extracción del ADN	49
8.7.2.	Limpieza del ADN	49
8.7.3.	Cuantificación del ADN	50

8.7.4.	PCR para DGGE	50
8.7.6.	PCR para librería de clonas	52
8.7.8.	Librería de clonas 16S ARNr y secuenciación	52
8.7.9.	Análisis filogenético de las secuencias	53
9.	RESULTADOS	55
9.1.	Remoción de 4-CF	55
9.1.1.	Porcentaje de remoción de 4-CF	55
9.1.2.	Cinéticas de remoción 4-CF	55
9.2.	Sólidos en el reactor	57
9.2.1.	Tiempo de retención de sólidos	58
9.3.	Velocidad de sedimentación e índice volumétrico de lodos	59
9.4.	Respirometría	60
9.5.	Tamaño de gránulo	61
9.6.	Coeficiente de integridad	63
9.7.	Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)	63
9.8.	Actividad deshidrogenasa	64
9.9.	Microscopia de fluorescencia y CLSM	65
9.10.	DGGE	68
9.11.	Clasificación taxonómica y análisis filogenético de la librería de clonas	69
9.11.1.	Resultados de la clasificación taxonómica	71
9.11.2.	Microorganismos en las estrategias FTC y ED-TOC	72
9.11.3.	Árbol filogenético	74
9.12.	Tabla resumen	76
10.	DISCUSIÓN	77
11.	CONCLUSIONES	92
12.	BIBLIOGRAFÍA	94
ANEXO 1		100
	Determinación de parámetros cinéticos en la biodegradación de 4-clorofenol con biomasa granular aclimatada mediante microrrespirometría	100
1.	Introducción	101
2.	Metodología	101
3.	Resultados	103
4.	Bibliografía	106
ANEXO 2		107
	Productos del trabajo de investigación	107

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 6.1. Fluoróforos utilizados para las tinciones de los gránulos aerobios.....	44
Tabla 6.2. Parámetros usados en la operación FTC y ED-TOC.....	44
Tabla 6.3. Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR con primers 46F-GC 534R.....	46
Tabla 6.4. Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR con primers TX9.....	47
Tabla 6.5. Reactivos y concentraciones utilizados para la PCR con primers M13.....	49
Tabla 7.1. Porcentaje de remoción de 4-CF por el SBR en ambas estrategias.....	51
Tabla 7.2. Tasa específica de consumo de sustrato (q_x) para ambas estrategias.....	52
Tabla 7.3. Tasa específica de consumo de oxígeno total ($TECO_t$).....	57
Tabla 7.4. Sustancias poliméricas extracelulares solubles y ligadas.....	60
Tabla 7.5. Clasificación taxonómica de los 43 OTUs obtenidas con el clasificador RDP.....	66

FIGURAS

Figura 2.1. Gránulos aerobios cultivados en un reactor SBR que degrada 4-CF.....	9
Figura 3.1. Vía de degradación del 4-CF.....	20
Figura 3.2. Cinética de Monod.....	25
Figura 3.3. Cinética de inhibición de Haldane.....	26
Figura 3.4. Trayectorias del sustrato y del volumen para la estrategia ED-TOC.....	28
Figura 6.1. Sistema SBR con gránulos aerobios.....	38
Figura 6.2. Esquema del gen 16S rRNA.....	47
Figura 7.1. Cinéticas de degradación de 4-CF.....	52
Figura 7.2. Evolución de la concentración de 4-CF y O_2 durante un ciclo ED-TOC.....	53
Figura 7.3. Sólidos suspendidos totales en el reactor y en el efluente.....	55
Figura 7.4. Velocidad de sedimentación e índice volumétrico de lodos.....	56
Figura 7.5. Respirogramas típicos FTC y ED-TOC.....	57
Figura 7.6. Gránulos aerobios al inicio de la estrategia ED-TOC.....	58
Figura 7.7. Tamaño promedio de los gránulos aerobios.....	58
Figura 7.8. Coeficiente de integridad de los gránulos aerobios.....	59

Figura 7.9. Sustancias poliméricas extracelulares extraídas de gránulos aerobios.....	60
Figura 7.10. Gránulos aerobios tratados con INT.....	61
Figura 7.11. Imagen digital y CLSM de gránulo aerobio.....	62
Figura 7.12. Microscopía de fluorescencia en los cortes realizados a los gránulos aerobios.....	62
Figura 7.13. Imágenes de microscopía confocal laser de barrido para ácidos nucleicos y proteínas a diferentes acercamientos.....	63
Figura 7.14. Imágenes de microscopía confocal laser de barrido para carbohidratos y proteínas a diferentes acercamientos.....	63
Figura 7.15. Microscopía confocal laser de barrido en el sistema LSM 780 DUO.....	64
Figura 7.16. DGGE del ADN obtenido de los gránulos aerobios.....	65
Figura 7.17. Distribución de los OTUs totales en el reactor con las estrategias FTC y ED-TOC.....	67
Figura 7.18. Principales fila encontrados en los gránulos aerobios en la estrategia FTC.....	67
Figura 7.19. Principales fila encontrados en los gránulos aerobios en la estrategia ED-TOC.....	68
Figura 7.20. Porcentaje de clonas y géneros de los microorganismos en la estrategia FTC.....	69
Figura 7.21. Porcentaje de clonas y géneros de los microorganismos en la estrategia ED-TOC....	70
Figura 7.22. Árbol filogenético de los organismos en las operaciones FTC y ED-TOC.....	71

ABREVIATURAS

4-CF	4-clorofenol.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosina trifosfato
CLSM	Microscopía confocal laser de barrido.
DAC	Tarjeta de adquisición de datos.
DGGE	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante.
DO	Oxígeno disuelto.
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno.
DQO	Demanda química de oxígeno.
ED-TOC	Control óptimo de tiempo dirigido por eventos.
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares.
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> .
FTC	Control a tiempos fijos.
GAO	Microorganismo acumulador de glicógeno.
IVL	Índice volumétrico de lodos.
Mb	Megabase.
MBSBR	Reactor discontinuo secuencial de lecho móvil.
nt	Nucleótido.
OB-TOC	Control óptimo de tiempo basado en observadores.
OLR	Carga orgánica.
PAO	Microorganismo acumulador de fosfatos.
PC	Computadora personal.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales.
qPCR	PCR cuantitativa.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal.
SBR	Reactor discontinuo secuencial.
SEM	Microscopía de barrido electrónico.
SOUR	Tasa específica de consumo de oxígeno.
TOC	Control de tiempo óptimo.
TRH	Tiempo de retención hidráulico.
T-RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminales.
VTC	Control a tiempos variables.
VS	Velocidad de sedimentación.
μ	Tasa de crecimiento específico.

1. RESUMEN

Se estudió la comunidad bacteriana de gránulos aerobios de un reactor discontinuo secuencial (SBR) que degradaba aguas inhibitorias con 4-Clorofenol (4-CF) como compuesto modelo. El objetivo del trabajo fue determinar cuál era el efecto que tenía en la comunidad bacteriana el realizar un cambio en la estrategia operación del SBR, al pasar de la estrategia común, o control a tiempos fijos (FTC), a una estrategia de control y optimización, llamada control óptimo de tiempo dirigido por eventos (ED-TOC), que mantiene a la biomasa granular en el punto de la mayor tasa de crecimiento microbiano (μ_{max}), y por lo tanto en la mayor actividad metabólica, misma que se relaciona con la degradación óptima del sustrato inhibitorio.

Se llevó a cabo la operación de un SBR aerobio granular con la estrategia FTC por un periodo de 200 días y pasado este intervalo se cambió a la operación con la estrategia de control ED-TOC. Durante este tiempo se tomaron periódicamente muestras de gránulos aerobios para ser analizadas por métodos de biología molecular y también se midieron diversos parámetros de la biomasa granular, como la tasa de degradación de 4-CF (q_x), la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO), la velocidad de sedimentación, la concentración de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), entre otras.

Para determinar los microorganismos presentes en los gránulos aerobios de las estrategias FTC y ED-TOC, y por lo tanto, el cambio en la comunidad bacteriana, se utilizaron dos técnicas de biología molecular basadas en el estudio de segmentos del gen 16S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr): la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) y la librería de clonas, cuyos productos de clonación fueron secuenciados y analizados.

La DGGE no mostró cambios significativos en la población de los gránulos al pasar de una estrategia de operación a otra, mostrando 10 ribotipos para la estrategia FTC y 9 ribotipos para la estrategia ED-TOC. De la librería de clonas, se obtuvieron 48 clonas para los gránulos de cada reactor, en las cuales se encontraron un total de 43 géneros bacterianos distintos, de los que solo se compartieron el 12% (5 géneros) entre una y otra estrategia. La comunidad de los gránulos ED-TOC fue menos diversa (6 fila y 21 géneros) en comparación con la comunidad de los gránulos FTC (7 fila y 27

géneros). Se encontró que hubo una especialización de la comunidad de los gránulos de la estrategia ED-TOC, con un aumento en el porcentaje de microorganismos degradadores de 4-CF, como *Arthrobacter chlorophenolicus* —miembro del filum *Actinobacteria*, que pasó del 5% de las clonas en la estrategia FTC al 22% en la estrategia ED-TOC— o *Comamonas testosteroni* —miembro del filum *Proteobacteria*, que pasó del 2% en la estrategia FTC al 15 % en la estrategia ED-TOC—.

La otra gran parte de la comunidad, que fue constante para las dos estrategias, estaba conformada por *Sphingobacteriales*, *Cytophagales* —del filum *Bacteroidetes*—, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodospirales* y *Sphingomonadales* —del filum *Proteobacteria*—, que forman el sistema granular de producción/consumo de EPS.

En cuanto a las pruebas fisicoquímicas, los resultados se correlacionaron con los diferentes microorganismos encontrados. Por último se realizaron microscopías de fluorescencia y CLSM para observar la estructura granular.

Se concluyó que mantener a la biomasa granular en la μ_{\max} actúa como una nueva presión de selección, especializando, todavía más, la comunidad de los gránulos aerobios que operaron con la estrategia de control ED-TOC.

2. ABSTRACT

The bacterial community of aerobic granules of a sequencing batch reactor (SBR) which degraded inhibitory water with 4-Chlorophenol (4-CP) as model compound was studied. The aim of the study was to determine which was the effect in the bacterial community when a change in the SBR operation strategy was made, switching from the common strategy, or fixed time control (FTC), to a control and optimization strategy, named event driven-time optimal control (ED-TOC), that maintains the granular biomass at the maximum microbial growth rate, hence in the maximum metabolic activity that is related with the optimal degradation of the inhibitory substrate.

The operation of an aerobic granular SBR with the FTC strategy was conducted for a period of 200 days, passed this time, the operation mode was changed to the ED-TOC control strategy. During this time, aerobic granules samples to be analyzed by molecular biology methods were taken periodically, and some granular biomass parameters were measured like 4-CP degradation rate (q_x), specific oxygen uptake rate (SOUR), settling velocity, extracellular polymeric substances (EPS) concentration, among others.

To determine the microorganisms present in the aerobic granules of the FTC and ED-TOC strategies, and therefore the change in the bacterial community, two molecular biology techniques based on the study of segments of the 16S rRNA gene were employed: the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and the clone library with the subsequent clone sequencing.

The DGGE did not show significant changes in the granule population when they switched from one operation strategy to another, showing 10 ribotypes for the FTC strategy and 9 ribotypes for the ED-TOC strategy. From the clone library, 48 clones were obtained from the granules of each reactor, and a total of 43 different bacterial genders were found, from which only 12% (5 genders) were shared between one strategy and the other. The ED-TOC bacterial granule community was less diverse (6 phyla and 21 genders) compared with the FTC granule community (7 phyla and 27 genders). An specialization of the granular community of the ED-TOC strategy was found, with an augmentation of the percentage of 4-CP degrader microorganisms, as *Arthrobacter chlorophenolicus*, member of the *Actinobacteria* phylum, which passed from the 5% of the clone percentage in the FTC strategy to the 22% in the ED-TOC

strategy; or *Comamonas testosteroni*, member of the *Proteobacteria* phylum, which passed from the 2% in the FTC strategy to the 15% in the ED-TOC strategy.

The other main part of the community, that was constant for both strategies, was conformed of *Sphingobacteriales*, *Cytophagales* —of the *Bacteroidetes* phylum—, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodospirales* and *Sphingomonadales* —of the *Proteobacteria* phylum— which form the granular EPS production/consumption system.

Regarding to the physicochemical tests, their results were correlated with the different found microorganisms. Finally a fluorescence microscopy and a confocal laser scanning microscopy (CLSM) were performed to observe the granular structure.

It was concluded that maintaining the granular biomass in the μ_{\max} acts as a new selective pressure, specializing even more, the community of aerobic granules operated with the ED-TOC control strategy.

3. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso de suma importancia, ya sea para el desarrollo de una civilización o incluso para la vida misma. Conforme la población aumenta lo hace también el consumo del agua y por lo tanto la cantidad de aguas residuales producidas.

Con el agotamiento de este recurso natural a nivel mundial es necesario desarrollar más y mejores tecnologías que nos permitan depurar el agua que se utiliza.

La tecnología que se emplea para el tratamiento de aguas residuales municipales ha demostrado tener un desempeño estable,^{1,2} no así con lo respectivo a las aguas residuales industriales, que por sus características tóxicas e inhibitorias, impiden la correcta remoción de los contaminantes por parte de los microorganismos^{3,4}.

Uno de los métodos que ha surgido para minimizar este problema es la granulación aerobia^{5,6,7}. Los gránulos aerobios son agregados de origen microbiano que no coagulan en condiciones de baja fuerza de corte hidrodinámico y que sedimentan significativamente más rápido que lodo floculento⁸ y han mostrado ser robustos en condiciones de ayunos y picos de concentración de efluentes tóxicos^{6,9}. Los gránulos aerobios han sido cultivados únicamente en reactores discontinuos secuenciales (SBR)⁶, en los cuales todas las reacciones metabólicas y separaciones sólido-líquido se llevan a cabo en un tanque, con una secuencia de pasos bien definida y continuamente repetida¹⁰.

En los SBR se puede optimizar la degradación de compuestos inhibitorios, por medio de una forma de llenado/alimentación que mantenga al máximo la tasa de degradación del contaminante¹¹. A diferencia de la estrategia de operación normal o FTC (*Fixed time control*), la estrategia ED-TOC (*Event driven time optimal control*) logra esta optimización al ajustar el flujo de influente, de tal manera que la tasa de degradación de sustrato es mantenida alrededor de su valor máximo, por lo que nunca se sobrepasa una concentración inhibitoria del tóxico dentro del reactor^{11,12}. Esta estrategia de control ya ha sido probada, y ha demostrado su eficacia para la operación con aguas residuales inhibitorias^{4,11,12}, sin embargo nunca se ha estudiado cuál es la influencia que esta operación pueda tener en la comunidad bacteriana granular.

Con el avance que ha presentado la biología molecular en las últimas décadas, se han desarrollado técnicas moleculares para realizar el estudio y seguimiento de

microorganismos, ya sean aislados o como población^{13,14}. Estas técnicas están basadas en la amplificación y separación del gen 16S ARNr, algunas son: la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP), las librerías de clonas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (qPCR) y los microarreglos^{13,14}, que combinadas con las tecnologías de secuenciación masiva (2da generación) como la secuenciación capilar Sanger, la pirosecuenciación 454 de Roche, o el analizador de genomas de Illumina, nos permiten obtener entre 100 y 1000 veces más información que la que se obtenía con la secuenciación tipo Sanger a un costo 96-99% menor¹⁵. La combinación de estos métodos nos permite conocer la dinámica poblacional de las comunidades microbianas. La rama de la ingeniería ha considerado por mucho tiempo los procesos biológicos que se utilizan para la depuración de aguas residuales como una “caja negra”; sin embargo, es momento para llevar a cabo estudios desde un enfoque bioquímico y microbiológico que permita conocer detalladamente el proceso, qué microorganismos participan y en qué momento, para así lograr una mejor comprensión de los eventos que se llevan a cabo, con el objetivo de optimizar los procesos y así contribuir en la manera de lo posible a remediar el daño ambiental al que sometemos al planeta día tras día.

En este trabajo se hizo una comparación de la comunidad bacteriana de gránulos aerobios en un SBR, que degrada agua residual sintética inhibitoria conteniendo 4 clorofenol (4-CF). El reactor fue operado con dos estrategias de alimentación, para determinar si la comunidad bacteriana era afectada o no, al someter a la biomasa granular a una operación en la que esta se mantuviera siempre en su máxima tasa de crecimiento. Para determinar si existió o no diferencia en la comunidad bacteriana granular, se llevaron a cabo una DGGE y una librería de clonas que después fue mandada a secuenciar. Con estos datos, se realizó un análisis filogenético para observar las relaciones entre los microorganismos encontrados en la biomasa proveniente de los gránulos operando en cada una de las estrategias, y se determinó si existió cambio o no en la comunidad bacteria y en qué forma afectó este cambio a los diferentes parámetros fisicoquímicos de los gránulos y desempeño del reactor.

4. MARCO TEÓRICO

Las aguas residuales son fundamentalmente las aguas de abastecimiento de una población, después de haber sido impurificadas por diversos usos. Desde el punto de vista de su origen, resultan de la combinación de los líquidos o desechos arrastrados por el agua, procedentes de casas habitación, edificios comerciales e instituciones, junto con las provenientes de los establecimientos industriales, y las aguas subterráneas, superficiales o de precipitación que puedan agregarse¹. Estas no pueden ser vertidas a ríos o lagos debido a los problemas ambientales, de salud, económicos y estéticos que causarían. Las aguas residuales comúnmente contienen sustancias orgánicas potencialmente peligrosas, así como microorganismos patógenos¹⁶.

Las aguas residuales domésticas son aquellas que contienen desechos humanos, animales y caseros. Son resultantes de la limpieza, el aseo, la cocina y son provenientes principalmente de conjuntos habitacionales¹. Las aguas residuales industriales son las aguas de desecho provenientes de los procesos industriales¹, incluyen entre otras, las producidas por las industrias petroquímicas, químicas, de alimentos, lácteas, plásticos, farmacéuticas, metalúrgicas, etc¹⁶.

El tratamiento de aguas residuales consiste en una serie de pasos físicos, químicos y biológicos que tienen como fin remover los contaminantes presentes en el agua proveniente del uso humano. El objetivo de tratamiento de aguas residuales es producir un efluente reutilizable en el ambiente y un residuo sólido, también conocido como lodo, conveniente para su disposición o reutilización².

El proceso de tratamiento de aguas residuales se compone de múltiples etapas: tratamiento primario, secundario y algunas veces terciario. Cada nivel de tratamiento emplea diferentes tecnologías¹⁶. La eficiencia del tratamiento se expresa en términos de reducción de la demanda química de oxígeno (DQO), que es la cantidad de oxígeno necesario para oxidar totalmente, por medios químicos, tanto materia orgánica como la inorgánica, que está disuelta o en suspensión en el agua residual²; o en la reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO), que es la cantidad de oxígeno que se requiere para la oxidación aerobia biológica (por los microorganismos) de la materia orgánica de las aguas residuales¹.

4.1. Tratamiento primario de las aguas residuales

El tratamiento primario de las aguas residuales consiste en separaciones físicas. El agua que entra en la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) se pasa a través de una serie de cribas y filtros que eliminan los objetos de gran tamaño. El líquido resultante se deja asentar durante unas horas para permitir la sedimentación de los sólidos y el sobrenadante continua con los siguientes pasos.

4.2. Tratamiento secundario (tratamiento biológico)

Los tratamientos biológicos tenían como objetivo, en un principio, la eliminación de la materia orgánica de las aguas residuales. Posteriormente se les ha ido dando otros usos (nitrificación, desnitrificación, remoción de fósforo). En el tratamiento secundario se utilizan las reacciones metabólicas de los microorganismos, que crecen utilizando los contaminantes del agua como fuente de carbono y/o como fuente de energía, convirtiéndolos en nuevos microorganismos (biomasa), y otros productos metabólicos inocuos¹⁷.

Podemos clasificar a los tratamientos biológicos según su capacidad para utilizar el oxígeno en: aerobios o anaerobios; o según su forma de crecimiento en: procesos de crecimiento suspendido o procesos de crecimiento fijos^{2, 16}.

4.3. Clasificación de los tratamientos biológicos

4.3.1. Por tipo de metabolismo

Tratamiento aerobio

Múltiples tipos de procesos aerobios se usan en el tratamiento de aguas residuales. El tratamiento aerobio convierte la materia orgánica en dióxido de carbono (CO₂), biomasa y agua con ayuda del oxígeno (oxidación). El metabolismo aerobio logra remociones de hasta el 95% de la DBO¹⁷.

Tratamiento anaerobio

El tratamiento anaerobio de las aguas residuales sigue una serie de reacciones digestivas y fermentativas llevadas a cabo por bacterias y es empleado generalmente para tratar aguas con gran contenido en materia orgánica. El tratamiento anaerobio se lleva a cabo en tanques cerrados llamados digestores, y requiere la acción y cooperación de diferentes tipos de microorganismos anaerobios, que digieren los componentes

macromoleculares para proveer compuestos solubles más sencillos, los cuales son fermentados produciendo una mezcla de ácidos grasos, H_2 y CO_2 , que son utilizados por microorganismos capaces de producir metano (CH_4) y CO_2 . El metano puede ser recogido y quemado como combustible para suministra energía a la PTAR¹⁶.

4.3.2. Por procesos de crecimiento

Crecimiento suspendido

En este tipo de proceso, los microorganismos responsables del tratamiento son mantenidos en suspensión líquida por medio de mezclado. La mayoría de los procesos de crecimiento suspendido utilizados en el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales son operados con aireación, aunque existen aplicaciones con reactores anaerobios. El proceso de crecimiento suspendido más común en el tratamiento de aguas municipales es el de lodos activados¹⁶.

Crecimiento fijo o adherido

En este tipo de proceso, los microorganismos responsables de la conversión del material orgánico o de los nutrientes, están unidos a algún tipo de soporte. Los contaminantes son removidos del agua residual cuando pasan a través de los microorganismos adheridos, también conocidos como biofilm. Los procesos de crecimiento fijos pueden ser operados como procesos aerobios o procesos anaerobios².

4.4. Tratamiento terciario

El tratamiento terciario consiste en una serie de procesos fisicoquímicos en los que se incluyen precipitaciones, filtraciones y desinfección (exposición a luz UV o cloración), para lograr la reducción de nutrientes y microorganismos patógenos¹⁶.

4.5. Aguas residuales industriales

Las aguas residuales industriales, dependiendo su origen y esquema de producción, contienen una variedad de compuestos orgánicos. La composición del agua residual industrial es muy específica para cada tipo de industria y presenta un flujo que es difícil de predecir: muchas industrias generan cantidades de agua residual relativamente constantes durante la producción, sin embargo el flujo cambia

drásticamente cuando existe limpieza o paro de la maquinaria en operación, cuando hay una demanda en un producto o cuando existe una expansión de la industria.

Existen más de 70 000 compuestos químicos orgánicos sintéticos (xenobióticos) que se pueden encontrar en las aguas residuales de origen industrial¹⁸. En la mayoría de los casos, los métodos físicos y químicos de tratamiento solo pueden lograr una remoción parcial de la cantidad de contaminantes contenidos en el agua. A menudo ciertos contaminantes de origen industrial presentes en las aguas residuales requieren procesos de tratamiento especializado¹⁹.

En México, según la CONAGUA, en el año 2010 se generaron 210 m³/s de aguas residuales industriales, de los cuales solo se trataron 63 m³/s, es decir solo el 30%, removiendo 1.35 millones de toneladas de DBO de las 3 millones de toneladas DBO generadas²⁰. En cuanto a instalaciones, para el año 2011 habían un total de 3033 plantas existentes con una capacidad instalada para 89 m³/s, de las cuales solo estaban en operación 2995 tratando un volumen de 50 m³/s, un 20% menos de lo que se trató el año anterior²¹.

4.6. Tratamiento de las aguas residuales industriales

Entre los métodos disponibles de tratamiento de aguas residuales que contienen sustancias tóxicas, los procesos biológicos o procesos de bioremediación aparecen como una alternativa para los efluentes industriales⁷. Los métodos biológicos de tratamiento de aguas residuales industriales contemplan tanto procesos aerobios como anaerobios. Sin embargo, los procesos anaerobios tienen problemas para operar en aguas con baja carga orgánica (OLR), para controlar los olores que se provocan durante el proceso de degradación de la materia orgánica, e incluso se pueden formar contaminantes secundarios que sean más tóxicos⁷.

Aunque los procesos aerobios convencionales que existen no son capaces de tratar agua con altas concentraciones de xenobióticos tóxicos, ese problema puede ser enfrentado por medio de estrategias como la inmovilización celular; se ha demostrado que los biofilms son más eficientes que el lodo suspendido para el tratamiento de aguas tóxicas^{22,6}. Los sistemas inmovilizados tienen la capacidad de retener una mayor cantidad de biomasa, que resulta en una mayor actividad degradadora al igual que una mayor tolerancia a los tóxicos en comparación con los sistemas suspendidos^{22 6}.

4.7. Tecnología SBR (Sequencing Batch Reactor)

Los reactores discontinuos secuenciales o SBR, son un tipo de reactores en el que todas las reacciones metabólicas y separaciones sólido-líquido se llevan a cabo en un tanque, con una secuencia de pasos bien definida y continuamente repetida. Los sistemas SBR han demostrado ser una excelente alternativa para el tratamiento de aguas residuales conteniendo altas concentraciones de compuestos xenobióticos²³ y para tratar efluentes inhibitorios muy variables y compuestos específicos presentes en aguas residuales¹⁸.

Los procesos SBR pueden llegar a ahorrar hasta el 60% de los costos requeridos para el funcionamiento de un sistema equivalente de lodos activados y producir un efluente de mejor calidad en un tiempo mucho más corto de aireación²⁴.

Un ciclo de un SBR consiste generalmente en cinco fases bien definidas, manipulando estos periodos se puede lograr la remoción tanto de contaminantes como de nutrientes dado que también pueden trabajar con periodos aerobios (presencia de O₂), anóxicos (presencia de oxígeno ligado a otros átomos como NO₂¹⁻ y NO₃¹⁻) o anaerobios (sin presencia de oxígeno como aceptor de electrones)²⁵.

El proceso SBR involucra las siguientes fases

1. Llenado: Durante el llenado, el influente (aguas residuales) es introducido al reactor, donde se mezcla con la biomasa presente en el tanque. El llenado puede ser con aireación o sin aireación, dependiendo de las características del agua.
2. Reacción: Durante la reacción, el flujo de agua que entra al tanque queda restringido mientras la aireación y el mezclado continúan. La reacción que lleva a cabo la remoción del sustrato, que inició durante el llenado, es completada. Durante esta fase se pueden tener, según el requerimiento, condiciones aerobias, anaerobias o anóxicas. El control del tiempo de mezclado y/o aireación regula el grado de tratamiento requerido.
3. Sedimentación: En esta fase el tanque actúa como un clarificador, sin ningún influente o efluente. Dado que el mezclado y/o la aireación cesan, se dan las condiciones para la separación sólido/líquido.
4. Vaciado. Después de la fase de sedimentación, el sobrenadante ya clarificado, es descargado del reactor como efluente.

5. Tiempo muerto. Es el período entre el vaciado y el llenado del reactor. Esta fase es requerida cuando se tienen varios SBR en operación. En un sistema multitanque el propósito es completar el ciclo de llenado antes de hacer el cambio a otra unidad²⁴.

Al comparar los procesos SBR con los continuos, se pueden numerar las siguientes ventajas: son flexibles en su operación (se puede manipular el tiempo de duración de las fases) dependiendo de la velocidad de degradación del sustrato; disminuyen los costos de inversión puesto que se elimina el sedimentador secundario, se obtienen lodos con excelentes características de sedimentabilidad, pudiendo dar paso a la formación de gránulos; es posible su total automatización y la aplicación de estrategias de control en el reactor, y por último, cabe señalar que en los procesos discontinuos se encuentran comunidades con actividad degradadora alta y estable¹⁸. Esta actividad está ligada al estado fisiológico del consorcio microbiano, en estos sistemas hay una fuerte selección de la comunidad, donde las especies que pueden sobrevivir a las características del proceso permanecen en el reactor desplazando a las demás, provocando una alta especialización en la biomasa.

4.8. 4-clorofenol (4-CF)

Los clorofenoles son precursores para la síntesis de varios productos químicos como insecticidas, herbicidas, fungicidas, colorantes y fármacos. Los monoclorofenoles, como el 4-clorofenol (4-CF), son contaminantes considerados muy peligrosos²⁶. El 4-CF puede ser liberado al ambiente por varias actividades humanas como la industria papelera, la industria química, agroquímica y farmacéutica, ya que es utilizado como preservativo de madera, antiséptico, desinfectante, así como también es un intermediario en la producción de 2,4-diclorofenol. También es un derivado del proceso de descomposición química de ciertos pesticidas y otros compuestos clorinados, además aparece en el proceso de cloración de agua residual que contiene fenol²⁷. EL 4-CF, está caracterizado por una alta toxicidad aún en bajas concentraciones (DL₅₀ ratas: 261mg/kg), es persistente en el ambiente, tanto en el agua como en el suelo y presenta efectos bioacumulativos debido a su nivel de lipofilidad²⁸.

4.9. Gránulos aerobios

Los procesos aerobios convencionales fallan al tratar altas concentraciones de tóxicos, (como el caso de los clorofenoles), ese problema puede ser resuelto por estrategias tales como la inmovilización celular. Como se mencionó en el apartado 2.6, los sistemas inmovilizados tienen la capacidad de retener mayores cantidades de bacterias degradadoras de sustratos, lo que resulta en una mayor capacidad de remoción de contaminantes y en una resistencia superior a la presencia de tóxicos en comparación con los sistemas suspendidos^{7,22}.



Figura 2.1. Gránulos aerobios cultivados en un reactor SBR que degrada 4-CF.

Los gránulos aerobios, son agregados de origen microbiano que no coagulan

en condiciones de baja fuerza de corte hidrodinámico y que sedimentan significativamente más rápido que lodo floculento⁸ (figura 2.1). El lodo granular fue descrito en 1980, estrictamente para sistemas anaerobios²⁹, sin embargo estos gránulos anaerobios sufren varias desventajas, como un largo periodo de arranque, baja remoción de nutrientes e incapacidad de tratar aguas con baja carga orgánica³⁰. No fue sino hasta 1990 que se reportó la formación y aplicación de gránulos aerobios⁶.

Varios investigadores han propuesto la autoinmovilización bacteriana como medio para la formación de los gránulos. La naturaleza compacta de los gránulos reduce la pérdida de biomasa en el efluente y permite soportar altas cargas orgánicas, así como fluctuaciones en esta. Los gránulos aerobios poseen los siguientes atributos:

1. Forma regular y casi circular.
2. Excelente sedimentación.
3. Estructura microbiana densa.
4. Alta retención de biomasa.

5. Habilidad para soportar altas cargas orgánicas.
6. Tolerancia a la toxicidad.

4.10. Caracterización biológica

Los gránulos aerobios están compuestos por varias capas, donde la capa externa está formada por microorganismos aerobios obligados, seguidos por microorganismos facultativos, una capa de microorganismos anaerobios obligados y por último un núcleo de células muertas⁶. Se ha reportado también que los gránulos aerobios tienen una comunidad microbiana muy diversa, una estructura espacial muy compleja y funciones fisiológicas coordinadas.

Por medio de microscopía de barrido electrónico (SEM), microscopía confocal laser de barrido (CLSM) e hibridación fluorescente in situ (FISH), se ha logrado tener una idea de la estructura microbiana de los gránulos aerobios. Dependiendo de las condiciones de desarrollo de los gránulos aerobios, se han encontrado bacterias heterótrofas, nitrificantes, desnitrificantes, acumuladoras de fósforo y acumuladores de glicógeno⁶.

La diversidad taxonómica microbiana de una planta de tratamiento, y de gránulos aerobios alimentados con fenol, demostraron la dominancia de *Proteobacteria*⁶. Jiang *et al.*³¹, identificaron diez aislamientos de gránulos aerobios maduros, alimentados con fenol, de los cuales, seis tenían un nexo taxonómico con *Betaproteobacteria*, tres con *Actinobacteria* y uno con *Gammaproteobacteria*⁶. Por medio de tinciones de Gram y de Neisser, y análisis por FISH, se ha demostrado que la mayoría de las bacterias filamentosas en los gránulos aerobios cultivados en agua de cervecería pertenecieron a los géneros *Thiothrix* o *Sphaerotilus natans*³². Por medio de la técnica FISH-CSLM se identificó que las bacterias aerobias oxidantes de amonio *Nitrosomonas* spp. se encontraban en una profundidad de 70 a 100 μm de la superficie del gránulo, mientras que las bacterias anaerobias *Bacteroides* spp. fueron detectadas en una profundidad de 800 a 900 μm de la superficie granular^{6,33}. Toh *et al.*, observaron una capa de células microbianas muertas a una profundidad de 800 a 1000 μm ⁷.

4.11. Interacción entre cepas

Jiang *et al.*³¹, aislaron diez cepas bacterianas a partir de gránulos degradadores de fenol y encontraron que pueden existir diferentes cepas que tengan roles particulares, como la degradación del fenol o la autoagregación encontrando que la degradación de un contaminante y la autoagregación microbiana no son procesos mutuamente excluyentes⁶. Las cepas bacterianas que presentan autoagregación mejoran el proceso de granulación, y estudios en diferentes procesos, demostraron que la dificultad para controlar con precisión los gránulos de cultivos mixtos era en gran medida por la presencia de cepas inhibitorias⁶.

Estudios realizados en *Candida tropicalis* en contacto con *Acinetobacter calcoaceticus* y *Bacillus thuringiensis* sugieren que las cepas coagregan a través de interacciones mediadas por polímeros lectina-sacáridos en la superficie celular, con la proteína adhesina en *A. calcoaceticus* y los receptores (azúcares) en *B. thuringiensis* y *C. tropicalis*⁶.

4.12. Cometabolismo e inhibición

La biodegradación de contaminantes por los gránulos aerobios está basada en dos procesos: crecimiento y cometabolismo. En el caso de crecimiento, los sustratos orgánicos son utilizados como única fuente de carbón y de energía. Este proceso resulta en una mineralización completa (degradación), mientras que en el cometabolismo, el metabolismo de un compuesto orgánico ocurre en la presencia de otro sustrato, que es la principal fuente de carbón y de energía⁷.

La agregación microbiana en gránulos aerobios confiere beneficios como la protección en contra de la inhibición y resistencia a compuestos tóxicos, esto debido a la estructura granular compacta, ya que la barrera de transferencia de masa provoca una menor concentración de compuestos tóxicos, evitando así la inhibición y/o muerte de la biomasa, aunque algunas veces, la misma estructura puede llevar al taponamiento de los poros, provocando la desintegración de los gránulos³⁴.

4.13. Conceptos básicos de la granulación aerobia

La granulación aerobia involucra un proceso de adhesión célula-célula en el que participan fenómenos biológicos, físicos y químicos³⁵. A diferencia de las biopelículas, los

gránulos se forman por un proceso de autoinmovilización de los microorganismos, principalmente bacterias, sin ningún tipo de soporte externo, ya sea en condiciones aerobias, anaerobias o alternando aerobias/anaerobias. En los siguientes apartados se describirán algunos parámetros operacionales que afectan el proceso de granulación.

4.13.1. Granulación en SBR

Los gránulos aerobios han sido cultivados únicamente en reactores discontinuos secuenciales (SBR). Se ha visto que el tiempo de ciclo del SBR afecta a la granulación aerobia; Liu y Tay (2007), observaron que cuando se incrementa el ciclo de 1.5 a 8 h, el crecimiento específico de la biomasa decrece de 0.266 a 0.031 d⁻¹, mientras que la tasa de crecimiento observado, decrece de 0.316 a 0.063 gSSV/gDQO. Los gránulos que se cultivaron con un tiempo de ciclo de 1.5 h fueron los más grandes en tamaño, mientras que los gránulos cultivados con un ciclo de 4 h fueron los más compactos⁶.

El periodo de aireación en un SBR consiste en dos fases: una fase de degradación, en la cual el sustrato es consumido, disminuyendo su concentración al mínimo, seguido por una fase de ayuno, también aerobia, en la que no hay más sustrato. Un período largo de ayuno debilita la estabilidad granular³⁶. McSwain *et al.*³⁷ lograron aumentar la eficiencia de granulación por una alimentación intermitente. Aunque se ha propuesto que el ayuno no es un prerequisite para la granulación aerobia se ha reportado que tiene un efecto en el aumento de la hidrofobicidad de las bacterias del gránulo.

En cuanto a la aireación, una fuerza de corte mayor, provoca que los gránulos se compacten mejor y también provee suficiente oxígeno para tener una eficiencia operacional aceptable⁶.

En un SBR, sólo las partículas que pueden sedimentar en un intervalo de tiempo dado son retenidas en el reactor, mientras que aquellas partículas que tienen una sedimentación pobre son lavadas del sistema. Esto provee una presión de selección en la biomasa del reactor, y solamente las poblaciones con la capacidad de formar biomasa lo suficientemente grande y densa para sedimentar son retenidas³⁸. Por medio de tiempos cortos de sedimentación, la materia que es poco sedimentable es lavada del reactor, reteniendo solamente gránulos. Varios estudios han demostrado que tiempos cortos de sedimentación pueden aumentar la granulación aerobia⁶.

4.13.2. Pasos para la granulación

Se han realizado estudios para examinar el mecanismo correspondiente al proceso de granulación. La principal hipótesis es la de la agregación microbiana, que sugiere que la granulación ocurre por interacciones intra e inter celulares, que se pueden llevar a cabo entre proteínas-polisacáridos o proteínas-proteínas, principalmente a través de receptores celulares de superficie. Liu y Tay⁶, propusieron los siguientes cuatro pasos correspondiendo al proceso de granulación.

1. Contacto microbio-microbio para formar agregados, esto puede ser por difusión hidrodinámica o fuerza de gravedad.
2. Atracción inicial para formar agregados por fuerzas termodinámicas, físico-químicas (van der Waals), químicas o bioquímicas (fusión de membranas celulares, interacción receptor/ligando, deshidratación celular).
3. Secreción de sustancias microbianas que actúan como un pegamento biológico, como las sustancias poliméricas extracelulares (EPS).
4. Estabilización de la estructura tridimensional del gránulo por medio de fuerzas hidrodinámicas.

Es decir, la agregación microbiana sirve como paso inicial en la formación del gránulo. Las bacterias agregadas secretan EPS en el sitio de unión, se multiplican y crecen como grandes flóculos. El lodo floculento sigue creciendo debido a la proliferación bacteriana, provocando la unión de estos flóculos y trayendo consigo la formación de gránulos.

En muchos estudios, los gránulos aerobios se cultivaron a partir de lodo activado, a este lodo, se le conoce como el lodo semilla. La comunidad bacteriana presente en el lodo activado fue importante para el proceso de granulación aerobia.

4.13.3. Granulación aumentada por EPS

Las bacterias tienen la capacidad de secretar sustancias poliméricas extracelulares (EPS), un material adhesivo constituido principalmente por proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos húmicos; este material podría ser de ayuda en el proceso inicial de la granulación ya que la acumulación de las EPS correlaciona con el proceso de adhesión biológica y agregación microbiana³⁹. Liu *et al.*⁴⁰ sugirieron la hipótesis de que las EPS

congregaban células bacterianas y otra materia particulada para formar los agregados. Cammarota *et al.*⁴¹ encontraron que un contenido alto en polisacáridos facilita la adhesión célula-célula y confiere más fuerza a la estructura microbiana en una matriz polimérica. Se ha observado también que la fuerza de corte hidrodinámico compacta los gránulos pero no afecta el contenido y composición de las EPS. Por el contrario, la inhibición de la síntesis microbiana de exopolisacáridos inhibe la agregación microbiana^{6,41}.

Se ha argumentado que las EPS responsables de la integridad estructural de los gránulos aerobios son productos no biodegradables para los microorganismos que los sintetizan, aún en el caso de ayuno; sin embargo otros estudios han demostrado que el ayuno es capaz de inducir la degradación de las EPS por los propios productores, lo que causa el desprendimiento bacteriano⁴².

Se han realizado estudios de oxígeno disuelto (DO), alrededor y dentro de gránulos aerobios y se encontró que el contenido de EPS afecta significativamente la difusividad del oxígeno dentro del gránulo⁷. Combinando las técnicas de tinción múltiple, CLSM y DO, se ha demostrado que existe una capa de 125 μm de grosor que consume la mayoría del oxígeno en los gránulos aerobios⁷.

4.13.4. Composición del alimento

Se han utilizado varios sustratos para cultivar gránulos aerobios incluyendo glucosa, acetato, fenol, etanol, melazas, azúcares, agua residual sintética y agua residual municipal. Investigaciones recientes reportan el cultivo exitoso de gránulos aerobios usando sustratos tóxicos, como fenoles o clorofenoles^{31,43,36, 44,9}. La estructura granular y la diversidad de especies parecen estar relacionadas con el tipo de fuente de carbono⁷.

4.13.5. Carga Orgánica (OLR)

Los gránulos aerobios se pueden formar en una amplia gama de valores de OLR. La granulación aerobia puede soportar cargas altas con sustratos simples como glucosa y acetato. Con estos sustratos de fácil asimilación se pueden alcanzar valores de carga orgánica volumétrica ($v\text{OLR}$) de $15\text{kgDQOm}^{-3}\text{d}^{-1}$, incluso mayores sin comprometer la

integridad granular^{45,46}. Un estudio realizado por Wang *et al.*⁴⁷ demostró que una OLR alta puede ser favorable para la estabilidad granular.

4.13.6. Concentración de oxígeno disuelto

Existen contradicciones respecto al efecto de la concentración de oxígeno en el proceso de granulación aerobia. El grupo de McSwain e Irvine demostraron que el oxígeno disuelto tiene una relevancia mayor y que a bajas concentraciones de este es imposible la granulación aerobia³⁷. Se ha reportado que concentraciones más bajas de 2.5 mg/L resultan en una pobre granulación⁴⁸. Sin embargo, Dancong *et al.*⁴⁹ han formado gránulos aerobios en concentraciones de oxígeno tan bajas como 0.7-1.0 mg/L; por lo tanto estos estudios parecen indicar que la concentración de oxígeno disuelto no es una variable crucial en la formación de gránulos aerobios.

4.13.7. Tiempo de sedimentación

En los SBR utilizados para granulación aerobia se utiliza un corto periodo de sedimentación para forzar la descarga de lodo flocculento. El tiempo de sedimentación ejerce una presión de selección en el lodo del reactor, es decir, las partículas que pueden sedimentar en un periodo de tiempo dado serán retenidas en el reactor, mientras que el resto será lavado del sistema⁵⁰. El tiempo de sedimentación debe de estar en el rango de 2-10 min para los SBR a escala de laboratorio⁷. Adav *et al.*⁵¹ reportaron que existe una temprana aparición de gránulos cuando se utilizan tiempos de sedimentación de 5 minutos en reactores SBR destinados a granulación.

Sheng *et al.*⁵² reportaron que la descarga diaria de material poco sedimentable también es un parámetro de operación importante durante la granulación. Este estudio menciona que aproximadamente un 10% de descarga diaria ayuda a la granulación, ya que la descarga selectiva y continua de lodo pequeño y poco sedimentable, remueve microorganismos que compiten por el sustrato, haciendo entonces que la disponibilidad de este aumente para los microorganismos que están presentes en forma granular.

4.13.8. Ayuno aerobio

Se cree que la granulación puede funcionar como una estrategia de protección bacteriana en contra de la falta de alimento. La operación cíclica de un SBR lleva a un

periodo de biodegradación del sustrato seguido por uno de ayuno aerobio después de cada ciclo. Tay *et al.*³⁰ reportaron que un largo periodo de ayuno tiene un efecto positivo para la granulación microbiana en un SBR y esta hipótesis fue comprobada por otros autores⁵³.

Una repetición frecuente de condiciones de abundancia y ayuno (disponibilidad y escasez de alimento) puede ser utilizada para lograr la granulación^{7,22}. Tay *et al.*⁵⁴ mostraron que un periodo de abundancia preanóxico contribuye al proceso de granulación a través de mecanismos como el aumento de las bacterias heterótrofas. Sin embargo, el grupo de Liu y Tay⁵⁵ mostraron que el periodo de ayuno no es el factor clave en la granulación aerobia. Se necesita más investigación en este tópico para entender los posibles efectos de los periodos de ayuno en la granulación aerobia.

4.13.9. Relación sustrato microorganismo (F/M)

Una mayor relación sustrato/microorganismo o relación F/M, promueve una formación más rápida de gránulos aerobios, además les confiere a los gránulos una mayor estabilidad y tamaño. Por lo tanto se sugiere la estrategia de aplicar diferentes relaciones F/M en las diferentes etapas de la granulación, por ejemplo una alta relación F/M en las primeras etapas y una relación F/M reducida en las últimas etapas pueden ser efectivas.

4.13.10. Relación H/D (altura/diámetro) del reactor

Se creía que la relación H/D o relación altura diámetro en el SBR podía ser un parámetro importante en el control de la forma de los gránulos aerobios. Zhu *et al.*⁵⁶ cultivaron y caracterizaron gránulos degradadores de 4-cloroanilina en un SBR con una alta relación H/D. Ellos notaron que la relación proteína polisacárido (PN/PS) era de 8.2-13.7 y expusieron que un reactor con una alta relación H/D favorece la formación de gránulos más sólidos. Sin embargo Kong *et al.*⁵⁷ evaluaron los efectos en la granulación aerobia de diferentes relaciones H/D, probaron 4 SBR con relaciones de 4, 8, 16 y 24 y no encontraron diferencias significativas, tanto en el tiempo de aparición de los gránulos como en parámetros como el índice volumétrico de lodos (IVL), tamaño del gránulo, velocidad de sedimentación, contenido de EPS, tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) e incluso en la población microbiana; lo que demostró que la relación H/D en el reactor no tiene mayor influencia en la granulación o propiedades de los gránulos.

4.13.11. Tiempo de retención hidráulico

El tiempo de retención hidráulico (TRH) es otro parámetro clave que afecta el desempeño del reactor y la formación de gránulos. El TRH ejerce una influencia profunda en las condiciones hidráulicas y el tiempo de contacto entre los diferentes reactivos dentro del reactor. Beun *et al.*⁵⁸ sugirieron que un TRH corto es favorable para la granulación aerobia, sin embargo un ciclo muy corto suprimirá el crecimiento de sólidos suspendidos debido al lavado frecuente del material biológico. Pan *et al.*⁵⁹ cultivaron gránulos aerobios a cuatro diferentes TRH de 2, 6, 12 y 24 h, y observaron diferencias en las características de los gránulos. Reportaron que el tamaño de la biomasa varió con los diferentes TRH, con los diámetros decreciendo desde 3.5 hasta 0.7 mm según aumentaba el TRH, mientras que el coeficiente de integridad disminuyó desde 98%, en el TRH de 2 h, hasta el 63% para el TRH de 24 h. Los gránulos asociados con los TRH más cortos tuvieron una mayor hidrofobicidad y mayores relaciones PN/PS. Estos reportes indican que un TRH de 6 h es el más apropiado para la granulación.

4.13.12. Volumen de intercambio

El volumen de intercambio es el volumen de licor mezclado removido después de cada ciclo. Se pueden tener porcentajes de intercambio del 40, 50 o incluso el 80%. Wang *et al.*⁶⁰ mostraron que los SBR operando con altos porcentajes de intercambio lograron una rápida granulación. Cabe señalar que los gránulos deben tener buenas propiedades de sedimentación, de otra manera un alto porcentaje de intercambio lavaría la biomasa del reactor, provocando una pobre granulación⁷.

4.13.13. Efectos del pH

El pH del medio es un factor decisivo durante la granulación y la degradación de los contaminantes. Un pH ligeramente alcalino (alrededor de 7.5) es necesario para una apropiada granulación aerobia, valores cercanos a este punto favorecen el predominio de poblaciones bacterianas⁶¹, sin embargo pH mayores a 8.5 impiden el proceso de granulación⁴⁸. Por otra parte, un pH ligeramente ácido favorece el crecimiento de hongos en los gránulos. Por lo tanto el pH se puede utilizar como una estrategia para la selección de especies microbianas dentro de los gránulos⁷.

4.13.14. Efecto de la temperatura

Los cambios en la temperatura también pueden influenciar el desempeño de los sistemas de lodo granular. Hailei *et al.*⁴⁸ reportaron que temperaturas mayores de 40°C o menores de 25°C pueden llevar a un decremento en la cantidad de biomasa. Song *et al.*⁶² cultivaron gránulos aerobios en SBR a temperaturas de 25, 30 y 35°C, y reportaron que 30°C es la temperatura óptima para el cultivo de gránulos maduros, ya que es donde los gránulos presentan la estructura más compacta, mejor capacidad de sedimentación y mayor actividad metabólica.

4.14. Aplicaciones de los gránulos

Las propiedades de los gránulos aerobios les confieren ventajas para el tratamiento de aguas residuales, entre sus características encontramos: tasas de metabolismo altas y estables y resistencia a choques de carga y toxinas debido a la protección de la matriz de EPS. A continuación se mencionaran brevemente algunas aplicaciones que se le ha dado a la tecnología granular aerobia.

4.14.1. Tratamiento de agua residual municipal

La degradación biológica en las aguas residuales municipales tiene un comportamiento totalmente diferente a aquel que se observa en las aguas residuales sintéticas, debido a la presencia de diferentes tipos de materia orgánica. No existe mucha información acerca del desempeño de los gránulos aerobios en el tratamiento de agua residual municipal, pero cabe mencionar, que ya que esta contiene una concentración significativa de nutrientes, es de bastante interés el estudio del desempeño de la biomasa granular, tanto para la remoción de materia orgánica, como para la remoción de los nutrientes.

4.14.2. Remoción de nitrógeno y fósforo

La remoción completa del nitrógeno implica la nitrificación y la desnitrificación. El nitrito y el nitrato producidos por estos dos procesos son reducidos a nitrógeno gaseoso por microorganismos desnitrificadores. Yang *et al.*⁶³, investigaron la remoción simultánea de materia orgánica y de nitrógeno por gránulos aerobios, esto fue gracias a la coexistencia de comunidades heterótrofas, nitrificantes y desnitrificantes en los gránulos aerobios. Tsuneda *et al.*⁶⁴ reportaron poblaciones similares de bacterias heterótrofas

nitrificantes en gránulos aerobios, al igual que una nitrificación y desnitrificación alterna, con eficiencias de nitrificación del 97% y de remoción de DQO del 95%.

Los procesos de nitrificación, desnitrificación y remoción de fósforo simultáneos fueron estudiados en escala laboratorio en un SBR con periodos aerobios y anaerobios por un lapso de 450 días⁶. Se obtuvieron buenos porcentajes de remoción de fósforo y de nitrificación, mismos que fueron relacionados a la presencia de *Acumulibacter* spp. — un microorganismo acumulador de polifosfatos (PAO) — y *Competibacter* spp. — un microorganismo acumulador de glicógeno (GAO) —. *Acumulibacter* spp. fue dominante en la región correspondiente a los primeros 200 μm del gránulo, mientras *Competibacter* spp. fue el microorganismo dominante en la zona central del gránulo⁶.

Schwarzenbeck *et al.*⁶, utilizaron agua residual proveniente de una PTAR para investigar el funcionamiento de los gránulos aerobios en el tratamiento de agua residual municipal, y encontraron unas eficiencias de remoción del 90% de la DQO, 80% del nitrógeno total y 67% del fósforo total.

4.14.3. Tratamiento de aguas con contaminantes orgánicos tóxicos

Los gránulos aerobios se han aplicado exitosamente para el tratamiento de aguas con sustancias orgánicas tóxicas. Se han utilizado para degradar fenol a una tasa específica de $1 \text{ g}_{\text{fenol}} \text{g}_{\text{SSV}}^{-1} \text{d}^{-1}$, y a una concentración de fenol de 500 mg/L. Una causa probable que influye en la alta eficiencia de degradación de fenol por los gránulos, es la barrera que provee la matriz granular, misma que produce una menor concentración de fenol en el interior celular que en el medio⁶.

La piridina y sus derivados son productos secundarios de la refinación del petróleo y son muy utilizados como catalizadores en la industria farmacéutica. Se ha demostrado que los gránulos aerobios pueden degradar eficientemente piridina en concentraciones de 200-2500 mg/L⁶.

5. ANTECEDENTES

5.1. Degradación biológica de 4-CF

Se ha reportado que el 4-CF puede ser degradado y mineralizado por bacterias aerobias dentro de una amplia gama de concentraciones, que van desde 10 mg/L en un reactor continuo de lodos activados⁶⁵ hasta 350 mg/L usando un cultivo puro de *Arthrobacter*

chlorophenolicus A6⁶⁶.

A pesar de que la tasa de degradación de los clorofenoles disminuye con el aumento de átomos de cloro en la molécula, la presencia de un solo átomo de cloro en la estructura molecular del 4-CF no impide su total biodegradación bajo condiciones aerobias, no así en condiciones anaerobias donde existe una acumulación progresiva de 4-CF como un producto de la biodegradación de otros fenoles⁶⁷.

El lodo activado ha demostrado muy buenos resultados en la degradación de fenoles^{18,23,28}.

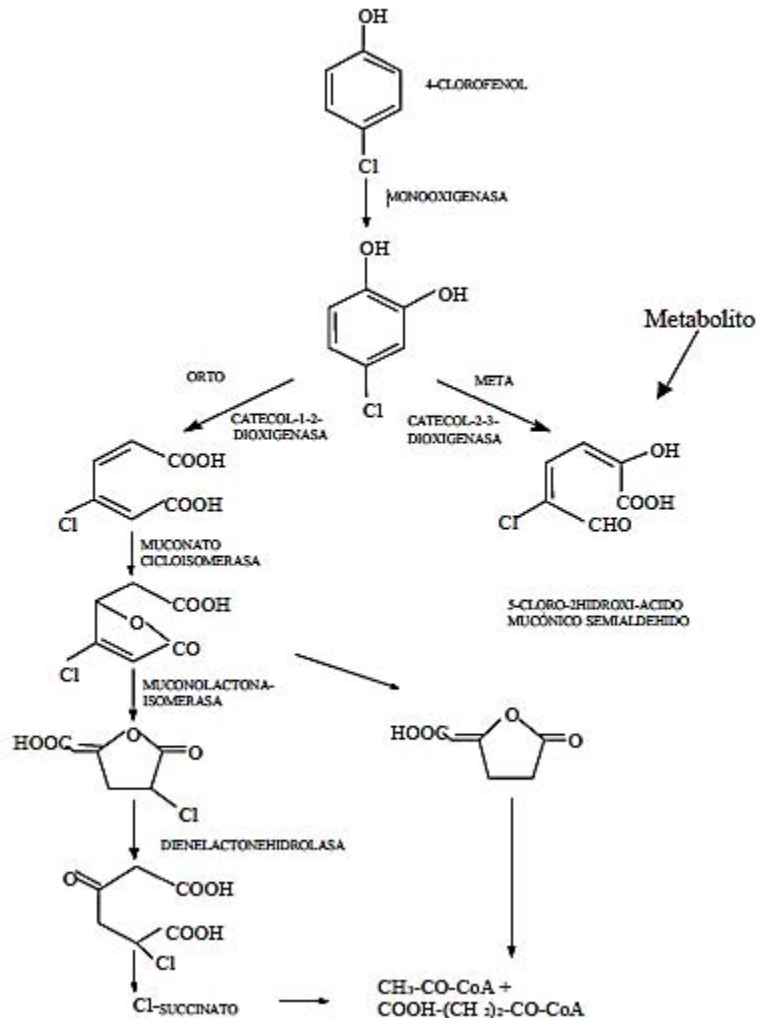


Figura 3.1. Vía de degradación del 4-clorofenol. Commandeur y Parsons (1990)

La ruta metabólica propuesta para la biodegradación del 4-CF consiste en una monooxigenación para formar clorocatecol, una ruptura del anillo en orto transforma el compuesto en ácido cloromucónico, una lactonización con la pérdida de cloro provoca la subsiguiente degradación del compuesto (figura 3.1)⁶⁸.

En el grupo de investigación del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Agua, del Instituto de Ingeniería, UNAM, se han realizado varios estudios acerca de la degradación de 4-CF como compuesto inhibidor modelo.

Buitrón *et al.*⁶⁹ estudiaron la degradación de una mezcla de fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol mediante lodos activados, y demostraron que el consorcio microbiano presenta una actividad degradadora más eficiente con relación a cepas aisladas, concluyendo que la capacidad de degradación de lodos activados puede ser aumentada por medio de una previa aclimatación del inóculo.

También se ha investigado la influencia de la fuente de la cuál proviene el inóculo y la estrategia de aclimatación utilizada para lograr que los lodos activados degraden 4-CF en reactores de tipo secuenciales. Moreno-Andrade y Buitrón⁷⁰ trabajaron con tres inóculos diferentes de lodos de los tanques de aireación de PTAR doméstica (1), municipal (2) e industrial (3); y probaron dos estrategias de aclimatación: la primera, llamada FTC —o control a tiempos fijos— fija el tiempo de reacción independientemente de la eficiencia de remoción. La segunda, llamada VTC —o control a tiempos variables— fija las eficiencias de remoción de 4-CF mayores a 90% antes de concluir cada ciclo. Observaron que los periodos de ayuno tienen una influencia negativa en la actividad de la comunidad, que atribúan a una disminución tanto en la actividad enzimática como en la viabilidad de las células suspendidas⁷¹.

Tanto el origen del inóculo como la estrategia de aclimatación tienen influencia en la tasa específica de remoción (q_x) obtenida después de la aclimatación. Los lodos activados provenientes de la PTAR municipal tuvieron la mejor actividad, lo que se atribuyó a que existían una mayor cantidad de especies degradadoras de 4-CF. Y los lodos que se aclimataron con la estrategia VTC produjeron la biomasa con la mayor actividad, debido a que en este tipo de estrategia se evita el periodo de ayuno⁷⁰.

De igual manera, Moreno-Andrade y Buitrón estudiaron el efecto de los periodos de ayuno y de los picos de concentración de 4-CF (también conocidos como cargas de choque) en la actividad degradadora de biomasa fija y de biomasa suspendida en un reactor SBR de lecho móvil (MBSBR). Las altas cargas del sustrato tóxico producen un aumento en el tiempo de reacción, disminuyen la eficiencia del proceso y pueden resultar inhibitorias o tóxicas para la biomasa. Las variaciones en la concentración del

sustrato, tienen un efecto de estrés para los microorganismos, que disminuye la capacidad degradadora.

Se evaluaron dos periodos de ayuno (24 y 48 h) y dos picos de concentración (500 y 1050 mg_{4CF}/L). La comparación entre los dos tipos de biomasa mostró que la biomasa suspendida tuvo una mayor tasa de degradación (23 mg_{4CP}/g_{SSVh}) en comparación con la biomasa fija (12 mg_{4CP}/g_{SSVh}). Sin embargo la biomasa presente en el lecho móvil, es decir la biomasa fija, mostró una mayor robustez tanto en los periodos de ayuno, como en los picos de concentración. En este estudio se sugirió que diferentes tipos de microorganismos están presentes en la biomasa suspendida y en la biomasa adherida²².

5.2. Degradación óptima de 4-CF

Para que los microorganismos presentes en el biorreactor mantengan su actividad metabólica se deben de evitar los periodos prolongados de ayuno, así como los picos de concentración también conocidos como cargas de choque, que son comunes en la operación industrial, ya que algunas veces se generan incrementos súbitos en la concentración de alguna sustancia tóxica²³, lo que representa un problema para los reactores en continuo, que están diseñados para trabajar en condiciones de estado estacionario. El modo de operación estándar de un SBR consiste en fijar la duración de cada fase de acuerdo con una estrategia programada, normalmente dictada por la experiencia del operador; esta estrategia es conocida como control a tiempos fijos o FTC. Los SBR que trabajan con la estrategia de operación estándar tienen varios problemas cuando son utilizados para la degradación de agua tóxica, por ejemplo, puede haber inhibición de los microorganismos, recepción de altas cargas o desaclimatación de la biomasa.

Se han diseñado e implementado diferentes estrategias de control para mantener estable, automáticamente, la concentración de 4-CF dentro del reactor, evitando los largos periodos de ayuno y las cargas de choque, aumentando la eficiencia del proceso, y por lo tanto, disminuyendo el tiempo del ciclo SBR, lo que amplía la cantidad de agua que puede ser tratada²³. Como las fases de llenado, sedimentación, vaciado y tiempo muerto tienen un tiempo establecido y fijo, el tiempo de ciclo puede reducirse si se disminuye el tiempo de reacción. En este sentido, las estrategias que se han

implementado, han utilizado la concentración de oxígeno disuelto (DO), o la tasa de evolución del dióxido de carbono para determinar el fin del periodo de reacción y comenzar el siguiente ciclo inmediatamente.

Buitrón *et al.*²³ evaluaron el desempeño de un SBR que operaba con una estrategia de control, para determinar cuál era el efecto cuando se introducían cargas de choque de 4-CF. La estrategia de control, basada en la medición en línea del oxígeno disuelto en el licor mezclado, detectaba el fin de la reacción buscando el momento en el que el oxígeno disuelto había pasado por un mínimo como consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos, y después de un máximo debido a la saturación de oxígeno del agua. Se encontró una operación estable de la biomasa cuando el reactor se expuso a picos de concentración de 4-CF de hasta 600 mg/L. Picos de 1050 mg/L solo quebrantaron el sistema por un periodo de tiempo corto, sin embargo picos de 1400 mg/L causaron que la actividad metabólica cesara, lo que llevó a la falla del reactor.

Al comprobar la eficiencia de la medición en línea del oxígeno disuelto para el control del proceso de degradación de aguas tóxicas con 4-CF, se continuó con el desarrollo de estrategias basadas en la medición en línea de esta variable. Buitrón *et al.*³ evaluaron la operación de un SBR expuesto a altos picos de concentración de 4-CF con dos estrategias de control basadas en la medición de la concentración de oxígeno disuelto en el licor mezclado. La primera estrategia llamada control a tiempos variables (VTC) detecta el fin de cada periodo de reacción para detenerlo, sin embargo no existe ninguna optimización en el llenado o en la reacción, esta estrategia difiere de la estrategia normal o FTC (control a tiempos fijos), en que una vez que ha terminado la reacción se comienza el siguiente ciclo sin dejar tiempo muerto o de ayuno. En la segunda estrategia, llamada control de tiempo óptimo dirigido por observadores (OB-TOC), la fase de llenado está optimizada, es decir, las fases de reacción y de llenado se llevan al mismo tiempo. El sistema automatizado trata de mantener la máxima tasa de crecimiento específico (μ) —que se relaciona con la máxima tasa metabólica y por lo tanto con la máxima tasa de degradación del sustrato— mediante el control de la tasa de alimentación. En esta estrategia, antes de llegar al máximo volumen, el SBR se comporta como un reactor fed-batch, una vez que se alcanza el volumen máximo, la bomba de alimentación es detenida y el reactor se comporta como un SBR normal.

Para los picos de 4-CF de hasta 700 mg/L, no se encontraron diferencias en la tasa de degradación entre las estrategias VTC y la OB-TOC. Arriba de esta concentración el reactor operado con la estrategia VTC fue muy inestable. Con concentraciones arriba de 1050 mg/L, el reactor presentó una disminución considerable en la tasa de degradación. Mientras que el pico de 1400 mg4CF/L (300% arriba de la concentración inicial) causó una falla total en la actividad biológica, impidiendo la degradación de ese lote de 4-CF.

Para la estrategia OB-TOC, el correcto desempeño del reactor fue mantenido durante la introducción de los picos de 1050 y 1400 mg/L. En estos casos, el tiempo de degradación fue 3 veces menor a aquel observado con la estrategia VTC para las mismas concentraciones. Las tasas de degradación específicas fueron 50% a 400% mayores que aquellas observadas para la estrategia VTC. Se concluyó que la estrategia OB-TOC podría soportar, en teoría, cualquier concentración de tóxicos, debido a que en principio, el flujo de entrada es ajustado para mantener el sustrato tóxico en la concentración óptima, en la cual el sustrato no es un limitante, ni tampoco inhibitorio. Sin embargo, el principal defecto de la estrategia OB-TOC es que para poder funcionar se necesita tener un conocimiento preciso de los parámetros cinéticos: (tasa de crecimiento específico (μ), concentración óptima de sustrato (S^*), tasa de decaimiento de la biomasa (b), coeficiente de rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{Y/S}$) y coeficiente de rendimiento biomasa/oxígeno ($Y_{Y/O}$), los cuales en la práctica son extremadamente difíciles de conocer.

5.3. Crecimiento celular y compuestos tóxicos

El crecimiento celular engloba el proceso de conversión metabólico de un sustrato en productos, lo que hace que se libere energía en forma de ATP, que será utilizada para la síntesis celular.

La cantidad de masa celular, o biomasa formada, es proporcional a la cantidad de sustrato y de producto formado. Se puede definir un coeficiente de producción como:

$$\text{Producción de biomasa: } Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (1)$$

Donde S= sustrato, X= biomasa

5.4. Tasa de crecimiento

En condiciones ideales, el crecimiento de las poblaciones bacterianas sigue un crecimiento exponencial en el tiempo, donde la concentración de la población bacteriana en el tiempo está definida por la siguiente ecuación.

$$X = X_{(t=0)}e^{(\mu-b)t} \quad (2)$$

Donde μ = tasa de crecimiento específico y b = tasa de decaimiento microbiano.

Sin embargo en la práctica existen limitaciones de crecimiento, dadas por ejemplo, por la limitación de sustrato disponible, o por la presencia de tóxicos. La forma de simular esta influencia es diferente en función de las condiciones y del grupo de microorganismos. En general se acepta que se cumple la cinética de Monod:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (3)$$

Donde μ_{max} = tasa máxima de crecimiento específico y K_s =Constante de saturación.

La dependencia de la velocidad de crecimiento específica hacia el sustrato, es tal que si la cantidad de sustrato es muy grande, la tasa específica de crecimiento se aproxima al valor máximo y si la concentración de sustrato tiende a cero, la tasa de crecimiento se aproxima a cero (figura 3.2).

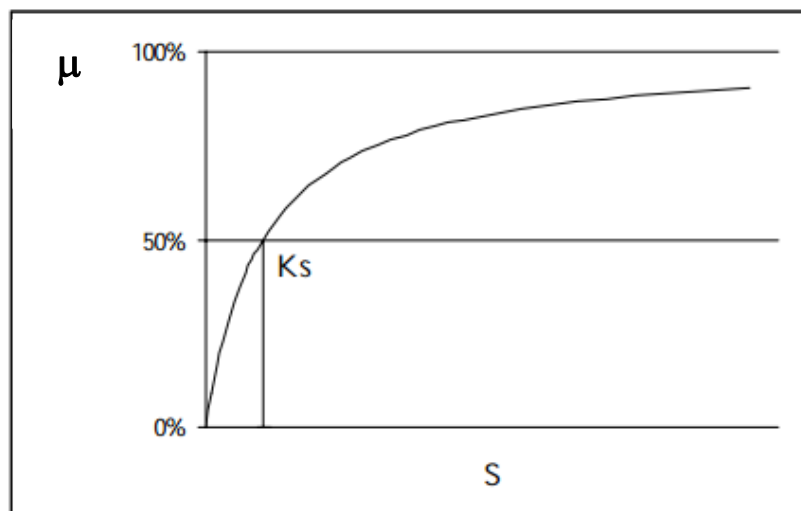


Figura 3.2. Cinética de Monod.

Para el caso de un compuesto tóxico, su presencia se refleja en una menor tasa de crecimiento de los microorganismos, disminución de la actividad bacteriana o incluso la muerte de estos. La dificultad para tratar sustratos inhibitorios está relacionado con el comportamiento no monotónico de la tasa de crecimiento específica de la biomasa¹¹, por lo anterior, en estos casos la μ se puede expresar por medio de la cinética de Haldane⁴ en función de la concentración del sustrato tóxico (S):

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_i + \frac{S^2}{K_i}} \quad (4)$$

En este modelo μ alcanza un valor máximo μ^* cuando la concentración del sustrato es S^* . Las concentraciones del sustrato tóxico que están sobre o por debajo de μ , reducirán la tasa de crecimiento y por lo tanto la tasa de reacción (figura 3.3).

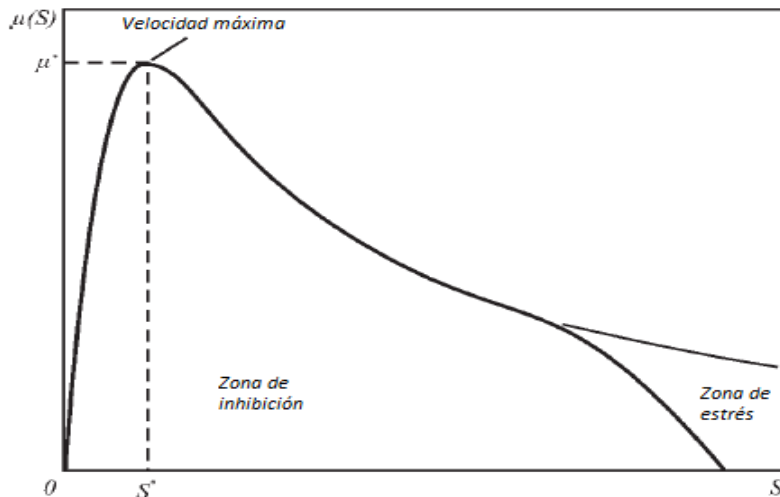


Figura 3.3. Cinética de inhibición de Haldane. *Modificado de 57.*

5.5. ED-TOC

La estrategia de control de tiempo óptimo dirigido por eventos (ED-TOC) es una implementación práctica de control óptimo de tiempo. Para describirla, se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones matemáticas que describen las fases de llenado y de reacción en un SBR:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - bX - X \frac{Q_{in}}{V} \quad (5)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{X}{S}}} \mu X + (S_{in} - S) \frac{Q_{in}}{V} \quad (6)$$

$$\frac{dO}{dt} = -\frac{1}{Y_{\frac{X}{O}}} \mu X - (1 - f_D) b X + k_L a (O_s - O) + (O_{in} - O) \frac{Q_{in}}{V} \quad (7)$$

$$\frac{dV}{dt} = Q_{in} \quad (8)$$

Las cuales describen el comportamiento en el reactor de: la biomasa (5), el sustrato (6), el oxígeno disuelto en el licor mezclado (7) y el volumen del reactor (8).

La ley de control óptimo de tiempo reduce la fase de reacción al mínimo, lo que se logra mediante el control del flujo de influente (Q_{in}) para mantener la concentración de sustrato S , en el valor S^* durante toda la fase de llenado (figura 3.2). Sin embargo, como se discutió en la sección 3.2, implementar esta ley es impráctico ya que requiere la medición de algunas variables de estado del modelo, el conocimiento de los parámetros cinéticos y de la medición de la concentración del sustrato en la entrada.

Para superar estas limitaciones Betancour *et al.*¹¹ describieron una nueva estrategia llamada control óptimo de tiempo dirigido por eventos o ED-TOC. La ED-TOC no requiere de un observador, ni de un modelo matemático completo del reactor, como tampoco requiere del conocimiento de los parámetros cinéticos para que sea implementada⁴. La estrategia ED-TOC usa solamente las mediciones de la concentración de oxígeno disuelto y de la variación del volumen dentro del reactor para controlar el flujo de alimentación, buscando que la tasa de crecimiento específico oscile alrededor del valor máximo (μ_{max}) y que por lo tanto, también se mantenga en el valor máximo la tasa de degradación del sustrato.

Betancour *et al.*¹² introdujeron como variable de entrada la tasa de consumo másico de oxígeno (γ) que está definida por (9):

$$\gamma = \left(\frac{1}{Y_{\frac{X}{O}}} \mu + (1 - f_D) b \right) XV \quad (9)$$

El término dentro del paréntesis corresponde a la tasa de consumo de oxígeno misma que es multiplicada por XV (biomasa total multiplicada por el volumen).

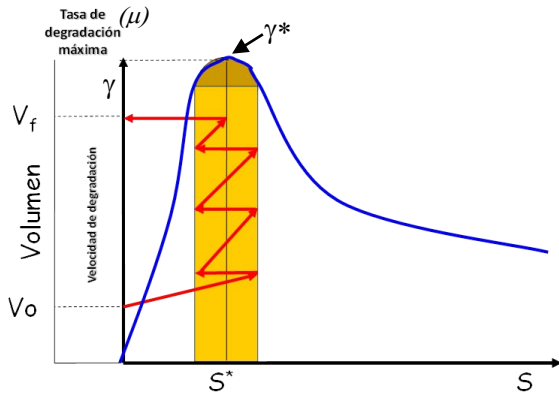


Figura 3.4. Trayectorias del sustrato y del volumen para la estrategia ED-TOC. V_o indica el volumen inicial en el reactor. El influente es alimentado al reactor de tal manera que se mantiene la tasa de reacción alrededor del valor óptimo (zona naranja) que correlaciona con el valor μ_{max} . Una vez que se llega al volumen final V_f , el reactor continúa su proceso en lotes y la tasa de reacción disminuye ^{modificado de 63}.

La figura 3.4 presenta el comportamiento de γ como función de la concentración de sustrato. Se observa que γ es una función lineal de μ , así que las dos variables μ y γ llegan a su máximo μ^* y γ^* al mismo valor S^* . El mantener γ a su máximo valor γ^* durante la fase de llenado corresponde a la estrategia de control óptimo de tiempo⁴.

La estrategia ED-TOC enciende y apaga la bomba de alimentación de tal manera que la tasa másica de consumo de oxígeno se mantiene cerca del máximo valor (zona amarilla en la figura 3.3)⁴. Esto se consigue de la siguiente manera: Supongamos que S se encuentra debajo de la concentración S^* y por lo tanto γ está debajo de

γ^* . La bomba de alimentación se enciende y por lo tanto γ y S incrementan. Cuando S alcanza y excede el valor S^* , γ llegará a su máximo γ^* y empezará a disminuir. Una vez γ llega a una fracción $P\%$ del máximo γ^* la bomba se apagará. Como consecuencia de este control, durante la fase de llenado, la concentración de sustrato oscilará dentro de un rango, determinado por el valor $P\%$ de γ^* . Para que esta estrategia funcione correctamente solo necesita la estimación correcta de γ , por lo que será efectiva independientemente de si se conocen o no las otras variables y parámetros cinéticos. Por esta razón la ED-TOC es robusta con respecto a las variaciones e incertidumbres en casi todos los parámetros, permite controlar las perturbaciones en la concentración del sustrato tóxico en el influente o en cargas de choque, y por último confiere las ventajas del control óptimo de tiempo manteniendo a la biomasa en la mayor actividad posible y evitando la inhibición⁴.

5.6. Biología molecular aplicada al estudio de sistemas de tratamiento de aguas

La identificación de microorganismos por los métodos convencionales requiere el aislamiento de cultivos puros seguido por técnicas de caracterización morfológica,

metabólica y bioquímicas muy laboriosas, y con baja confiabilidad. Los principales inconvenientes, como el conocimiento de los requerimientos fisiológicos (nutricionales y físico-químicos) y de las complejas relaciones sintróficas y simbióticas, que son abundantes en la naturaleza, hacen casi imposible el obtener cultivos puros de la gran mayoría de los microorganismos que viven en ambientes naturales, sin contar que la mayoría de los medios de cultivo tienden a favorecer el crecimiento de cierto grupo de microorganismos, mientras que otros que también son importantes en la muestra original no proliferan. El número de especies procariontas (*Bacteria* y *Archaea*) conocidas es muy pequeño comparado con la diversidad real de estos microorganismos, lo que nos muestra la dificultad de obtener la información completa de la diversidad bacteriana dentro de un ecosistema utilizando solo las técnicas convencionales.

Una nueva clase de técnicas, que emplean enfoques moleculares, fueron desarrolladas desde la década de los 90 y han revolucionado la investigación en el área de la ecología microbiana. Estas técnicas están basadas en el estudio del ácido ribonucleico (ARN) de la subunidad pequeña del ribosoma procarionte (16S SSU) o en los genes que lo codifican. Dentro de estas técnicas podemos mencionar como sobresalientes a la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante o DGGE, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la clonación molecular. La DGGE es un método simple y relativamente rápido que provee un patrón de bandeo característico, y que puede ser aplicado a varias muestras a la vez, permitiendo obtener perfiles específicos de diferentes muestras, conservando la posibilidad de hacer un análisis genético más profundo por medio de la secuenciación de bandas específicas⁷², sin embargo las secuencias que son poco abundantes en la muestra son omitidas del análisis. La clonación provee información taxonómica muy precisa, sin embargo requiere de una mayor cantidad de tiempo por lo que su introducción al estudio de sistemas de tratamiento de aguas ha sido lenta pero los resultados permiten realizar análisis más profundos de las comunidades microbianas presentes.

Los avances recientes en la secuenciación del ADN han revolucionado el campo de la genómica haciendo posible el análisis de una gran cantidad de secuencias a un menor costo, con las nuevas tecnologías de secuenciación se puede obtener entre 10 y

100 veces más información en el mismo intervalo de tiempo y a un costo 96-99.9% menor que en la secuenciación tradicional de tipo Sanger¹⁵.

En la secuenciación capilar Sanger que se utiliza actualmente, es posible secuenciar en paralelo más de 380 secuencias de entre 600 y 1000 nucleótidos (nt) de longitud; sin embargo, los instrumentos estándar determinan solo 96 muestras, alcanzando una tasa de hasta 6 megabases (Mb) de ADN por día¹⁵, que aunque siendo menor a la tasa que alcanzan otras tecnologías (Roche 454, 754 Mb/día y Illumina, 5000 Mb/día) presenta la menor tasa de error en la secuenciación (10^{-4} - 10^{-5}) y permite hacer lecturas de secuencias de más de 400 nt de longitud¹⁵.

Por décadas los reactores biológicos han sido considerados como “cajas negras”, sin embargo los conocimientos en microbiología y biología molecular han ayudado a mejorar el diseño y el desempeño de una nueva generación de reactores. Debido a su inherente actividad biológica, los sistemas de tratamiento de aguas son una fuente ideal para estudiar la estructura de la comunidad microbiana así como el recambio en esta. La eliminación eficiente de contaminantes xenobióticos por comunidades microbianas, continúa siendo un reto principal para los ecólogos microbianos y para los ingenieros de proceso. El determinar qué microorganismos participan y cómo lo hacen, permitirá obtener una nueva generación de reactores que sean más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos inhibitorios.

5.7. Dinámica poblacional microbiana en reactores biológicos

En años recientes se ha comenzado a hacer el estudio de la dinámica poblacional microbiana en biorreactores, realizando el monitoreo tanto espacial como temporal para determinar si existe un cambio en la población microbiana cuando hay modificaciones en el proceso o en el desempeño del biorreactor, o para saber cuál es la relación entre las especies presentes y el desempeño del reactor. La mayoría de los estudios realizados en la dinámica de poblaciones se han enfocado en la detección de un cambio en las poblaciones cuando el “ecosistema” del biorreactor se expone a una perturbación, aunque también es importante conocer si en sistemas sin disturbios la estabilidad funcional implica una comunidad persistente⁷³.

Whiteley *et al.*⁷⁴ estudiaron la estructura y la actividad de comunidades microbianas en un reactor industrial que degradaba fenol, observaron cuál fue la

respuesta al cambio en la carga de contaminantes, utilizaron la DGGE para conocer la huella molecular en compartimentos específicos del sistema de eliminación de fenoles, así como sondas de FISH. Los análisis moleculares demostraron la presencia de comunidades altamente estructuradas que los autores señalan que han evolucionado en respuesta a las diferentes presiones de selección dentro de cada compartimento. Se encontró relativamente poca diversidad bacteriana con una prevalencia de *Gammaproteobacteria* en la mayoría de las secciones, mientras que la segunda clase en prevalencia fue *Betaproteobacteria* y se mostró también una prevalencia en el grupo *Cytophaga-Flavobacterium*.

En cuanto a la estabilidad que se presenta en el proceso Wells *et al.*⁷⁵, evaluaron la dinámica en la comunidad bacteriana y la relación taxa-tiempo en un reactor de lodos activados que trataba agua residual municipal, buscaron identificar parámetros operacionales o ambientales que pudieran correlacionarse con esa dinámica. El muestreo se realizó por un periodo de un año y encontraron alta representación de *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. En todo este periodo las pruebas moleculares revelaron una fuerte dinámica temporal durante el tiempo de trabajo y rendimientos estables del reactor, lo que plantea que el comportamiento dinámico es una propiedad innata de los sistemas biológicos incluyendo los biorreactores. Se correlacionaron los cambios sucesivos en la dinámica de la estructura de la comunidad bacteriana con los cambios en la temperatura, el oxígeno disuelto y la concentración de nitritos, lo que sugiere que la dinámica en la comunidad está regulada hasta cierto punto por parámetros ambientales y operacionales.

Fernández *et al.*⁷³ analizaron la dinámica poblacional microbiana de un reactor metanogénico funcional estable por un periodo de 605 días, con el objetivo de estudiar qué ocurría con la comunidad microbiana en este periodo de rendimiento constante. Observaron una comunidad dinámica a través de todo el funcionamiento del reactor, por lo que discuten que la estabilidad funcional no implica estabilidad en la comunidad, y que comunidades dinámicas se pueden desarrollar en un ecosistema simple. Encontraron dos periodos bien definidos, en el primero *Methanobacterium formicicum* fue la especie dominante y en el segundo se encontró que *Methanosarcina mazei* y *Methanobacterium bryantii* fueron los microorganismos dominantes. La distribución en *Bacteria* no siguió ningún patrón, cambiando constantemente. Sin embargo estos

resultados contrastan con la población constante en el tiempo que ha sido observada en otros ambientes microbianos, tal es el caso de poblaciones de varios reactores de lecho fluidificado que tratan hidrocarburos aromáticos y que llegan a las mismas poblaciones independientemente del lodo semilla o del tiempo de arranque.

En el caso de la granulación aerobia también se han realizado estudios en la dinámica poblacional. Matsumoto *et al.*⁷⁶ evaluaron la estructura de la comunidad en gránulos nitrificantes producidos en un reactor aerobio alimentado con amonio como única fuente de energía. Por medio de librería de clonas y FISH se reveló que las bacterias amonio oxidantes dominan dentro de los primeros 200 μm debajo de la superficie del gránulo. Las bacterias oxidantes de nitritos están en una capa de 200-300 μm y las bacterias heterótrofas están presentes en el núcleo del gránulo, lo que permitió entender la organización espacial y la actividad bacteriana *in situ*.

Mientras que la diversidad microbiana de gránulos alimentados con sustratos de fácil absorción y de lodo activado que degrada fenoles ha sido bien estudiada, no se cuenta con suficientes reportes de la comunidad microbiana de gránulos que degraden compuestos inhibitorios. Jiang *et al.*³¹ utilizaron métodos dependientes e independientes de cultivo para estudiar la comunidad microbiana de gránulos aerobios que degradaban fenol. Estudios de DGGE demostraron un cambio en la comunidad conforme el lodo semilla pasaba a ser lodo granular. Se confirmó la dominancia de *Betaproteobacteria* y de bacterias con contenido G+C alto. Se encontró también la relación de microorganismos con alta capacidad de degradar fenol con aquellos que presentan la capacidad de autoagregar.

5.8. Dinámica poblacional en la degradación de 4-CF

Una forma de mejorar la eficiencia del proceso de remoción de 4-CF es teniendo el conocimiento de qué microorganismos participan en este. Se ha sugerido que existe una selección y multiplicación de microorganismos especializados que tienen la capacidad metabólica para degradarlo⁷⁷.

Buitrón *et al.*⁶⁹ estudiaron la degradación de una mezcla de fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol mediante lodos activados y realizaron un aislamiento microbiano para identificar los microorganismos involucrados en la degradación de la mezcla de clorofenoles, aislando cuatro colonias pertenecientes a

Aeromonas sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas oryzihabitans* y *Pseudomonas luteola* y dos cepas de micobacterias. Para hacer la determinación se utilizaron medios de cultivo selectivos adicionados con 4-CF, y se realizó la determinación por pruebas bioquímicas, por lo que solo se pudieron identificar estos microorganismos.

Se estudió también por medio de microbiología clásica qué microorganismos estaban presentes en diferentes inóculos (PTAR doméstica, PTAR municipal y PTAR industrial) y cuáles permanecían hasta el final de la aclimatación a 4-CF⁷⁰. Encontraron que *Acinetobacter*, *Brevibacillus* y *Pseudomonas* prevalecieron independientemente del inóculo, mientras que *Alcaligenes* se presentó sólo en el inóculo industrial y municipal.

Moreno-Andrade⁷¹, por medio del estudio de la región hipervariable V3 del gen ARNr 16S y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido de DGGE, sugirió un mínimo de 11 especies presentes en lodos activados que degradaban 4-CF. Encontró *Pseudomonas* sp, *Novosphingobium subarticum*, *Hyphomicrobiaceae* sp, y *Paracoccus* sp.

En el proceso de degradación de 4-CF por medio de granulación aerobia, solo se ha realizado un estudio³⁶. Mar Álvarez³⁶ investigó la comunidad microbiana durante el proceso de aclimatación y granulación en lodos, encontrando una comunidad dinámica tanto en el proceso de aclimatación como en el de granulación. Se observó una mayor diversidad en el inóculo, misma que fue disminuyendo conforme pasaba el tiempo de operación del reactor habiendo una selección de los microorganismos con capacidad de degradación de 4-CF y capacidad para granular. La composición de la comunidad bacteriana mostró una dominancia de *Gammaproteobacteria*, seguido por *Betaproteobacteria* y *Deltaproteobacteria*. De manera específica se encontró el género *Acidoborax* y bacterias como *Pseudorhodofera soli* y *Pseudoxanthomonas japonensis*.

En este proyecto se pretende determinar el efecto que tendrá el mantener a la biomasa trabajando en la mayor tasa de crecimiento. Un resultado esperado es que, ya que los gránulos aerobios estarán en contacto mayor tiempo con el 4-CF, se ejercerá una nueva presión de selección, existiendo una nueva especialización de la comunidad y permaneciendo solo los microorganismos capaces de soportar las condiciones establecidas.

6. HIPÓTESIS

La comunidad bacteriana de los gránulos aerobios de un SBR que degrada 4-clorofenol y que opera con la estrategia convencional (FTC), se especializará cuando el SBR cambie a una operación con una estrategia de control óptimo (ED-TOC) que mantenga a los microorganismos en la máxima tasa de crecimiento (μ_{max}).

7. OBJETIVO

Evaluar los cambios en la comunidad bacteriana de gránulos aerobios que degradan agua sintética con 4-clorofenol cuando el SBR en el que trabajan pasa de operar con la estrategia convencional (FTC), a operar con una estrategia de control óptimo (ED-TOC) en la cual los microorganismos se mantienen en la máxima tasa de crecimiento (μ_{max}).

7.1. Objetivos particulares

1. Determinar la comunidad bacteriana presente en gránulos aerobios de un reactor SBR que degrada 4-CF operado con la estrategia convencional (FTC).
2. Determinar la comunidad bacteriana presente en gránulos aerobios de un reactor SBR que degrada 4-CF operado con una estrategia de control óptimo (ED-TOC).
3. Hacer el seguimiento de diferentes parámetros fisicoquímicos y de operación de la biomasa granular, para determinar si hay un cambio en estos al pasar de la estrategia de operación convencional (FTC) a una estrategia de control óptimo, y correlacionarlos con los microorganismos encontrados.

8. METODOLOGÍA

8.1. Esquema general de trabajo

Fase 1

Operación convencional de un SBR de gránulos aerobios que degrada 4-CF.

- Degradación y cinética de fenoles
- Índice volumétrico de lodos /Velocidad de sedimentación
- Sólidos en el reactor y sólidos suspendidos en efluente
- Determinación de EPS (polisacáridos/proteínas)
- Coeficiente de integridad
- Granulometría
- Respirometría
- Muestras para biología molecular (PCR/DGGE, librería de clonas) y secuenciación

Fase 2

Operación ED-TOC de un SBR de gránulos aerobios que degrada 4-CF.

- Degradación y cinética de fenoles
- Índice volumétrico de lodos/Velocidad de sedimentación
- Sólidos en el reactor y sólidos suspendidos en el efluente
- Determinación de EPS (polisacáridos/proteínas)
- Coeficiente de integridad
- Granulometría
- Respirometría
- Actividad deshidrogenasa
- Observación con microscopía de fluorescencia y CLSM
- Muestras para biología molecular (PCR/DGGE, librería de clonas) y secuenciación

8.2. Estrategia experimental

Se estudió el cambio en la comunidad microbiana de un SBR que operó en dos modos distintos, el primero en FTC y el segundo con la estrategia de control ED-TOC. El desarrollo del experimento contempló dos fases. En la primera fase el SBR de gránulos aerobios se operó 150 días de manera convencional, después de este tiempo se procedió a la segunda fase del proyecto, en la cual se implementó la estrategia de control óptimo por un periodo de 100 días. Durante toda la operación se tomaron muestras que fueron almacenadas en congelación. Por último para determinar los cambios en la comunidad bacteriana, de las muestras tomadas se realizó la extracción de material genético y se amplificaron dos regiones diferentes del 16S rRNA. Con ambos amplicones se realizó un DGGE para observar los diferentes patrones de bandeo y con el amplicón correspondiente a las regiones hipervariables 6, 7 y 8 se realizó una librería de clonas con su posterior secuenciación y análisis.

8.3. Operación del biorreactor

Se empleó un biorreactor discontinuo secuencial con capacidad de 7 L y un volumen útil de 6 L, el volumen de intercambio fue del 50% (figura 6.1). El flujo de aire empleado fue de 1 L/min, regulado por un controlador de flujo másico Aalborg modelo GFC17, el flujo estaba dirigido hacia un difusor tubular de burbuja fina colocado en la parte inferior del reactor. El oxígeno disuelto (DO) y la temperatura se midieron con un sensor en línea Endress Hauser COS41. La temperatura promedio se mantuvo a 25°C por medio de un sistema de recirculación de agua que pasaba a través de una doble pared en el reactor, la temperatura del agua se reguló desde un recipiente con un calentador (Thermo Scientific). Los flujos de entrada y salida fueron controlados mediante el uso de bombas peristálticas Masterflex modelo 7523-20 (Perkin Elmer, USA). Todas las señales de medición fueron recibidas en una tarjeta de adquisición de datos (DAC) National Instruments modelo USB6008 y procesadas en la computadora mediante el programa *Biorec* (desarrollado por el Instituto de Ingeniería, UNAM) en el software LabView¹². El agua residual sintética se preparó agregando 4-CF [300-500 mg/L] como única fuente de carbono y energía, y se añadieron oligoelementos (medio mineral) de acuerdo con AFNOR 1985⁷⁸ modificado por Moreno y Buitrón 2004⁷⁰ a partir de las siguientes disoluciones: A) KH_2PO_4 [8.5 g/L], K_2HPO_4 [21.75 g/L], $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [33.4

g/L], NH_4Cl [2.5 g/L]. B) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [22.5 g/L]. C) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [36.4 g/L]. D) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [0.25 g/L]. E) $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [0.0399 g/L], H_3BO_4 [0.0572 g/L], ZnCl_2 [0.0428], $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ [0.0347]. Todas las disoluciones se prepararon en agua destilada y se diluyeron con agua potable, por cada litro de agua residual sintética se agregaron 3 mL de la disolución A y 1 mL de las demás disoluciones. Como única fuente de carbono y energía se empleó 4-CF [300-500 mg/L].

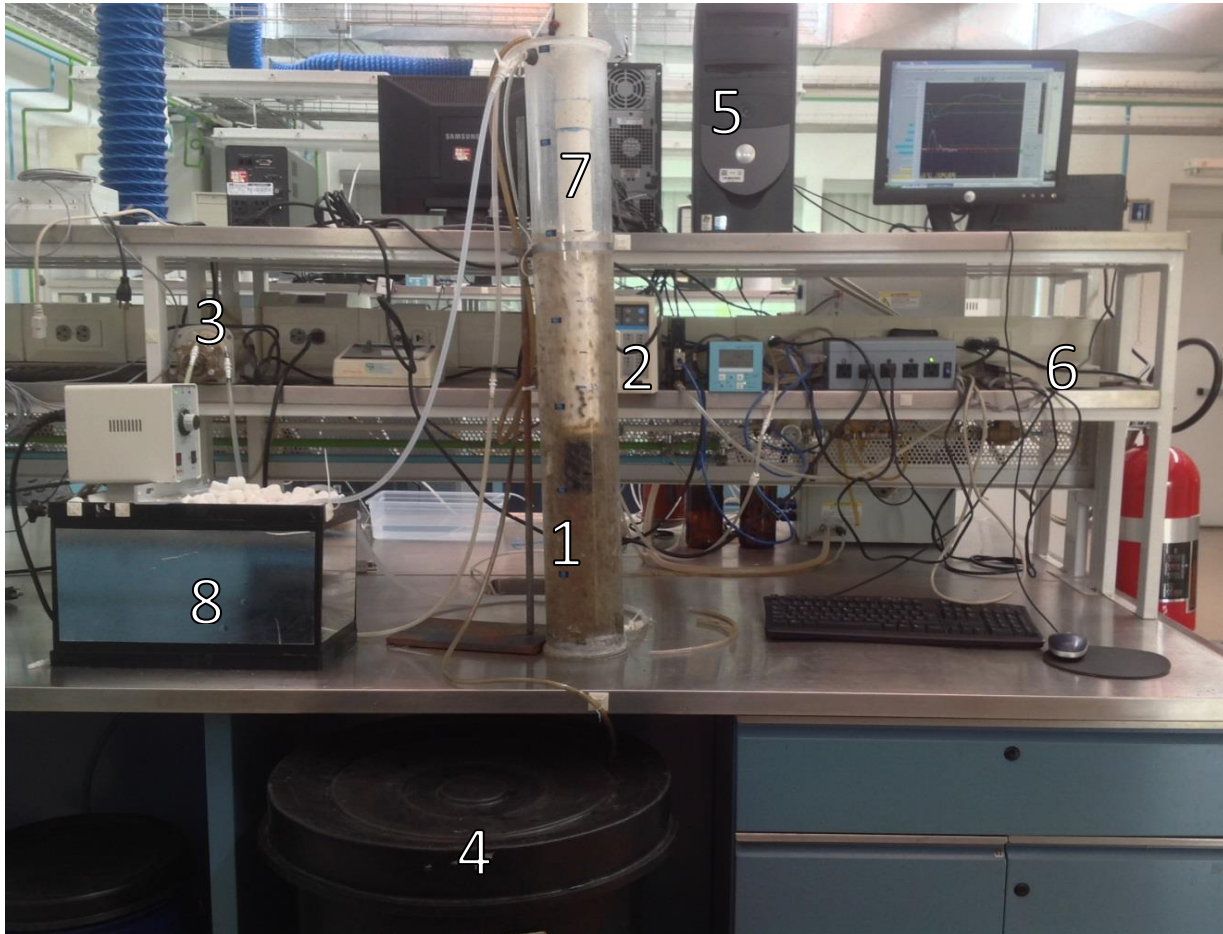


Figura 6.1. Sistema SBR con gránulos aerobios. Reactor SBR (1), bomba de llenado (2), bomba de vaciado (3), tanque de alimentación (4), PC (5), tarjeta de adquisición de datos (6), sensor de oxígeno disuelto y temperatura, (7) sistema de control de temperatura (8).

En la primera etapa, el SBR funcionó bajo los siguientes tiempos en cada fase. Llenado: 5 min; reacción: variable (3h-8h) —en todos se consiguió una eficiencia de remoción del 4CF mayor al 99%—; sedimentación: 1 min; y vaciado: 5 min.

8.4. Técnicas analíticas

8.4.1. Fenoles totales

La concentración de 4-CF fue determinada tomando muestras y procesándolas fuera de línea usando el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina⁷⁹. Los compuestos fenólicos reaccionan con la 4-aminoantipirina para formar un complejo de color que es detectado por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 500 nm.

8.4.2. Sólidos totales y sólidos suspendidos totales

Los sólidos totales (ST) dentro del reactor y los sólidos suspendidos totales (SST) en el efluente fueron determinados por gravimetría de acuerdo con los métodos estándar⁷⁹.

8.4.3. Velocidad de sedimentación e índice volumétrico de lodos

La velocidad de sedimentación (VS) es un indicador para juzgar la calidad del lodo y como su nombre lo expresa, nos muestra la velocidad con la que sedimenta la biomasa. El índice volumétrico de lodos (IVL) nos indica la capacidad de compactación de los lodos, es decir, es una relación que nos dice qué volumen ocupa cierta cantidad del lodo. El IVL y la VS, fueron evaluados según los métodos estándar⁷⁹.

8.4.4. Respirimetría

La respirometría es la medición de la tasa de consumo de oxígeno bajo condiciones bien definidas⁸⁰. La actividad respirométrica de los microorganismos se determinó de acuerdo con Moreno-Andrade y Buitrón⁸¹. Después de que finalizara el ciclo y el 4-CF fuera totalmente consumido, los microorganismos se dejaron en respiración endógena (aireación sin alimento) por una hora y pasando este tiempo se tomaron 30-40 mL de licor mezclado, mismo que se dejó sedimentar por 3 min y al cual se le decantó el sobrenadante. Para medir la tasa específica de consumo de oxígeno endógena ($TECO_{end}$), los gránulos fueron resuspendidos en una disolución de nutrientes (medio mineral), la cual fue previamente saturada de oxígeno, y se colocaron en un minireactor de un volumen de 70 mL totalmente cerrado, en donde se monitoreó la variación en la cantidad de oxígeno disuelto por un periodo de 15 min. Para calcular la tasa específica de consumo de oxígeno exógena ($TECO_{ex}$), que es el consumo de oxígeno evaluado con sustrato, se decantó la solución mineral utilizada para calcular la $TECO_{end}$, y los

gránulos fueron resuspendidos en una solución mineral saturada de oxígeno y con 50 mg 4-CF/L, donde se monitoreó la variación en la cantidad del oxígeno disuelto por 15 min. En ambos casos, la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) fue determinada por medio del cálculo de la pendiente obtenida al graficar la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo y dividida por la concentración de SV (sección 6.4.2). Para realizar el cálculo de la tasa específica de consumo de oxígeno total, se utilizó la siguiente ecuación:

$$TECO_T = TECO_{ex} - TECO_{end} \quad (10)$$

8.4.5. Tamaño de gránulo

El tamaño del gránulo se midió según Laguna *et al.*⁸² y Arellano-Badillo⁹. Después de acabar el ciclo se tomaron 500 mL del licor mezclado, el cual fue tamizado en una malla estándar de 0.21 mm (número 65) considerando la definición de de Kreuk *et al.*⁸. La biomasa retenida fue esparcida en una placa de fondo claro a la que se le realizó la toma de una fotografía digital. El tamaño de gránulo fue estimado mediante el análisis de las imágenes digitales con el programa AxioVision rel. 4.9.1 (Carl Zeiss, Germany).

8.4.6. Coeficiente de integridad

El coeficiente de integridad (CI) sirve para determinar la fuerza de compactación de los gránulos aerobios y fue medido de acuerdo a lo recomendado por Ghangrekar *et al.*⁸³. Una vez acabado el ciclo y consumido el sustrato se tomaron 30-40 mL del licor mezclado que se tamizó en una malla estándar de 0.21 mm (número 65) considerando la definición de de Kreuk *et al.*⁸. Los gránulos retenidos en la malla fueron resuspendidos en 150 mL de agua potable y fueron sometidos a agitación en orbital (200 rpm por 5 min). Después de la agitación la mezcla se traspasó a una probeta de 200 mL donde se dejó sedimentar por 1 min. El sobrenadante se decantó y se le midieron los sólidos suspendidos de acuerdo con los métodos estándar⁷⁹. A los gránulos que permanecieron en la probeta se les realizó la medición de los sólidos totales de acuerdo con los métodos estándar⁷⁹. El CI se calculó con la siguiente ecuación:

$$CI = \frac{SST_{dec}}{ST + SST_{dec}} \times 100\% \quad (11)$$

Donde SST_{dec} son los sólidos suspendidos totales decantados y ST son los sólidos totales de los gránulos que permanecieron en la probeta.

8.4.7. Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

Las EPS son una mezcla de polímeros de alto peso molecular excretada por los microorganismos, son el componente principal para que los agregados microbianos mantengan su matriz tridimensional³⁹. Las EPS fueron extraídas y evaluadas de acuerdo con Arellano-Badillo⁹ y fueron clasificadas en dos tipos: A) EPS libres, que son las que se encuentran entre los agregados de biomasa y el licor mezclado y B) EPS ligadas, que son las que están unidas fuertemente a la superficie granular. Las EPS libres se determinaron tomando una muestra de 50 mL del licor mezclado, que se centrifugó a 2200 g por 20 min, el sobrenadante se tomó y se midieron las fracciones de carbohidratos y proteínas de acuerdo con los métodos de Lowry⁸⁴ y de Dubois⁸⁵. Como estándares se utilizaron albúmina de suero bovino y dextrosa (Sigma, USA).

Para la extracción de las EPS ligadas, la biomasa sedimentada en la centrifugación anterior se resuspendió en 50 mL (volumen original) de una solución isotónica de NaCl [0.9% w/w] y se calentó a 80°C por una hora, se dejó enfriar a temperatura ambiente por una hora y se le realizó una centrifugación a 2200 g por 20 min. Se tomó la fracción correspondiente al sobrenadante y se efectuó la cuantificación de carbohidratos y proteínas de acuerdo con los métodos de Lowry⁸⁴ y de Dubois⁸⁵. Como estándares se utilizaron albúmina de suero bovino y dextrosa (Sigma, USA).

8.4.8. Actividad deshidrogenasa

Las deshidrogenasas son enzimas de óxido-reducción que participan en el transporte de electrones de un sustrato orgánico al aceptor final de electrones. En el metabolismo aerobio, el último aceptor de electrones es el oxígeno, así que la tasa microbiana de consumo de oxígeno se puede reflejar en la actividad deshidrogenasa. Algunas sales de tetrazolium, como el INT (cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolium) compiten con el oxígeno en el sistema de transporte de electrones y son

utilizados para medir la actividad deshidrogenasa, bajo condiciones reductoras el INT es convertido en un compuesto colorido de la familia del formazán⁸⁶.

La cuantificación de la actividad deshidrogenasa se realizó por medio de la técnica del INT según Moreno-Andrade *et al.*²². Para realizar la prueba se tomó un volumen de 10 mL del licor mezclado al que se le agregó 1 mL de INT al 0.2 % (Sigma-Aldrich). La muestra se dejó incubar en oscuridad durante 20 min a temperatura ambiente agitando cada 5 min. Una vez transcurrido ese tiempo la reacción se detuvo con 0.1 mL de formaldehído al 37% (J.T Baker), se centrifugó 10 min a 400g. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 10 mL de etanol para realizar la elución del iodonitrotetrazolium formazán (INT-F) con ayuda de ultrasonido a 600 V por 5 min. Posteriormente el tubo se mantuvo una hora en oscuridad y después de este tiempo se centrifugó 10 min a 400g, se tomó el sobrenadante y este se leyó en espectrofotómetro a 480 nm.

8.4.9. Análisis por microscopía de fluorescencia y CLSM

La microscopía de fluorescencia es una variación del microscopio de luz UV en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda. La microscopía confocal laser de barrido (CLSM) es una combinación del microscopio de fluorescencia con imagen electrónica y puntos de luz suministrados por un haz de láser, que permite obtener imágenes de alta resolución del objeto estudiado.

Se realizó la observación —tanto en microscopio de fluorescencia como en microscopio confocal láser de barrido— de secciones de gránulos teñidos con los siguientes fluoróforos: a) dihidrocloruro de 4,6-diamino-2-fenilindol, mejor conocido como DAPI, que se liga al ADN y que presenta una fluorescencia de color azul, b) isotiocianato de fluoresceína (FITC), un marcador utilizado para conjugarse con proteínas, c) 7-dietilamino-4-metilcumarina o Calcofluor White que señala β -polisacáridos.

Los gránulos se trataron de la siguiente manera: una vez terminado el ciclo y consumido el 4-CF, se dejó a los gránulos en respiración endógena por una hora y se

tomaron 5 gránulos de tamaño promedio. Estos reposaron 12 h en una solución de paraformaldehído [4%] (T. J. Baker, USA) a 4°C. Terminado el lapso se deshidrataron con gradientes de sacarosa: se dejaron en agitación constante (120 rpm) a 4°C con una solución de sacarosa al 15% hasta que los gránulos sedimentaran (aprox 3 h), una vez sedimentados se repitió este paso. Los gránulos fueron recuperados y puestos en agitación constante (120 rpm), a 4°C con una solución de sacarosa al 30% hasta que los gránulos sedimentaran (aprox 3 h), una vez sedimentados se repitió este paso. Los gránulos fueron recuperados y puestos en agitación constante (120 rpm) a 4°C con una mezcla OCT/PBS [50/50] hasta que los gránulos sedimentaran (aprox 30 min) una vez sedimentados se repitió este paso. Con los gránulos fijados y deshidratados se pasó al criostato (Leica CM 1850W, Germany) donde se realizaron cortes de 40 μ m de espesor que fueron recuperados en laminillas Superfrost (VWR, Germany) y se dejaron reposar 24 h a temperatura ambiente.

Se realizaron tinciones conjuntas para proteínas/ácidos nucleicos (FITC/DAPI), y para proteínas/carbohidratos (FITC/CW). Se añadieron 25 μ L de cada uno de los colorantes en las laminillas y se dejaron reposar por 20 min. Después se realizaron dos lavados, cada uno por 5 min con buffer PBS pH=7.0, se agregaron 50 mL de una mezcla DABCO/glicerol y se dejó secar por 10 min. Los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos y se barnizaron los bordes para sellar la preparación.

Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Germany) equipado con el sistema apotome, las imágenes digitales fueron tomadas por la AxioCam (Carl Zeiss, Germany) y tratadas con el analizador de imágenes AxioVision 4.8 SE64 4.9.1. Posteriormente se observaron en los microscopios confocal laser de barrido LSM 510 (Zeiss, Germany) y LSM 780 DUO Imager Z2 (Zeiss, Germany), de acuerdo a las condiciones de la tabla 6.1.

Tabla 6.1. Fluoróforos utilizados para las tinciones de los gránulos aerobios

Fluoróforo	Longitud de onda excitación (nm)	Longitud de onda emisión (nm)	Componente marcado
DAPI	358	400-480	Ácidos nucleicos
FITC	488	500-550	Proteínas
CW	400	410-480	β -1,4 y β -1,3 polisacáridos

8.5. Parámetros de operación del reactor

Tabla 6.2. Parámetros utilizados en la operación del reactor con la estrategia FTC y posteriormente con la estrategia ED-TOC.

Parámetro	
Temperatura	25 °C
pH	7.4 +/- 0.3
Volumen intercambio	2 L (50%)
Relación H/D	6
Tiempo de sedimentación	1 min

8.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados de las pruebas fisicoquímicas se realizó con el programa GraphPad Prism 5. Para muestras con distribución normal —la cual fue determinada por medio de la prueba de Pearson ($\alpha=0.05$) — la comparación entre las medias de los valores entre las dos estrategias de operación se realizó con la prueba t de Student. Para las muestras no paramétricas se utilizó como medida de comparación de medias la prueba de Mann-Whitney.

8.7. Biología molecular

Para la determinación de la diversidad y cambios en la comunidad microbiana en los gránulos que trabajaron con las estrategias FTC y ED-TOC se decidió llevar a cabo dos técnicas moleculares. Se realizó una DGGE con dos sets de primers (figura 6.2) para observar los patrones de bandeo de la comunidad bacteriana, y para hacer un análisis más detallado se realizaron dos librerías de clonas, cada una correspondiente a cada

estrategia. Las muestras de biomasa fueron tomadas cada mes de operación, ya fuera en FTC o en ED-TOC, los gránulos se recolectaron al final de cada ciclo y se les dio dos lavados a 2200g por 7 min con solución salina fisiológica [0.9 %]. Los gránulos fueron conservados en esta misma solución y congelados a -20°C. A continuación se detalla la metodología utilizada para la realización de la DGGE y de la creación de las bibliotecas de clonas con su consiguiente secuenciación.

8.7.1. Extracción del ADN

Una vez seleccionadas las muestras (5 para FTC y 4 para ED-TOC), se descongelaron y se centrifugaron a 2900g por 15 min para juntar la mayor cantidad de gránulos posibles. La biomasa se resuspendió en 5 mL de buffer de extracción (Tris-HCl [20 mM], EDTA [50 mM], NaCl [20 mM]). En este buffer se agregaron 500 µL de lisozima [30 mg/mL] (Sigma-Aldrich, USA) y se realizó una incubación por 30 min a 37°C. Pasando este tiempo se agregaron 250 µL de proteinasa K [0.5 mg/mL] (Sigma-Aldrich, USA) y los gránulos se incubaron toda la noche a 50°C.

Una vez digerida la biomasa se realizó una extracción del material genético con una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) pH=7.4. La mezcla se agregó a los gránulos previamente digeridos y se centrifugó a 2900g por 20 min. Una vez separadas las fases, se conservó la fase acuosa y la fase orgánica fue desechada. Para eliminar la mayor cantidad de residuos celulares se repitió otra vez este proceso conservando de nuevo la fase acuosa. Para precipitar el material genético se agregaron isopropanol a -20°C —en un volumen similar a la fase acuosa recuperada— y acetato de sodio [3 M] —en un volumen correspondiente al 10% de la fase acuosa recuperada— y se centrifugó a 6000 g por 3 min, con lo que se obtuvo un pellet.

8.7.2. Limpieza del ADN

Debido al exceso de residuos celulares, principalmente de la fracción proteica, se realizó una limpieza del ADN en columnas comerciales. Se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue 250 kit (Qiagen, Netherland). Para realizar la limpieza se siguió el protocolo recomendado por el proveedor. Dada la fracción de contaminantes remanentes, se realizó una limpieza más en estas mismas columnas. El ADN limpio y eluido se precipitó con un volumen similar de isopropanol a -20°C, y un volumen de acetato de sodio [3 M]

correspondiente al 10% del volumen del eluido, para realizar la visualización del material genético se agregaron 2 μ L de Glycoblu[®] (Life technologies, USA). La mezcla se centrifugó a 6000g por 3 min, el pellet resultante se dejó secar y fue rehidratado con 50 mL de agua grado biología molecular (Sigma). Para verificar la extracción de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa [1 %] (25 min a 75V) a 5 mL de las muestras.

8.7.3. Cuantificación del ADN

Se realizó la cuantificación del ADN por medio del sistema Qbit (Life technologies, USA) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Una vez cuantificado el material genético, se prepararon disoluciones de ADN a una concentración de 20 ng/mL para poder llevar a cabo la PCR.

8.7.4. PCR para DGGE

Para llevar a cabo el estudio de la DGGE se decidió utilizar dos sets diferentes de primers para poder observar distintos patrones de bandeo para la misma comunidad. Se realizó una amplificación con los primers 46F-GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') mismo que contiene una cola rica en guanina/citosina, y 534R (ATT ACC GCG GCT GCT GG) para obtener un fragmento de aproximadamente 550 pb, con el que se cubre la sección de las regiones hipervariables V1, V2 y V3 (figura 6.2) del gen

Tabla 6.3. Reactivos y concentraciones utilizados para realizar la PCR para el set de primers 46F-GC, 534R.

	Vol (μL)	Concentración
DNA	3	100 ng/mL
Buffer	2.5	N/A
dNTP	1	10 mM
BSA	0.7	N/A
Taq TaKara	0.2	N/A
46F-GC	2	10 μ M
534R	2	10 μ M
Suma	11.4	N/A
H2O	13.6	N/A
Total	25	N/A

16S ARNr. Las condiciones en el termociclador incluyeron un paso de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguidos por 30 ciclos comprendidos por desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento de primer a 56°C por 1 min, extensión de la cadena a 72°C por 1 min y un paso de extensión final a 72°C por 7 min. Los reactivos y concentraciones utilizados se muestran en la tabla 6.3. La segunda amplificación se realizó con los

primers TX9F (5'-GGA-TTA-GAW-ACC-CBG-GTA-GTC-3') y 1391R (5'-GAC-GGG-CRG-TGW-GTR-CA-3'), para obtener un amplicón de aproximadamente 600 pb que cubre las regiones hipervariables V5, V6, V7 y V8 (figura 6.2)⁸⁷ del gen 16S ARNr. Las condiciones en el termociclador incluyeron un paso de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguidos por 38 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento de primer a 55°C por 30 s, extensión de la cadena a 72°C por 45 s y un paso de extensión final a 72°C por 7 min. Los reactivos y concentraciones utilizados se muestran en la tabla 6.4.

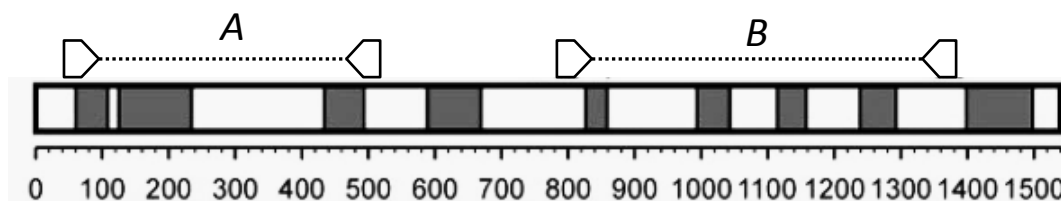


Figura 6.2. Esquema del gen 16S ARNr. Se muestran las 9 regiones hipervariables como bandas de color oscuro (V1-V9). Se señalan las regiones cubiertas por los primers 46F-GC-534R (A) y TX9-1391R (B) (modificado de 81).

8.7.5. Verificación de la PCR, separación de ADN y DGGE

Para verificar la correcta amplificación de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, (70 V por 30 min) y se confirmó que estuvieran presentes las bandas correspondientes a los amplicones de 550 y 600 pb. Una vez verificadas las bandas, se juntaron en un pozo los productos de PCR correspondientes a las muestras 1-5 (reactor con estrategia FTC) y en otro pozo los productos correspondientes a las muestras 6-9 (reactor con estrategia ED-TOC). Estas mezclas se corrieron en un nuevo gel de agarosa [1 %] y se realizó la escisión del par de bandas correspondientes al ADN de los microorganismos de los tratamientos. El ADN

Tabla 6.4. Reactivos y concentraciones utilizados para realizar la PCR para el set de primers TX9.

	Vol (μ L)	Concentración
DNA	2	100 ng/mL
Buffer	2.5	N/A
dNTP	2	100 mM
BSA	0.7	N/A
Taq TaKara	0.125	N/A
TX9F	0.5	12.5 μ M
1391R	0.5	12.5 μ M
Suma	8.325	N/A
H2O	16.675	N/A
Total	25	N/A

fue extraído del gel de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Netherland) siguiendo el protocolo indicado por el proveedor.

El ADN extraído del gel de agarosa fue separado en una DGGE con un gradiente desnaturalizante (urea/formamida) 40-60% en el sistema DCode (Bio-Rad) a una temperatura de 56°C, por 17h a 80V. El gel fue revelado con SYBR Green (Bio-Rad) y visualizado con luz UV. Al gel se le tomó una fotografía digital y de las bandas seleccionadas se recortaron las secciones centrales.

8.7.6. PCR para librería de clonas

Para la amplificación del material genético se utilizaron los primers TX9-F y 1391-R y la polimerasa *TaKara Taq Polymerase* (Clontech, Japón), con el programa de termociclador y reactivos ya mencionados (tabla 6.4).

8.7.7. Verificación de la PCR y separación de ADN

Para verificar la correcta amplificación de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, (70V por 30 min) y se confirmó que estuvieran presentes las bandas correspondientes al amplicón de 600 pb. Una vez verificadas las bandas, en un pozo se juntaron los productos de PCR correspondientes a las muestras 1-5 (reactor con estrategia FTC) y en otro pozo los productos correspondientes a las muestras 6-9 (reactor con estrategia ED-TOC). Estas mezclas se corrieron en un nuevo gel de agarosa [1 %] y se realizó la escisión del par de bandas correspondientes al ADN de los microorganismos de los tratamientos. El ADN fue extraído del gel de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Netherland) siguiendo el protocolo indicado por el proveedor.

8.7.8. Librería de clonas 16S ARNr y secuenciación

Los productos de PCR, tanto de la operación FTC como de la operación ED-TOC, fueron ligados, cada uno por separado, al vector PCRTM 2.1-TOPO[®] [3931 nt] (Invitrogen, Carlsbad, CA) y fueron transformados en células quimiocompetentes *E. coli* DH5 α TM-T1^R (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células transformantes fueron cultivadas en agar LB-ampicilina al que se le adicionó X-gal para la diferenciación de las células (blancas/azules). Por cada una de las estrategias se recuperaron 100 colonias de

células blancas, estas fueron resembradas en agar LB-ampicilina e incubadas por 14 h a 37°C.

Para recuperar el inserto correspondiente al amplicón del 16S ARNr, se llevó a cabo una PCR de colonia para 48 colonias provenientes de la librería de cada estrategia. La PCR se dirigió con los primers M13 F (5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GT-3') y M13 R (5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-3'), ambos primers se trabajaron a una concentración de 12.5 µM (tabla 6.5). Para llevar a cabo la PCR se utilizó la polimerasa

Vivantis Taq Polymerase (Vivantis

Technologies). Las condiciones en el

termociclador incluyeron un paso de

desnaturalización a 94 °C por 2 min,

seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a

94°C por 30 s, alineamiento de primer a 60°C

por 30 s, extensión de la cadena a 72°C por

1 min y un paso de extensión final a 72°C por

5 min. Los reactivos y concentraciones

utilizados se muestran en la tabla 6.5. Del

producto de PCR obtenido se tomaron 15 µL

y se mandaron a secuenciar por el método

de secuenciación capilar Sanger al centro

Seattle, Washington).

Tabla 6.5. Reactivos y concentraciones utilizados para realizar la PCR para el set de primers M13.

	Vol (µL)	Concentración
DNA	colonia	100 ng/mL
Buffer	2.5	N/A
dNTP	1	10 mM
Taq <i>Vivantis</i>	0.2	N/A
Primer M13F	2	12.5
Primer M13R	2	12.5
Suma	7.7	N/A
H2O	17.3	N/A
Total	25	N/A

High Throughput Sequencing (htSEQ,

8.7.9. Análisis filogenético de las secuencias

Una vez que se tuvieron las secuencias disponibles (48 para FTC y 48 para ED-TOC), se realizó una depuración de las secuencias que tuvieron una mala lectura. Con la base de datos depurada se prosiguió a hacer una búsqueda con cada una de las secuencias en el BLAST del NCBI⁸⁸ para determinar cuál era el microorganismo con el que existiera la mayor relación filogenética a partir del gen 16S ARNr, en la región que comprende aproximadamente de los 800 a los 1400 pb. Con estos resultados se formó una nueva base de datos del material secuenciado (secuencias problema) y las secuencias de referencia.

A partir de las secuencias problema y con el uso del programa Qiime⁸⁹, se juntaron las secuencias con más de 97% de similitud, con las que se retribuyeron 43 nuevas secuencias “consenso” correspondientes a las unidades que fueron trabajadas como OTUs. Para determinar la identidad de los organismos correspondientes a los 43 OTUs, sus 43 secuencias se trabajaron en el clasificador del Ribosomal Database Project (RDP)⁹⁰, el cual nos dio la clasificación taxonómica de cada uno de los OTUs.

Para realizar el árbol filogenético, los OTUs y las secuencias de referencia fueron alineados y recortados usando el programa SeaView⁹¹, para el alineamiento se utilizó el algoritmo de Muscle. Con las secuencias debidamente alineadas se prosiguió a construir el árbol filogenético con el programa PAUP⁹² utilizando el método de distancia Neighbour Joining con el modelo Kimura 2 parámetros, con un valor de bootstrap de 100. El árbol se realizó con 103 taxones de los cuales 43 correspondieron a los OTUs problema, 59 a las secuencias de referencia obtenidas con el BLAST y 1 secuencia correspondiente a *Cynechococcus elongatus*, una cianobacteria que se utilizó como outgroup con el cual se enraizó el árbol.

9. RESULTADOS

9.1. Remoción de 4-CF

En la primera etapa el reactor se mantuvo operando en la estrategia FTC por 150 días, y en la segunda etapa se operó con la estrategia de control ED-TOC por 100 días. En el inicio de la estrategia FTC, se alcanzó un tiempo mínimo de degradación por ciclo de 210 min, sin embargo, se decidió llevar el tiempo de ciclo hasta 8 h para tener a la biomasa trabajando el mayor lapso posible sin que existieran problemas de inhibición, esto con el objetivo de observar cuál era el efecto en la población microbiana cuando hay un aumento en la actividad metabólica. A continuación se presentan los resultados obtenidos a lo largo de la operación del reactor.

9.1.1. Porcentaje de remoción de 4-CF

En ambas estrategias se midió el porcentaje de degradación de 4-CF, la concentración de tóxico que se alimentó al reactor estuvo entre los 300 y 500 mg 4-CF/L, sin embargo aunque se varió la concentración de 4-CF alimentado, la eficiencia de remoción se mantuvo superior al 99.0% (tabla 7.1).

Tabla 7.1. Porcentaje de remoción de 4-CF por el SBR en ambas estrategias

4-CF influente [mg/L]	4-CF efluente [mg/L] FTC	Porcentaje de remoción (FTC)	4-CF efluente [mg/L] ED-TOC	Porcentaje de remoción (ED-TOC)
300-500	0.14 +/- 0.11	99.81 +/- 0.03 %	0.41 +/- 0.08	99.81 +/- 0.09 %

9.1.2. Cinéticas de remoción 4-CF

Se llevó a cabo la medición de las cinéticas de degradación de 4-CF para calcular la tasa específica de consumo del sustrato (q_x). Se muestran las gráficas obtenidas para para la estrategia FTC y para la estrategia ED-TOC (figura 7.1 A y B). En la tabla 7.2 se muestra la q_x calculada para ambas estrategias. Para el caso de la estrategia FTC, la q_x se calculó a partir de la pendiente obtenida al graficar la concentración de 4-CF vs tiempo, y para hacer la medición un parámetro específico, la pendiente se dividió entre los sólidos volátiles totales en el reactor. Para la estrategia ED-TOC, la q_x se calculó determinando la cantidad de 4-CF alimentada y consumida en el ciclo, y esta se dividió

entre el producto de los sólidos volátiles totales dentro del reactor por el tiempo que tardó el ciclo. Posteriormente se hizo la conversión a las unidades pertinentes.

Tabla 7.2. Tasa específica de consumo de sustrato (q_x) para ambas estrategias

Estrategia	q_x [mg 4-CF/ gSSV-d]
FTC	1190
ED-TOC	714

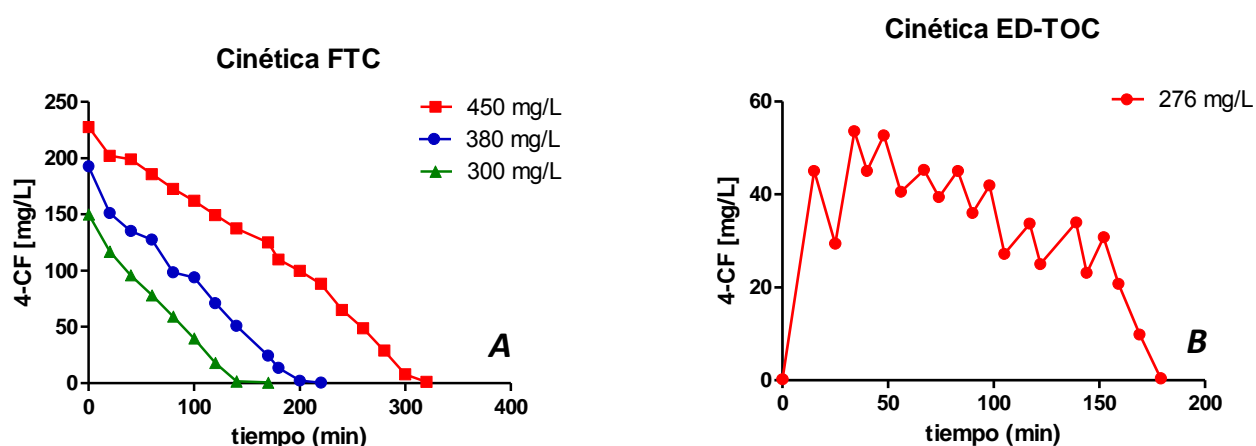


Figura 7.1. Cinéticas de degradación de 4-CF a diferentes concentraciones tanto en la estrategia FTC (A), como en la estrategia ED-TOC (B). Se observa la diferencia en la concentración de 4-CF dentro del reactor entre ambas estrategias. Mientras que en la estrategia FTC se hace el llenado por medio de un solo pulso que provoca una alta concentración de 4-CF, en la estrategia ED-TOC se hace la alimentación por pulsos cortos, por lo que la concentración de 4-CF aumenta y disminuye en función del tiempo, mismo comportamiento que se relaciona con la variación del O_2 disuelto dentro del reactor. En las leyendas se muestra la concentración de sustrato en el influente, para el caso de la operación en FTC debido al volumen de intercambio (50%) la concentración inicial del efluente se reduce a la mitad dentro del reactor.

La estrategia ED-TOC utiliza la concentración de O_2 disuelto en el licor mezclado para decidir tanto el momento en el que se lleva a cabo la alimentación, como el momento en el que la bomba de entrada debe ser apagada. En la figura 7.2 se muestra la evolución de la reacción de degradación de 4-CF en la estrategia ED-TOC. La operación está relacionada con el valor de O_2 disuelto en el licor mezclado. Se observa como solo existe un punto que sobrepasa la concentración de 50mg 4-CF/L, —evitando problemas de inhibición en la biomasa— que corresponde al primer pulso de alimentación, mismo que provoca una disminución en la concentración de O_2 disuelto. El punto de inflexión en la concentración de O_2 , donde observamos el aumento del O_2

disuelto, corresponde con la disminución de 4-CF, por lo que se da otro pulso de alimentación al que le sigue una nueva disminución en la concentración de O_2 disuelto repitiendo un ciclo. Este proceso concluye cuando se llega al volumen final de 4 L. El software inicia el vaciado del reactor unos minutos después que el O_2 en el licor mezclado llega al valor de saturación.

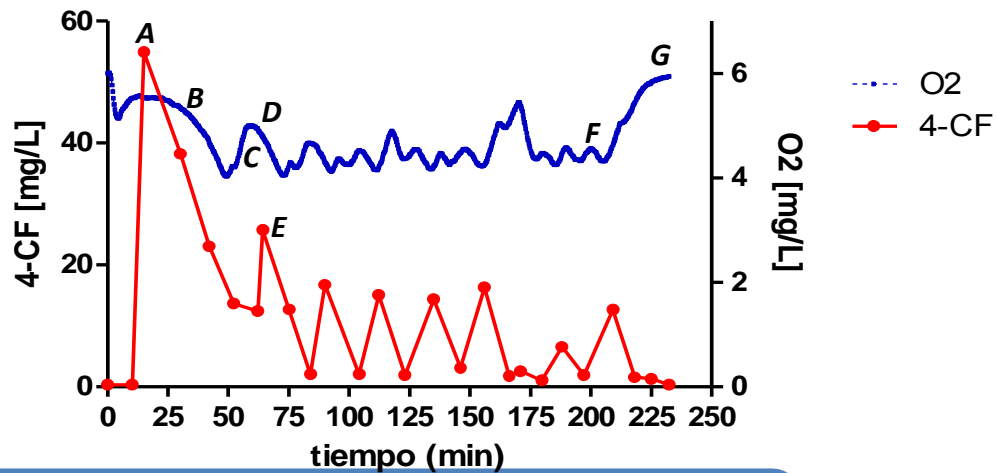


Figura 7.2. Evolución de la concentración de 4-CF y O_2 durante un ciclo de la estrategia ED-TOC. Se observa el aumento en la concentración del sustrato después del primer pulso de alimentación (A), inmediatamente hay una disminución del O_2 debida a la acción metabólica de los microorganismos (B). Conforme se degrada el sustrato se observa un incremento en el O_2 disuelto (C), llegando a un nuevo máximo (D) al que le sigue un pulso de alimentación (E). Este proceso de llenado en pulsos se repite hasta que se ha llegado al volumen final (F), el vaciado del reactor, y por lo tanto el fin del ciclo, comienza una vez que la concentración de O_2 disuelto regresa a su valor de saturación (G). Se observa la concentración de 4-CF y la concentración de O_2 disuelto en el licor mezclado.

9.2. Sólidos en el reactor

Durante todo el periodo de operación del reactor se monitorearon los sólidos suspendidos totales (SST). En la operación en FTC se comenzó con una concentración de aproximadamente 1.0 gSST/L, sin embargo por problemas externos a la operación, la concentración de SST disminuyó hasta 0.5 g/L. A partir del día 60 la concentración de SST se recuperó y de ahí en adelante se mantuvo en un valor de 1.709 +/- 0.065 g/L (figura 7.3, A). Después del día 90 de operación del reactor en modo FTC se comenzó a hacer la medición de los SST en el efluente (SST_{efl}), se obtuvo un valor promedio de 0.027 +/- 0.007 g/L.

Para la operación en ED-TOC los SST en el reactor se mantuvieron en una concentración de 1.990 +/-0.125 g/L, mientras que los SST_{eff} tuvieron un valor de 0.053 +/- 0.011 (figura 6.3, B).

9.2.1. Tiempo de retención de sólidos

A partir de los datos de la concentración de sólidos en el reactor y sólidos suspendidos en el efluente se calculó el tiempo de retención de sólidos (TRS) con la siguiente ecuación:

$$TRS = \frac{\text{Sólidos en el reactor (g)}}{\text{Sólidos en el efluente (g)/día (d)}} \quad (12)$$

Para la estrategia FTC

Considerando una concentración promedio de SST de 1.709 g/L, un volumen de operación de 4 L, una concentración promedio de sólidos en el efluente de 0.025 g/L, un ciclo promedio de 8 h (3 ciclos/día) y un volumen de intercambio de 50% por ciclo (2 L).

$$\text{Sólidos en el reactor} = \left(\frac{1.709 \text{ g}}{L} \right) (4 L) = 6.836 \text{ g}$$

$$\text{Sólidos en el efluente} = \left(\frac{0.025 \text{ g}}{1 L} \right) \left(\frac{6 L}{d} \right) = 0.150 \frac{\text{g}}{d} \therefore TRS = \frac{6.836 \text{ g}}{0.150 \frac{\text{g}}{d}} = 45.6 \text{ d}$$

Para la estrategia ED-TOC

Considerando una concentración promedio de SST de 1.990 g/L, un volumen de operación de 4 L, una concentración promedio de sólidos en el efluente de 0.053 g/L, un ciclo promedio de 3 h (8 ciclos/día) y un volumen de intercambio de 50% por ciclo (2 L).

$$\text{Sólidos en el reactor} = \left(\frac{1.990 \text{ g}}{L} \right) (4 L) = 7.960 \text{ g}$$

$$\text{Sólidos en el efluente} = \left(\frac{0.053 \text{ g}}{1 L} \right) \left(\frac{16 L}{d} \right) = 0.848 \frac{\text{g}}{d} \therefore TRS = \frac{7.960 \text{ g}}{0.848 \frac{\text{g}}{d}} = 9.4 \text{ d}$$

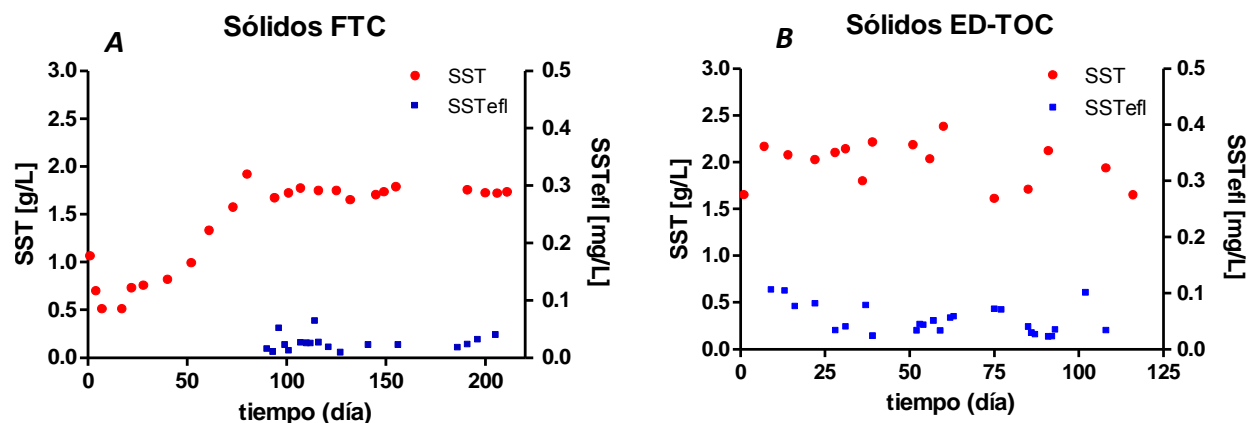


Figura 7.3. Comportamiento de la concentración de sólidos suspendidos totales en el reactor y sólidos suspendidos totales en el efluente a lo largo de la operación del reactor con la estrategia FTC (A) y con la estrategia ED-TOC (B). Al inicio de la operación del reactor con la estrategia FTC se tuvo una disminución considerable de biomasa por problemas externos, pero se recuperó a partir del día 60.

9.3. Velocidad de sedimentación e índice volumétrico de lodos

Tanto para la operación con la estrategia FTC, como para la operación con la estrategia ED-TOC, se calcularon la velocidad de sedimentación (VS) de los gránulos y el índice volumétrico de lodos (IVL). Desde que se inició la operación en FTC la biomasa se encontraba granular, por lo tanto ni la VS ni el IVL mostraron cambios de la magnitud observada al pasar de biomasa floculenta a biomasa granular³⁶. Para el reactor en FTC la VS tuvo un valor de 66.9 +/- 5.2 m/h, pero para el caso del IVL se observó una disminución progresiva del valor con una media de 137.2 +/- 18.6 gSST/L (figura 7.4).

Para la estrategia ED-TOC la velocidad de sedimentación se mantuvo entre los 40-60 m/h los primeros 50 días, pero después comenzó a disminuir, misma disminución que se correlacionó con el aumento en el IVL. En la operación ED-TOC, para la VS se tuvo una media de 39.5 +/- 3.8 m/h y un valor promedio para el IVL de 64.0 +/- 6.6 gSST/L. Por medio de una prueba de *t*, se determinó que tanto el IVL ($p=0.0001$) como la VS ($p=0.0001$) fueron estadísticamente diferentes para ambos procesos.

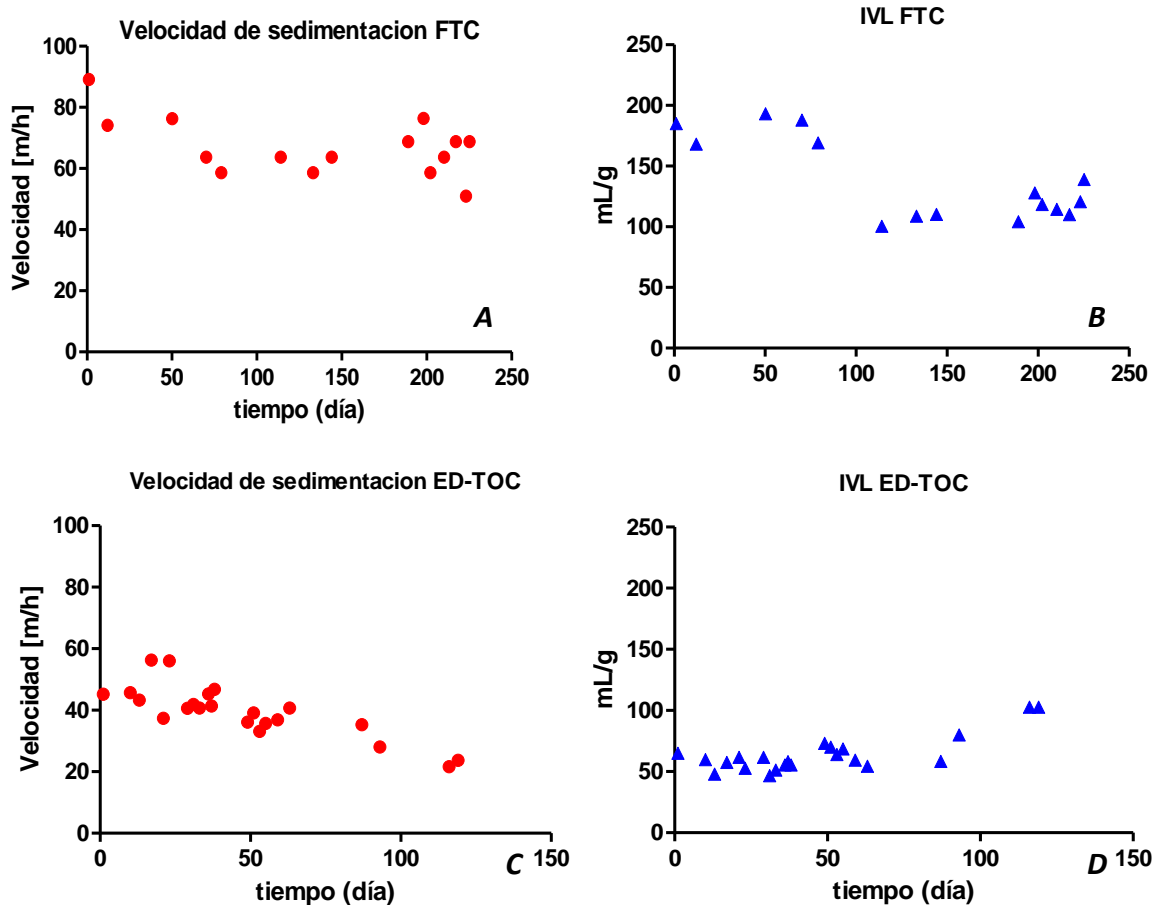


Figura 7.4. Velocidad de sedimentación e índice volumétrico de lodos para la operación del reactor en la estrategia FTC (A y B) y en la estrategia ED-TOC (C y D).

9.4. Respirimetría

Se llevó a cabo el seguimiento de la actividad respirométrica de la biomasa granular por medio de respirometría estática. Para cada medición se obtuvieron dos curvas (figura 7.5), la de respiración endógena, es decir, el consumo de oxígeno que llevan a cabo los microorganismos sin la presencia de sustrato, y la de respiración exógena que se registró cuando se alimentó al mini reactor de pruebas con 4-CF a una concentración de 50 mg/L.

A partir de la resta de la tasa de respiración endógena a la tasa de respiración obtenida con 4-CF (exógena) se calculó la tasa específica de consumo de oxígeno total ($TECO_t$). Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 7.3.

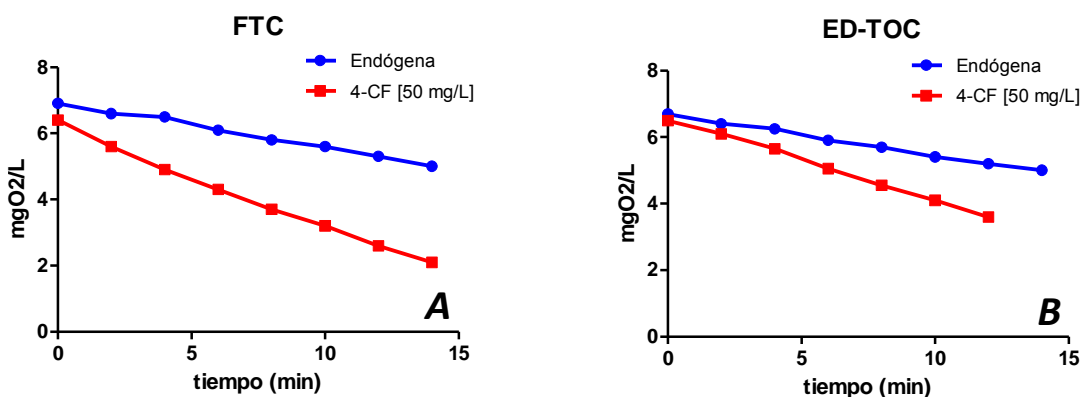


Figura 7.5. Respirogramas típicos obtenidos a partir de gránulos aerobios trabajando en la estrategia FTC (A) y ED-TOC (B). Se observa la disminución en la concentración de oxígeno disuelto en el minireactor de pruebas. Concentración de SSV: 1.2859 g/L (A) y 2.1369 g/L (B).

Tabla 7.3 Tasa específica de consumo de oxígeno total ($TECO_t$) de la biomasa granular en ambas estrategias de operación.

Estrategia	$TECO_t$ [$mgO_2/gSSVh$]
FTC	197 +/- 48
ED-TOC	98 +/- 28

Por medio de una prueba de t se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas medias ($P=0.002$).

9.5. Tamaño de gránulo

A partir del día 70 de operación del reactor con la estrategia FTC se realizó el seguimiento periódico del tamaño granular. Para la estrategia ED-TOC el monitoreo se llevó a cabo desde el principio de la operación. Los gránulos fueron fotografiados digitalmente (figura 7.6) y por medio del software AxioViso se realizó la medición del tamaño promedio.

Para el intervalo de operación con la estrategia FTC (figura 7.6 A) se obtuvo una media en el diámetro granular de 0.64 +/- 0.04 cm, mientras que para el intervalo de operación con la estrategia ED-TOC (figura 7.6 B) se tuvo una media de 0.56 +/- 0.06 cm.

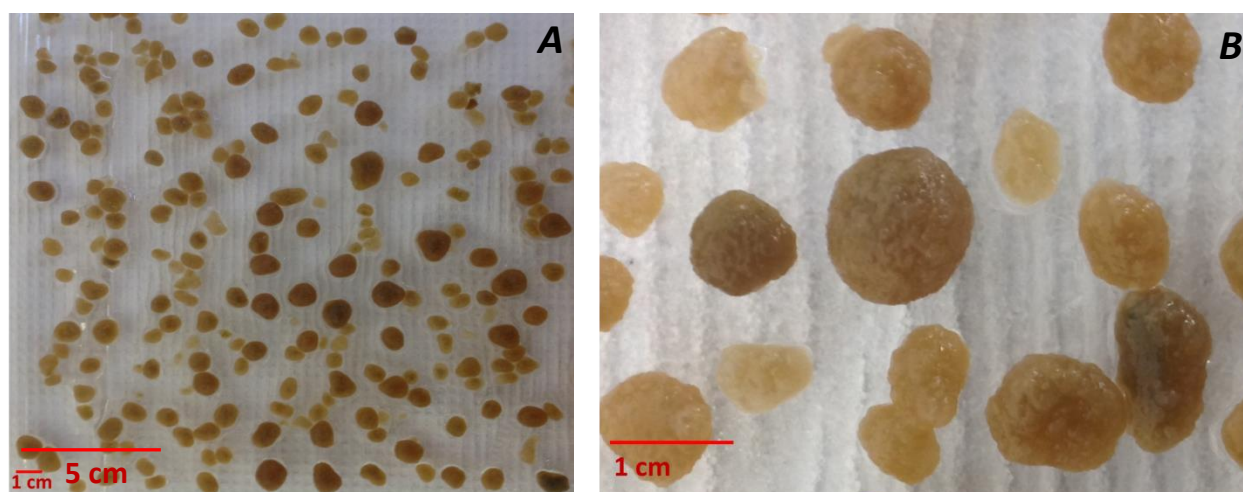


Figura 7.6. Gránulos aerobios al inicio de la estrategia ED-TOC. La barra roja representa 5 centímetros (A). Se muestra un acercamiento a los mismos gránulos, la barra roja representa 1 centímetro (B).

Por medio de una prueba de t se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0253$) entre el tamaño promedio de los gránulos entre ambas estrategias, sin embargo, no se observa una tendencia dentro de los modos de operación, mientras que en algunas mediciones la media aumenta, en otras se observa una disminución. A pesar del menor valor promedio de la biomasa granular en la estrategia ED-TOC, en esta operación se encontraron gránulos de mayor tamaño, teniendo algunos de hasta 1.50 cm de diámetro (figura 7.6).

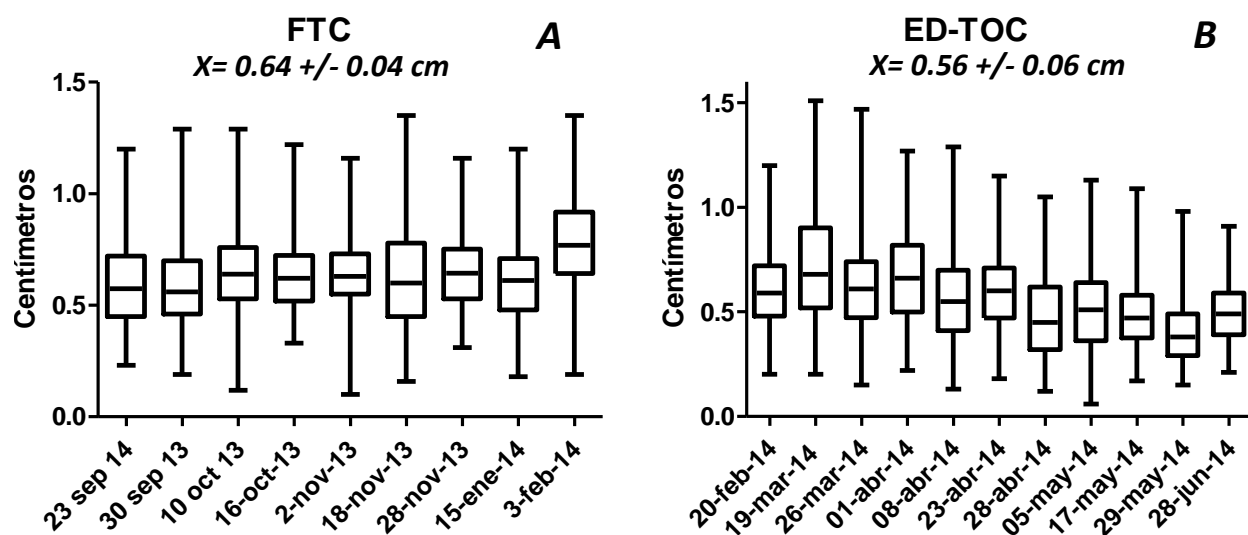


Figura 7.7. Tamaño promedio de los gránulos aerobios en la estrategia FTC (A) y ED-TOC (B). Se muestra el promedio con el intervalo de confianza del 95%. En las gráficas de caja se observan la media y los percentiles 25 y 75. Las barras representan los mínimos y los máximos. $n=300-400$.

9.6. Coeficiente de integridad

El coeficiente de integridad de los gránulos aerobios que trabajaron con ambas estrategias fue superior al 98%, con un valor de 98.0 +/- 0.6% para el modo de operación en FTC y de 98.4 +/- 0.7% para la estrategia ED-TOC (figura 7.6). Por medio de una prueba de t ($P < 0.05$) se demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa para el coeficiente de integridad entre ambas estrategias.

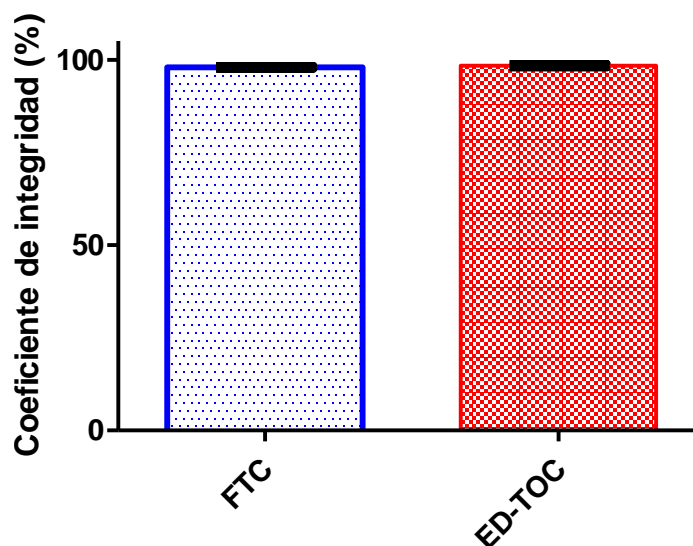


Figura 7.8. Coeficiente de integridad de los gránulos aerobios sometidos a las estrategias FTC y ED-TOC. No se observa diferencia alguna entre ambos tratamientos. $n=14$. Barras: 95% de intervalo de confianza de la media.

9.7. Sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

Para la determinación de EPS se extrajeron proteínas y carbohidratos, en sus fracciones solubles y ligadas (tabla 7.4 y figura 7.9).

A pesar de la disminución en la concentración de las fracciones de las EPS que se observa para la estrategia ED-TOC, se determinó que entre ambas estrategias de operación no existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en la concentración de carbohidratos ni en la concentración de proteínas, tanto en la fracción ligada como en la fracción soluble (tabla 7.4 y figura 7.8).

Tabla 7.4. Sustancias poliméricas extracelulares, en sus fracciones solubles y ligadas, para biomasa granular trabajando en las estrategias ED-TOC y FTC.

EPS	Proteínas			
Fracción	<i>Solubles</i>		<i>Ligadas</i>	
Estrategia	<i>FTC</i>	<i>EDTOC</i>	<i>FTC</i>	<i>EDTOC</i>
Promedio	14.3 +/- 8.9	8.8 +/- 4.5	186.8 +/- 51.7	178.6 +/- 50.3

EPS	Carbohidratos			
Fracción	<i>Solubles</i>		<i>Ligados</i>	
Estrategia	<i>FTC</i>	<i>EDTOC</i>	<i>FTC</i>	<i>EDTOC</i>
Promedio	6.3 +/- 7.7	4.0 +/- 1.4	23.6 +/- 14.8	15.3 +/- 7.3

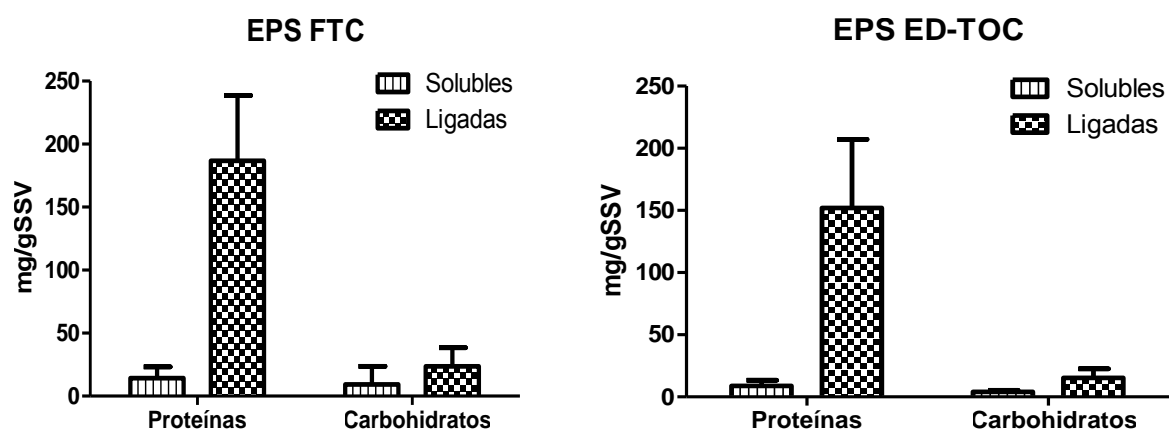


Figura 7.9. Sustancias poliméricas extracelulares (EPS) extraídas de gránulos aerobios que trabajaron con la estrategia FTC y ED-TOC. Se muestran proteínas y polisacáridos en sus fracciones ligadas y solubles. Barras= 95% intervalo de confianza, FTC n=9 y ED-TOC n=10.

9.8. Actividad deshidrogenasa

Para observar la parte de los gránulos aerobios que estaba activa metabólicamente se realizó la medición de la actividad deshidrogenasa. Esta prueba solo se llevó a cabo con los gránulos en la estrategia ED-TOC. Se encontró que toda la superficie granular se tiñó del color rojo oscuro correspondiente al compuesto oxidado INT-F (figura 7.8).

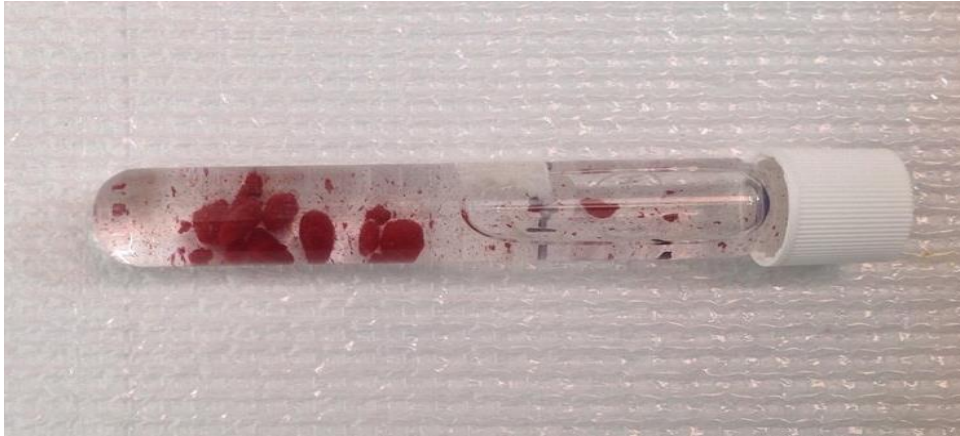


Figura 7.10. Gránulos aerobios tratados con INT. Se observa en toda la superficie granular el color rojo, típico del compuesto oxidado INT-F lo que indica la presencia de actividad metabólica.

Se obtuvo una actividad deshidrogenasa promedio de 15.1 ± 2.5 mgINT-F/gSSV (n=4).

9.9. Microscopía de fluorescencia y CLSM

Se llevó a cabo la observación en microscopio de fluorescencia y en CLSM de los gránulos aerobios del reactor que trabajó con la estrategia ED-TOC. Se realizaron tinciones para observar proteínas (FITC), carbohidratos (Calcofluor White) y ácidos nucleicos (DAPI). La primera microscopía se realizó en el microscopio Leica adaptado con el sistema Apotome, que permite hacer visualización en profundidad (eje z). Una vez confirmada la correcta tinción del gránulo, se pasó al CLSM LSM 510 Zeiss y por último se realizaron capturas en el microscopio CLSM LSMT Duo Imager 2.2 Zeiss, que permite una mejor resolución de las tomas. Se muestran unas imágenes tomadas a partir del gránulo íntegro, tanto con la cámara digital como con el CLSM 510 Zeiss (sin tinción) (figura 7.11). En la figura 7.12 se muestran las imágenes de la microscopía de fluorescencia de los cortes realizados a los gránulos (aprox. $40 \mu\text{m}$ de grosor).

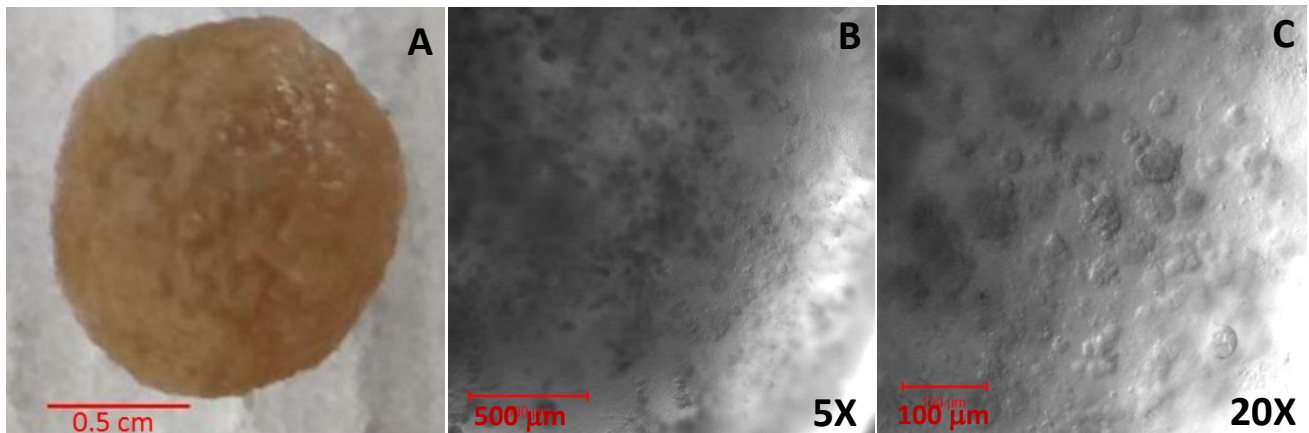


Figura 7.11. Imagen digital de un gránulo aerobio (A). Imagen de la superficie granular (5X) tomada en CLSM (B), se realizó un aumento (20 X) de la misma superficie donde se observa con mayor detalle las características de la superficie (C).

Se muestra la microscopía de fluorescencia para la tinción de ácidos nucleicos/proteína y para carbohidratos/proteínas de una sección de gránulo aerobio.

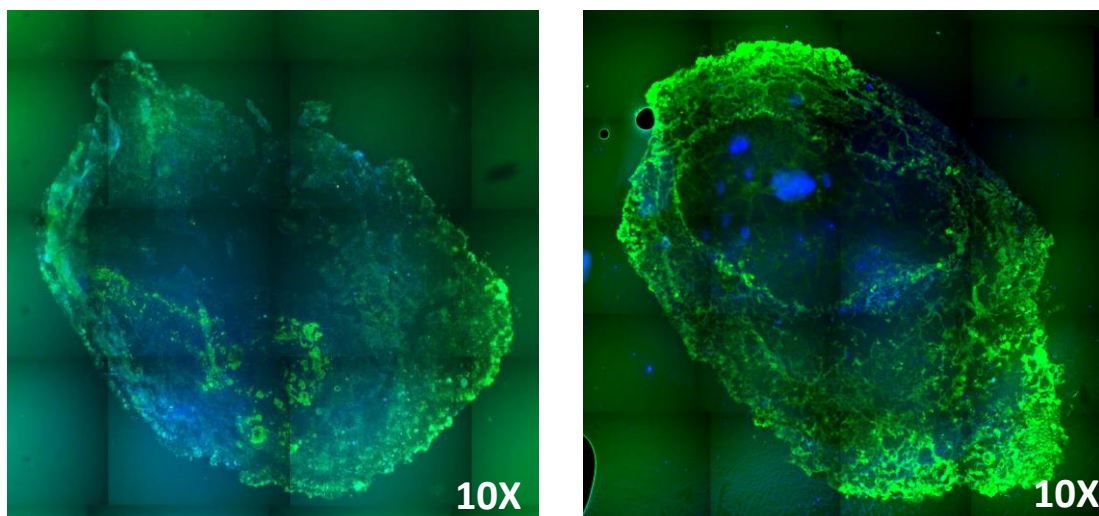


Figura 7.12. Microscopía de fluorescencia en los cortes realizados a los gránulos aerobios Se muestra el mosaico obtenido a 10X para los gránulos teñidos para ácidos nucleico/proteínas [DAPI/FITC] (A) y carbohidratos/proteínas [CW/FITC] (B).

Una vez realizadas las observaciones con la microscopía de fluorescencia, se pasó a la CLSM, tanto al microscopio LSM 510 como al LSM 780 DUO donde se obtuvieron las siguientes imágenes.

- Sistema LSM 510

Ácidos nucleicos y proteínas (DAPI/FITC)

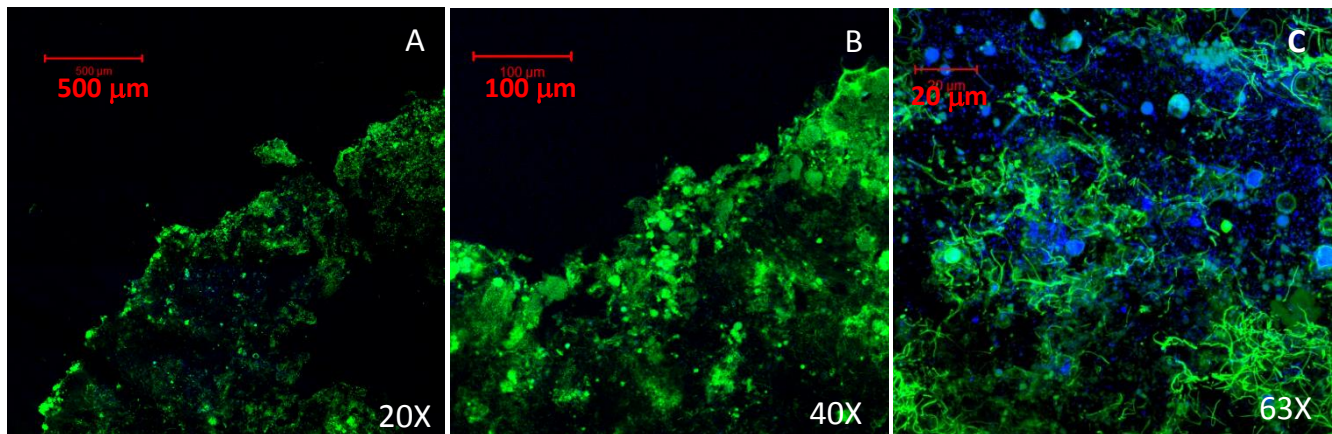


Figura 7.13. Imágenes de la microscopía confocal laser de barrido para ácidos nucleicos (azul) y proteínas (verde) a diferentes acercamientos. Periferia granular a 20 X (A) y a 40 X (B). Los ácidos nucleicos son más notables en el acercamiento a 63 X (C). Se observa la matriz proteica rodeando las acumulaciones de microorganismos (C).

Carbohidratos y proteínas (CW/FITC)

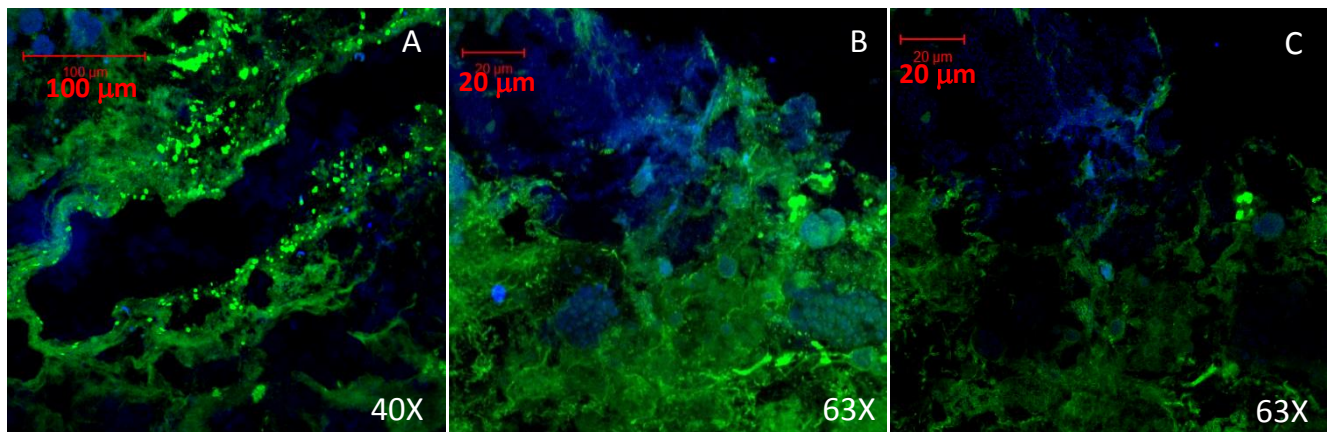


Figura 7.14. Imágenes de la microscopía confocal laser de barrido para carbohidratos (azul) y proteínas (verde) a diferentes acercamientos. Se muestran áreas centrales, desde el acercamiento a 40 X (A) se puede ver la capa de polisacáridos que rodean a las células. A mayor acercamiento (63 X) se observa como las células tienen una capa de carbohidratos a su alrededor.

- Sistema LSM 780

Para las tinciones de ácidos nucleicos y proteínas se obtuvieron las siguientes imágenes.

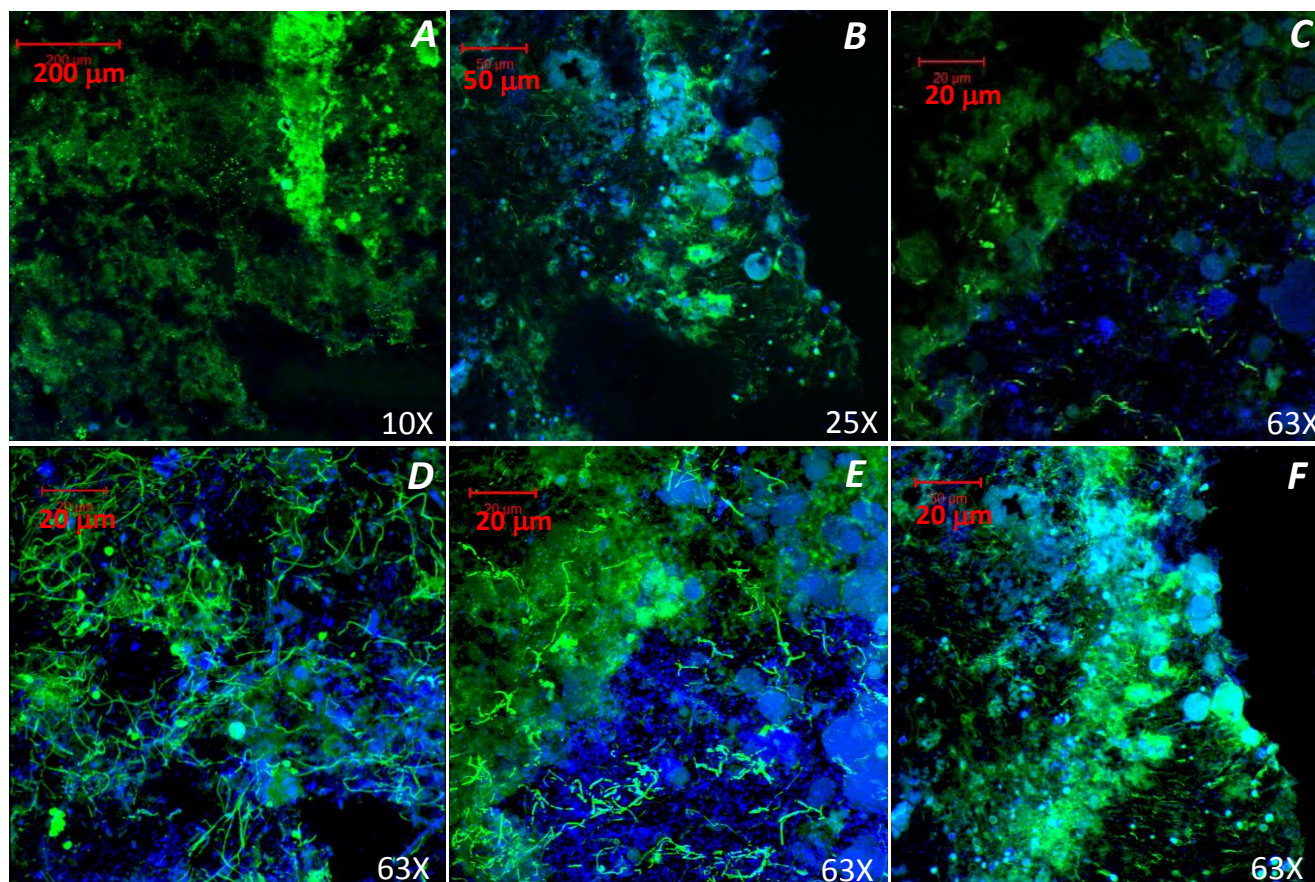


Figura 7.15 Microscopía confocal laser de barrido en el sistema LSM 780 Duo. Tinción para ácidos nucleicos (azul) y proteínas (verde) Se observa la periferia granular (A) (B) y áreas centrales. Nótese la cantidad de proteínas que rodean a los microorganismos.

9.10. DGGE

A continuación se muestran los perfiles de bandeado de la DGGE obtenidos a partir de los amplicones (primers 46F-534R y TX9-1391R) del ADN extraído de los gránulos aerobios trabajando en las estrategias FTC y ED-TOC. Las primeras dos bandas corresponden a los tratamientos FTC y ED-TOC, para el amplicón obtenido con los primers TX9, 1391R que cubre las regiones hipervariables V5, V6, V7 y V8. Las siguientes dos bandas son los tratamientos FTC y ED-TOC, para el amplicón obtenido con los primers 46F-GC, 534R que cubre las regiones hipervariables V1, V2 y V3 (figura 7.16). Para el set TX9 observamos 5 ribotipos (bandas) en las dos estrategias, mientras

que para el set 46-F-534R se observan 10 bandas para la operación en FTC y 9 bandas para la operación en ED-TOC.

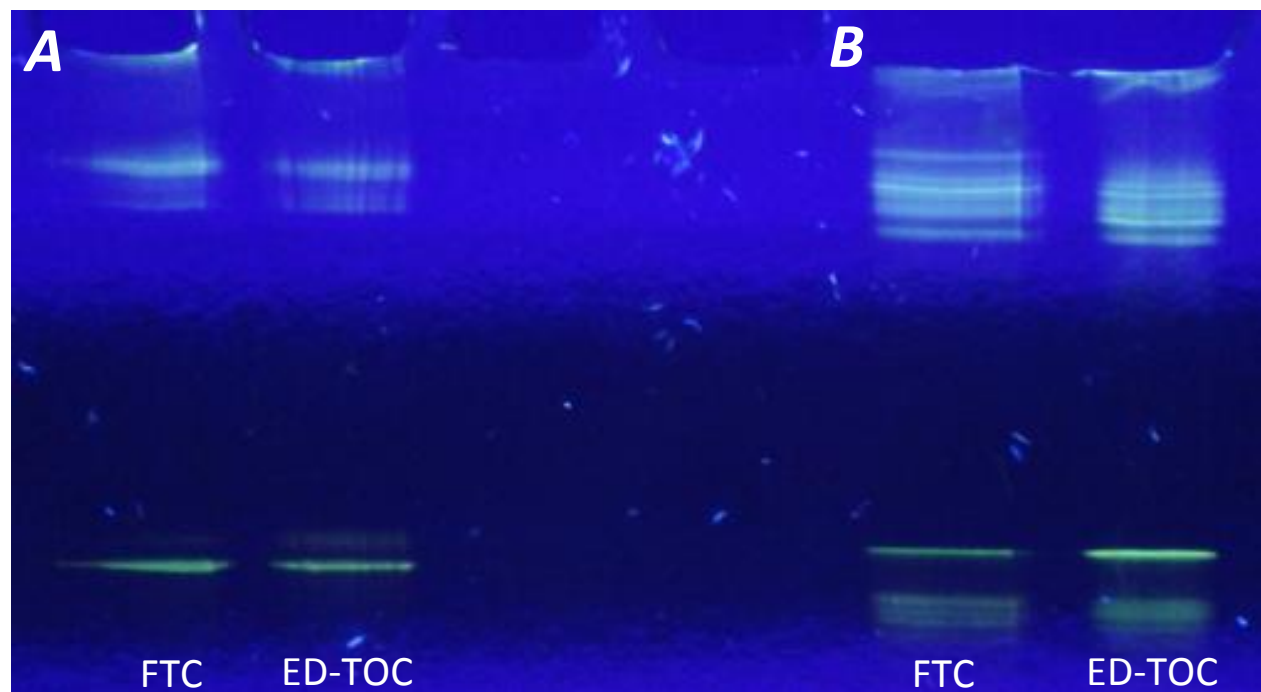


Figura 7.16. DGGE del ADN obtenido de los gránulos aerobios. Se muestra el patrón de bandeo para las estrategias FTC y ED-TOC con el set de primers TX9F, 1391R (A), el fragmento corresponde al amplicón de aproximadamente 600 pb. Se muestra el patrón de bandeo para las estrategias FTC y ED-TOC con el set de primers 46F, 534R (B), el fragmento corresponde al amplicón de aproximadamente 500 pb. Después de la PCR con los diferentes primers se juntaron las muestras 1-5 correspondientes a la operación FTC y las muestras 6-9 correspondientes a la operación ED-TOC.

9.11. Clasificación taxonómica y análisis filogenético de la librería de clonas

Una vez creadas las librerías de clonas a partir del segmento del 16S ARNr del material genético granular obtenido de ambas estrategias, se recuperó el inserto clonado y se mandó a secuenciar. Las secuencias fueron recortadas y alineadas en el programa SeaView, y posteriormente, estas secuencias fueron clasificadas taxonómicamente en el Ribosomal Classifier en la página del RDP. A continuación se muestran los resultados de la clasificación taxonómica de los 43 OTUs que se obtuvieron con el clasificador (tabla 7.5).

Resultados

Tabla 7.5. Clasificación taxonómica de los 43 OTUs (secuencias consenso) obtenidas con el clasificador RDP. Se muestran la cantidad de secuencias correspondientes a cada OTU por reactor y en filas sombreadas se señalan los microorganismos con capacidad de degradación de 4-CF (*).

	FTC	ED-TOC	Filum	Clase	Orden	Familia	Género
OTU0	2	10	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Arthrobacter*
OTU7	0	1	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Arthrobacter*
OTU18	0	1	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Renibacterium
OTU24	1	0	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Acaricomes
OTU38	0	1	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Zhihengliuella
OTU34	1	0	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Arthrobacter
OTU11	1	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Oceanibulbus
OTU4	1	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus
OTU13	1	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Oceanibaculum
OTU22	1	1	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium
OTU15	1	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	Mesorhizobium
OTU27	3	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Devosia
OTU30	0	1	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Pelagibacterium
OTU16	1	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas*
OTU17	4	0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Erythrobacteraceae	Altererythrobacter
OTU10	0	1	Proteobacteria	Alphaproteobacteria			Geminicoccus
OTU33	1	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax
OTU29	1	7	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonas*
OTU41	0	1	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales		Xylophilus
OTU37	2	0	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Shinella
OTU21	1	0	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas*
OTU31	0	2	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Lysobacter
OTU42	0	1	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Ferruginibacter
OTU1	1	0	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Ferruginibacter
OTU2	1	1	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Terrimonas
OTU8	0	4	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Flaviumibacter
OTU12	0	1	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Sediminibacterium
OTU23	1	0	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Flaviumibacter
OTU28	2	0	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Flaviumibacter
OTU25	0	1	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Solitalea
OTU5	3	0	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Elizabethkingia
OTU35	0	3	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium
OTU9	1	4	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagaceae	Leadbetterella
OTU20	0	1	Bacteroidetes				Ohtaekwangia
OTU14	1	0	Bacteroidetes				Ohtaekwangia
OTU32	1	0	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	Verrucomicrobium
OTU36	0	2	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	Roseinmicrobium
OTU3	1	0	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Longilinea
OTU6	0	1	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	Bellilinea
OTU19	1	0	C. Saccharibacteria				Saccharibacteria
OTU26	0	1	C. Saccharibacteria				Saccharibacteria
OTU40	2	0	C. Saccharibacteria				Saccharibacteria
OTU39	1	0	Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira

9.11.1. Resultados de la clasificación taxonómica

De todos los OTUs que se encontraron en el reactor para ambas estrategias, se tuvieron 27 presentes cuando el reactor operó con la estrategia en FTC y 21 cuando se operó en la estrategia ED-TOC (figura 7.17 A). De estos OTUs que estuvieron presentes, solamente 5 fueron compartidos, mientras que los 38 restantes estuvieron distribuidos solo en una u otra estrategia.

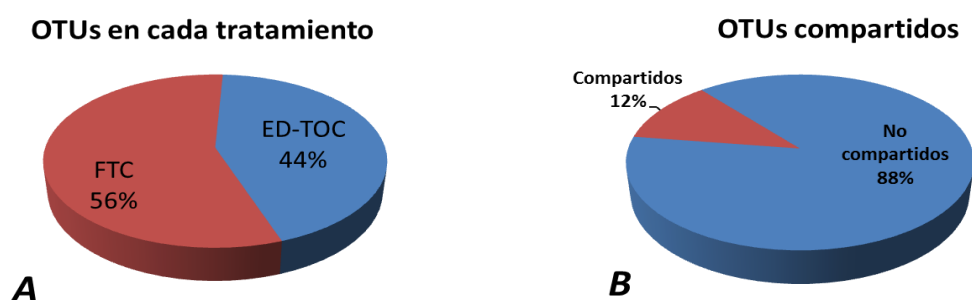


Figura 7.17. Distribución de los OTUs totales en el reactor cuando operó con las estrategias FTC (27 OTUs) y ED-TOC (21 OTUs) (A). OTUs compartidos (5) y no compartidos (38) por el reactor operando en las dos estrategias.

A partir de los 43 OTUs y de su clasificación obtenida en el RDP se realizó el análisis de los fila encontrados para cada estrategia. Para la operación en la estrategia FTC se encontraron un total de 7 fila, dentro de los cuales la mayoría correspondieron a *Proteobacteria* (11 OTUs), *Bacteroidetes* (7 OTUs) y *Actinobacteria* (3 OTUs) (figura 7.18 A). De estos fila se realizó el análisis de sus clases que se muestra en la figura 7.18 B.

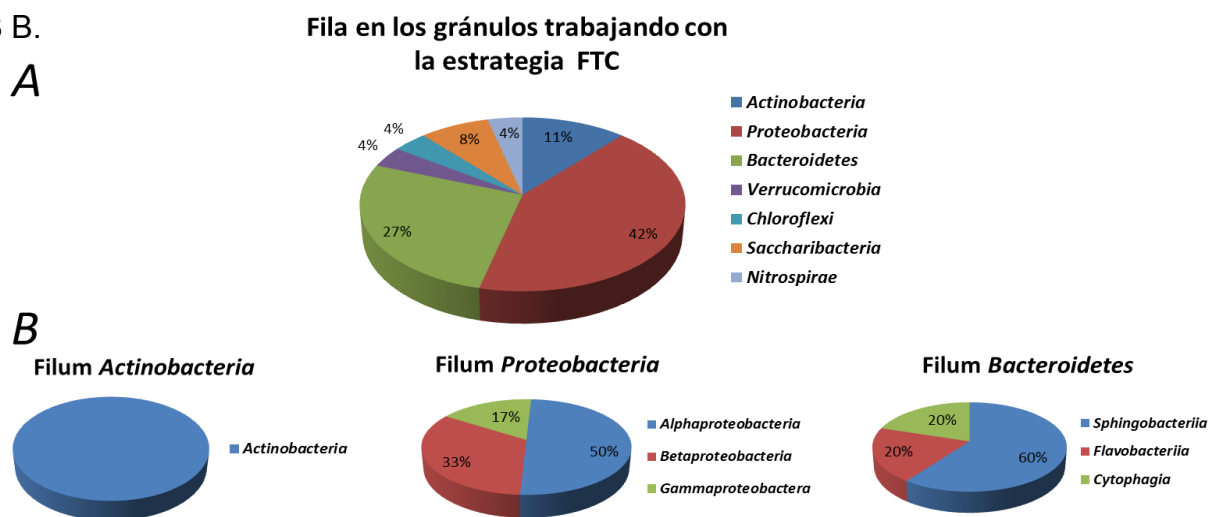


Figura 7.18. Principales fila encontrados en los gránulos aerobios en la estrategia FTC (A). Se realizó el análisis de los órdenes de los microorganismos encontrados de los tres Filas principales (B).

Para el reactor trabajando en la estrategia ED-TOC se encontraron 6 fila; con una predominancia de los fila *Bacteroidetes* (8 OTUs), *Proteobacteria* (6 OTUs), y *Actinobacteria* (3 OTUs) (figura 7.19 A). De estos fila principales se realizó el análisis de sus clases (figura 7.19 B)

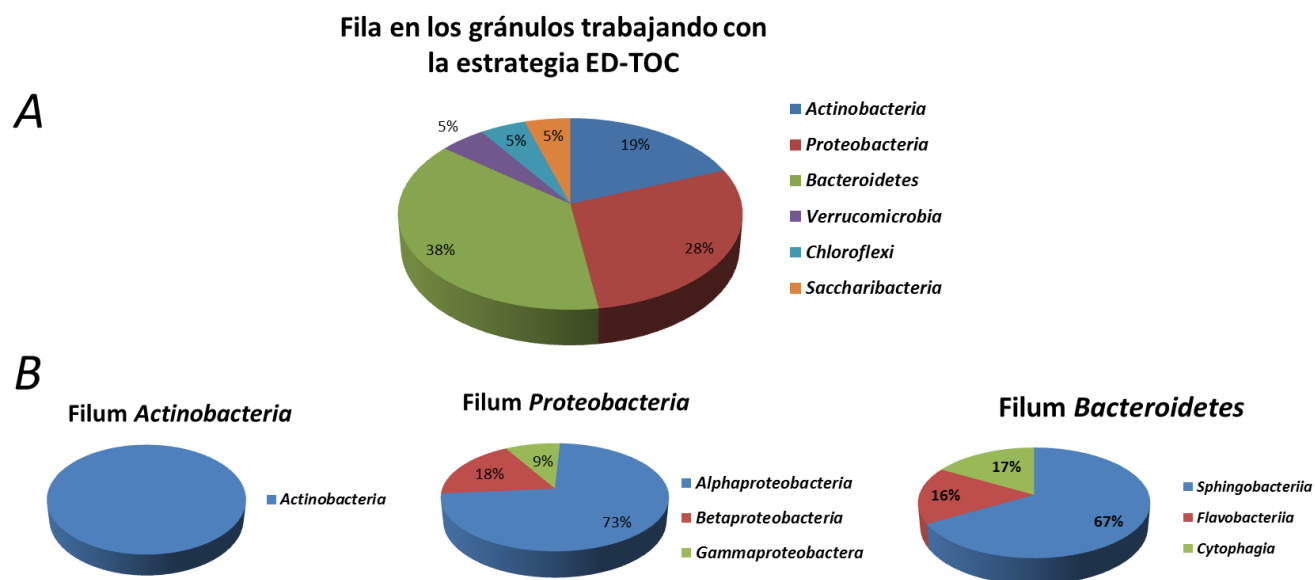


Figura 7.19. Principales fila encontrados en los gránulos aerobios en la estrategia ED-TOC (A). Se realizó el análisis de los órdenes de los microorganismos encontrados de los tres fila principales (B).

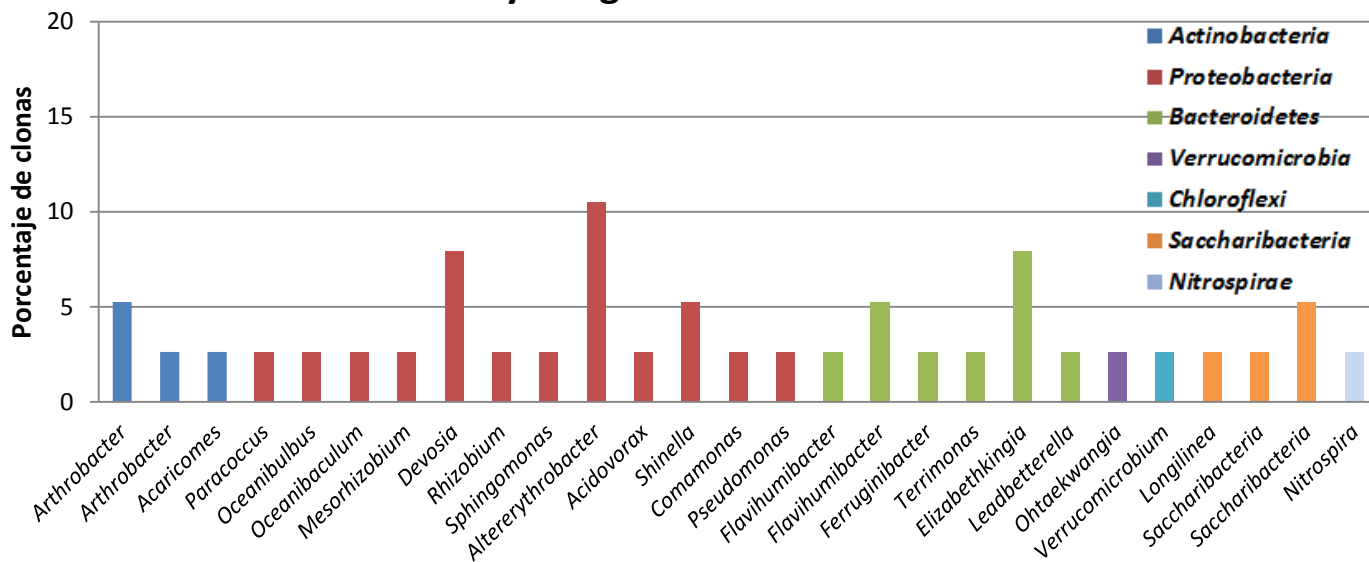
9.11.2. Microorganismos en las estrategias FTC y ED-TOC

Una vez realizado el análisis por fila y orden de los OTUs encontrados en los gránulos aerobios del reactor trabajando en las estrategias FTC y ED-TOC, se prosiguió a realizar el análisis por géneros y número de clonas que correspondieron a estos OTUs. Para los gránulos de la estrategia FTC se tuvieron un total de 37 clonas y para los gránulos en la estrategia ED-TOC se tuvieron 46 clonas.

La figura 7.20 muestra la distribución de los géneros y el número de clonas que se encontraron en la biomasa granular trabajando con la estrategia en FTC. Se encontraron un total de 7 fila y 27 géneros bacterianos. Para realizar una comparación con lo obtenido a partir del análisis de distribución de los fila encontrado a con los OTUs, se realizaron los análisis de cómo estuvieron distribuidas las clonas en los 7 fila encontrados, y a los principales fila que fueron *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* se les realizó el análisis de los órdenes (figura 7.20 B). Para el filum *Actinobacteria* este

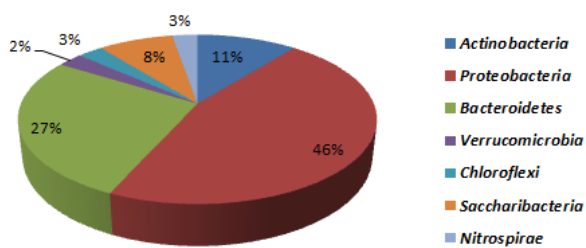
análisis se omitió dado que todas las secuencias correspondieron a la misma clase, orden e incluso a la misma familia.

Clonas y sus géneros en el reactor FTC

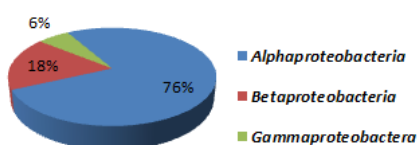


B

Porcentaje de clonas por filum en la estrategia FTC



Clases en el filum Proteobacteria



Clases en el filum Bacteroidetes

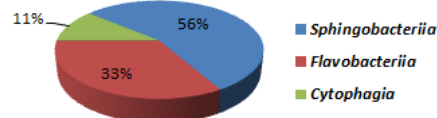


Figura 7.20. Número de clonas y géneros a los que correspondieron los microorganismos encontrados en los gránulos aerobios trabajando con la estrategia FTC; se realizó una agrupación de las barras por colores para mostrar el filum al que pertenece cada género. De algunos microorganismos se obtuvo la clasificación hasta especie, tal es el caso del Arthrobacter en la primer columna, que corresponde a Arthrobacter chlorophenolicus (A). Porcentaje de distribución de las clonas por filum en los gránulos. Se realizó el análisis de clases en los fila Proteobacteria y Bacteroidetes (B).

La figura 7.21 muestra la distribución de los géneros y el número de clonas que se encontraron en la biomasa granular trabajando en el reactor con la estrategia ED-TOC. Se tuvieron un total de 6 fila y 21 géneros bacterianos. Se realizó el análisis de las clases de los fila *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. Al igual que para la estrategia FTC, en

la estrategia ED-TOC no se realizó el análisis del filum *Actinobacteria* dado que los microorganismos que estuvieron en este compartieron la misma clase, orden y familia.

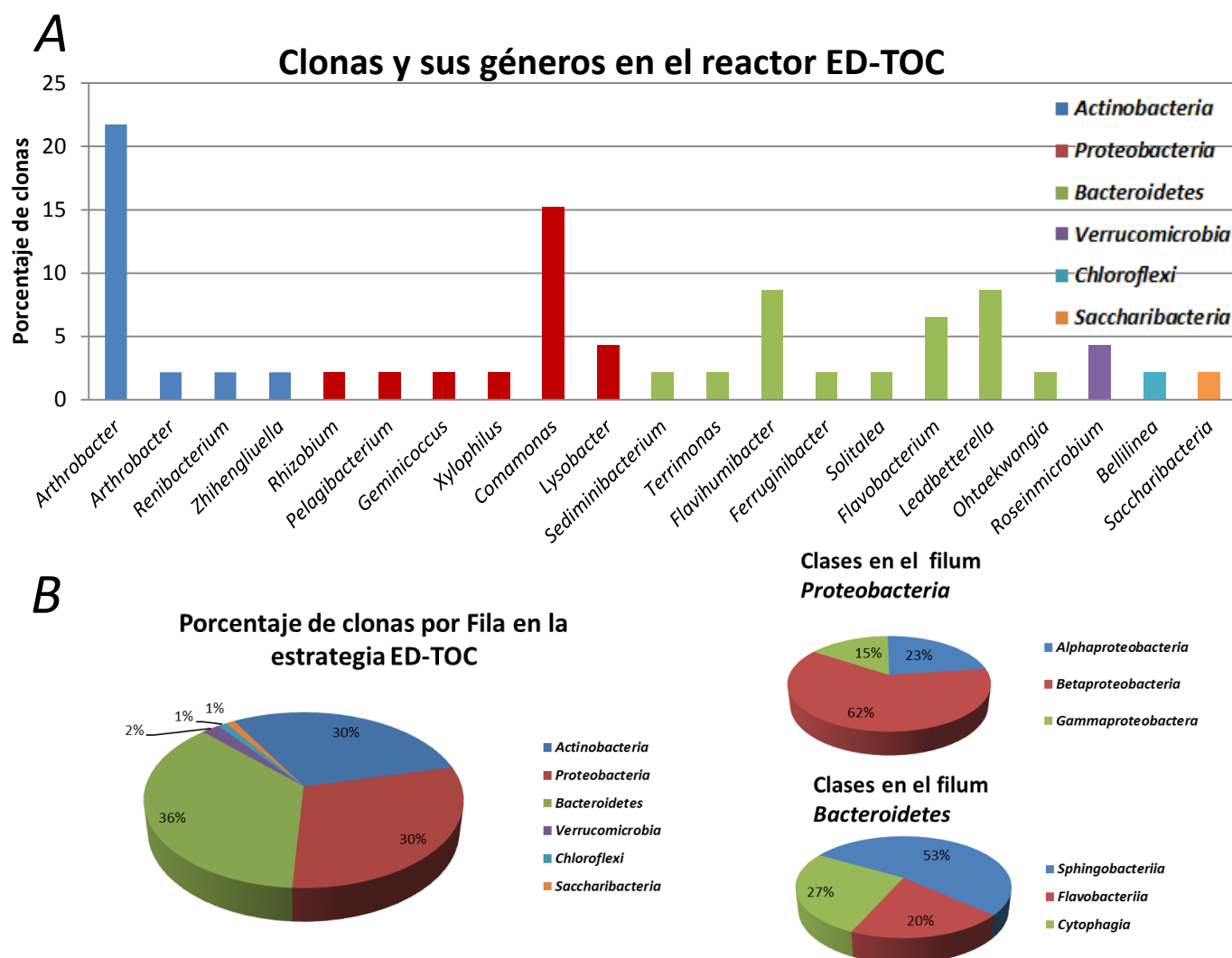


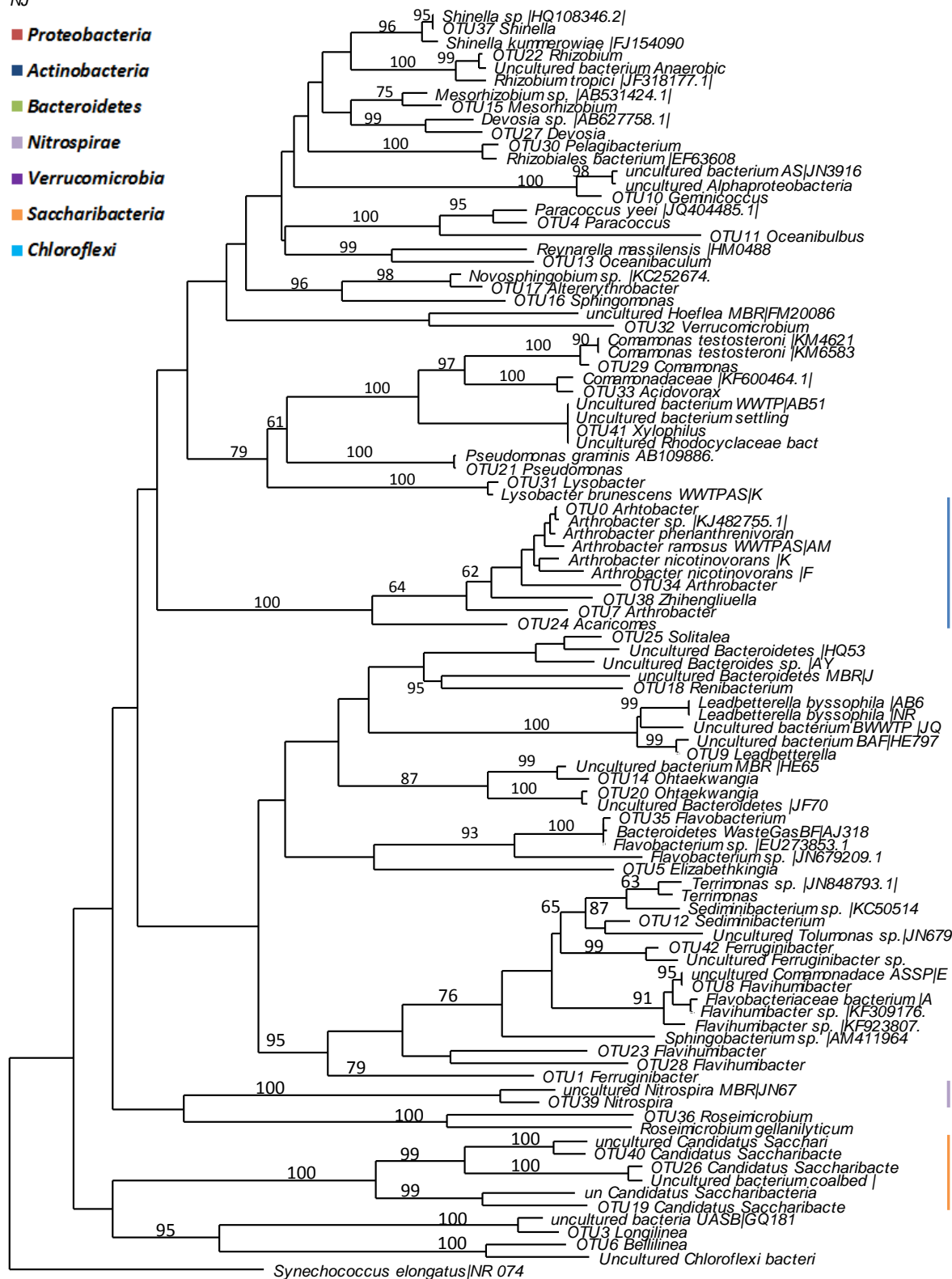
Figura 7.21. Número de clonas y géneros a los que correspondieron los microorganismos encontrados en los gránulos aerobios trabajando con la estrategia ED-TOC; se realizó una agrupación de las barras por colores para mostrar el filum al que pertenece cada género. De algunos microorganismos se obtuvo la clasificación hasta especie, tal es el caso del *Arthrobacter* en la primer columna, que corresponde a *Arthrobacter chlorophenolicus* (A). Porcentaje de distribución de las clonas por filum en los gránulos. Se realizó el análisis de clases en los fila Proteobacteria y Bacteroidetes (B).

9.11.3. Árbol filogenético

La figura 7.22 muestra el árbol filogenético que se realizó utilizando el método de distancia Neighbour Joining con el modelo Kimura, 2 parámetros, con un valor de bootstrap de 100.

NJ

- Proteobacteria
- Actinobacteria
- Bacteroidetes
- Nitrospirae
- Verrucomicrobia
- Saccharibacteria
- Chloroflexi



OTU	FTC	ED-TOC
OTU37	●	●
OTU22	●	●
OTU15	●	●
OTU27	●	●
OTU30	●	●
OTU10	●	●
OTU4	●	●
OTU11	●	●
OTU13	●	●
OTU17	●	●
OTU16	●	●
OTU32	●	●
OTU29	●	●
OTU33	●	●
OTU41	●	●
OTU21	●	●
OTU31	●	●
OTU0	●	●
OTU10	●	●
OTU7	●	●
OTU24	●	●
OTU25	●	●
OTU18	●	●
OTU9	●	●
OTU14	●	●
OTU20	●	●
OTU35	●	●
OTU5	●	●
OTU12	●	●
OTU42	●	●
OTU8	●	●
OTU23	●	●
OTU28	●	●
OTU39	●	●
OTU36	●	●
OTU40	●	●
OTU26	●	●
OTU19	●	●
OTU3	●	●
OTU6	●	●

— 0.01 substitutions/site

Figura 7.22. Árbol filogenético basado en las secuencias del fragmento de 800 pb a 1400 pb del gen 16S rRNA, se utilizaron secuencias obtenidas de los gránulos aerobios trabajando en las dos estrategias y secuencias de referencia de NCBI (se muestran los número de acceso). Para el alineamiento múltiple se utilizó el algoritmo de muscle, los valores de bootstrap están basados en 100 repeticiones. *Synechococcus elongatus* se utilizó como outgroup. En la columna de la derecha se muestra en qué estrategia se encontró cada microorganismos.

9.12. Tabla resumen

Tabla resumen				
Prueba	FTC	EDTOC	Diferencia estadística	P
Porcentaje remoción 4-CF	99.81 +/- 0.03 %	99.81 +/- 0.09 %	No	<0.05
q_x [mg 4-CF/ gSSV·d]	1190 +/- 450	714 +/- 100	Sí	0.141
Sólidos totales en el reactor [g/L]	1.709 +/- 0.060	1.990 +/- 0.115	Sí	0.002
Sólidos totales volátiles en el reactor [g/L]	1.468 +/- 0.213	1.669 +/- 0.223	Sí	0.005
Carga orgánica [gDQO/gSSV·d]	0.499-0.833	1.171-1.953	-	-
Sólidos suspendidos totales en el efluente [mg/L]	25.9 +/- 0.6	53.2 +/- 10.9	Sí	<0.001
TRS [d]	45.6	9.4	N/A	N/A
Velocidad de sedimentación [m/h]	66.9 +/- 5.2	39.5 +/- 3.8	Sí	<0.001
IVL [mL/g]	137.2 +/- 18.6	64.0 +/- 6.6	Sí	<0.001
TECOt [mgO ₂ /gSSV ·h]	197 +/- 48	98 +/- 28	Sí	0.002
Tamaño de gránulo [cm]	0.64 +/- 0.04	0.56 +/- 0.06	Sí	0.025
Coficiente de integridad [%]	98.0 +/- 0.6	98.4 +/- 0.7	No	<0.05
EPS [mg/gSSV]				
Proteínas solubles	14.3 +/- 8.9	8.8 +/- 4.5	No	<0.05
Carbohidratos solubles	6.3 +/- 7.7	4.0 +/- 1.4	No	<0.05
Proteínas ligadas	186.8 +/- 51.7	178.6 +/- 50.3	No	<0.05
Carbohidratos ligados	23.6 +/- 14.8	15.3 +/- 7.3	No	<0.05
Actividad deshidrogenasa [mgINFT/gSSV]	-----	15.1 +/- 2.5	N/A	N/A

10. DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó si existieron o no cambios en la comunidad bacteriana de gránulos aerobios que degradaban aguas inhibitorias con 4-CF cuando se modificó la forma de operación del reactor en el que se encontraban. Para esto se llevó a cabo el seguimiento de la biomasa de los gránulos aerobios cuando el reactor se mantuvo trabajando en la forma usual de operación de un SBR (estrategia FTC), y cuando la biomasa fue sometida a trabajar constantemente en la mayor tasa de crecimiento (μ_{max}), debido a una estrategia de control que se aplicó al reactor (estrategia ED-TOC). Durante todo el periodo de operación fueron medidos y registrados los parámetros fisicoquímicos asociados al desempeño de la biomasa, y se tomaron muestras de los gránulos que al final fueron utilizadas para realizar pruebas de biología molecular — DGGE y librería de clonas/secuenciación — con las cuales se observó el efecto que tuvo la aplicación de la estrategia de control en la comunidad bacteriana de los gránulos aerobios.

El cambio en la comunidad lo pudimos observar desde dos pruebas y perspectivas diferentes. La primera es con relación a la DGGE, haciendo alusión de que la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante es una prueba de huella o trazado molecular, que como tal, es una metodología que busca ser rápida y de menor costo que un análisis más detallado ¹³, sin embargo esta prueba puede tener sesgos debido a que depende de los pasos de amplificación de la PCR previa, y ya que el ADN amplificado y estudiado fue un segmento del gen 16S ARNr, está la posibilidad de llegar a conclusiones incorrectas dado que el número de copias que se obtengan del fragmento amplificado está en función de la abundancia de los microorganismos, la cantidad de ARNr que tenga cada especie o la facilidad de los primers para hibridar con el sitio de unión en el gen, con lo que se podría dejar de ver a miembros que estén menos representados, que contengan poco ARNr o este sea de difícil acceso para los primers, por lo que en el gel se observarían solo los ribotipos más abundantes, que fue lo que sucedió.

Recordemos que se utilizaron dos sets diferentes de primers que cubrían dos regiones distintas del gen 16S ARNr, el set 46FGC-543R para las regiones

hipervariables 1, 2 y 3, y el set TX9-1391R para las regiones hipervariables 5, 6, 7 y 8 (figura 6.2). Para ambos tratamientos, los resultados fueron similares, mostrando la desaparición de un solo ribotipo cuando se pasó de la estrategia FTC a la estrategia ED-TOC. Para el set TX9-1391R la resolución entre las bandas fue menor, esto es debido a la similitud de los ribotipos y a que los primers no tenían la llamada “grapa” de GC, es decir extensiones de guanina/citosina que le dan más estabilidad a los amplicones cuando se corren en el gradiente de desnaturalización. Para el set 46FGC-534R, se observan más ribotipos en la operación en FTC, de 8 a 10 por la cercanía entre las bandas, y para la estrategia ED-TOC de 7 a 9 ribotipos, es decir un ribotipo menos, aunque para la estrategia ED-TOC se observa la intensificación de unas bandas, pero con estas imágenes no sería posible decir que existe un cambio en los microorganismos de los gránulos al pasar de una estrategia a otra.

Los resultados de la DGGE fueron contrastados con lo que se obtuvo para la librería de clonas y su consiguiente secuenciación, donde se presentaron resultados diferentes, desde la cantidad de géneros (que relacionaríamos con los ribotipos o las bandas de la DGGE) hasta la distribución de los mismos para las dos estrategias. Esto era de esperarse debido a que con la clonación se evita el problema relacionado al sesgo de la información debido a la amplificación del gen por la PCR, ya que todos los OTUs en especial los poco abundantes, tienen una menor posibilidad de ser excluidos del screening.

Con los resultados de la secuenciación observamos que dentro de todo el intervalo de operación, es decir con las dos estrategias, se encontraron un total de 43 géneros, de estos el 56% estuvieron en la estrategia FTC y un 44% en la estrategia ED-TOC, 11 % menos. De estos 43 géneros, solo el 12% estuvo compartido, lo que nos indica la variación de estos géneros dentro del reactor.

Al concluir lo anterior, se realizó el análisis taxonómico, arrojando resultados donde se observa que, para el reactor en FTC la predominancia de los fila fue: *Proteobacteria* (42%), *Bacteroidetes* (27%) y *Actinobacteria* (11%). Para el reactor en ED-TOC la predominancia de los fila fue: *Bacteroidetes* (38%), *Proteobacteria* (28%) y *Actinobacteria* (19%).

Para el reactor FTC, el análisis de las clases dentro de los fila mostró que en el filum *Actinobacteria* todos los microorganismos estaban en la clase *Actinobacteria*, de

hecho los microorganismos de este filum compartieron hasta familia. La clase dominante en el filum *Proteobacteria* fue *Alphaproteobacteria* (50%) y la clase dominante para el filum *Bacteroidetes* fue *Sphingobacteriia* (60%). Para el reactor ED-TOC, el análisis de las clases dentro de los fila mostró que en el filum *Actinobacteria* todos los microorganismos estaban en la clase *Actinobacteria*. La clase dominante en el filum *Proteobacteria* fue *Alphaproteobacteria* (73%) y la clase dominante en el filum *Bacteroidetes* fue *Sphingobacteriia* (67). Sin embargo el análisis pasado solo nos deja conocer la distribución de los fila de los microorganismos encontrados en los gránulos aerobios.

El siguiente paso fue realizar el análisis de la distribución de los 43 géneros encontrados con respecto a la clasificación taxonómica, encontrándose lo siguiente: para los gránulos del reactor trabajando en FTC hubo un dominio del filum *Proteobacteria* con el 47% de las clonas (18), y dentro de este filum predominó la clase *Alphaproteobacteria* con el 72%, lo que no es de sorprender debido a que las proteobacterias son un filum de microorganismos con una amplia diversidad metabólica¹⁶, en estudios realizados en reactores degradando fenoles se encontró que el filum dominante fue *Bacteroidetes* seguido por el filum *Proteobacteria*⁷⁴, sin embargo a diferencia de lo que encontramos, no se había observado una predominancia de *Alphaproteobacteria* sino de *Betaproteobacteria* y de *Gammaproteobacteria*, incluso para trabajos con gránulos aerobios degradando 4-CF³⁶. Los géneros de *Alphaproteobacteria* encontrados podrían estar debido a que, y como se discutirá más adelante, la granulación es un proceso donde participan bacterias que tiene ligandos en su superficie celular y bacterias con receptores —también en su superficie—, como lo son microorganismos como *Paracoccus*, *Oceanibulbus*, *Oceanibaculum* o *Pseudomonas*⁹³. Dentro de las *Alphaproteobacteria* encontramos también a los *Rhizobiales* y a los *Sphingomonadales* que contribuyen a la producción de EPS⁹⁴, y dentro de estos se ha reportado a *Sphingomonas* (*S. chlorophenolica*)⁹⁵ como degradadora de clorofenoles. Para *Altererythrobacter*, por la cantidad de clonas encontradas, cabría la posibilidad de que este microorganismo tuviera capacidad de degradación de 4-CF. Dentro de los *Burkholderiales*, que son bacterias filamentosas halladas dentro de gránulos poco densos⁹⁶, encontramos a *Comamonas* que es un microorganismo con capacidad de degradación de 4-CF (*C. testosteroni*)⁹⁷. Los

Rhizobiales (*Mesorhizobium*, *Devosia* y *Rizhobium*) y los *Rhodocyclales* (*Shinella*) han sido reportados como microorganismos que aumentan la granulación⁹⁶. De igual manera que con *Altererythrobacter*, la cantidad de *Devosia* es un hecho que indica que podría tener la capacidad de degradación de 4-CF. Para el filum *Bacteroidetes*, que representó el 27% de las clonas, encontramos que los *Sphingobacteriales* han sido reportados como consumidores de EPS, por lo que forman un sistema de consumo/producción de EPS con los otros microorganismos granulares⁹⁴. En el filum *Actinobacteria* (11% de las clonas) encontramos a *Arthrobacter* y géneros muy relacionados, es decir compartiendo, clase, orden y familia. *A. chlorophenicus* tiene capacidad probada para la degradación de 4-CF⁹⁸, por lo que los otros microorganismos encontrados en este filum, podrían tener la misma capacidad metabólica.

Para los gránulos del reactor en la estrategia ED-TOC se observó un cambio en la distribución tanto en la primer análisis —de los porcentajes de los fila encontrados— como en el segundo —de los porcentajes de las clonas en cada fila—. En el análisis de los fila, encontramos una dominancia de *Bacteroidetes* (38%), seguido de *Proteobacteria* (28%) y *Actinobacteria* (19%). La clase predominante en *Proteobacteria* fue *Alphaproteobacteria* (73%), para *Bacteroidetes* fue *Sphingobacteriia* (67%), y en el filum *Actinobacteria* los géneros encontradas compartieron clase, orden y familia.

Los resultados que más llaman la atención son los observados para la distribución de las clonas en la clasificación taxonómica, ya que se aprecia un cambio con relación a la comunidad de la biomasa trabajando con la estrategia FTC. El filum que predominó fue el de *Bacteroidetes* con 36% —vs 37% en la operación FTC—, y *Proteobacteria* que había constituido casi el 50% de las clonas en FTC, pasó a tener el 30% de las clonas en ED-TOC. Por su parte el filum *Actinobacteria* pasó de tener el 11% de las clonas en FTC, al 28% del total en ED-TOC.

Cuando se realiza el análisis por los géneros de los microorganismos, es más fácil comprender el cambio observado en la comunidad. En la operación FTC se tiene una mayor diversidad (7 fila y 27 géneros) que en la operación ED-TOC (6 fila y 21 géneros), perdiéndose géneros en la operación ED-TOC, principalmente de las *Alphaproteobacteria*, correspondientes a los órdenes de las *Rhodobacterales*, *Rhodospirales* y *Sphingomonadales*, que como se discutió anteriormente sus

principales roles son la producción de EPS y la participación en el proceso de granulación debido a los receptores lectina que tienen⁹⁴, la reducción en estos microorganismos puede ser debida a que el TRS se redujo para la estrategia ED-TOC, o que el aumento en la cantidad de 4-CF haya provocado la muerte de estos. En la operación ED-TOC, también es notorio el aumento de las clonas de *Comamonas*, que es una *Betaproteobacteria* del orden de los *Burkholderiales*, que como se comentó es un microorganismo degradador de 4-CF⁹⁷. Un aumento similar se observa en el filum *Actinobacteria*, donde el género *Arthrobacter* representa solo por sí mismo el 21% de las clonas en el reactor ED-TOC, cuando en el reactor FTC era solo el 5%, este aumento que se dio por la capacidad de degradación de 4-CF que tiene esta bacteria (*A. chlorophenolicus*)^{66,98}, y por ende la selección que tuvo con la nueva estrategia. El filum *Bacteroidetes* aumentó 9% en la operación ED-TOC respecto a la operación FTC, pero se conservaron los órdenes *Sphingobacteriales* y *Chytophagales*, que son consumidores de EPS y que forman el ya mencionado sistema de producción/consumo de EPS con bacterias del orden de los *Rhizobiales*.

La discusión acerca del cambio en la comunidad bacteriana se va a cerrar con el análisis del árbol filogenético. El árbol arrojó siete grupos (clusters) cercanos, correspondientes a los 7 fila encontrados, esto nos dice que aún y cuando hay un cambio a nivel de género en los microorganismos, con un aumento notable en los microorganismos degradadores de 4-CF para el reactor ED-TOC, en general hay una relación filogenética estrecha, por lo que en el sistema granular, se conserva la actividad metabólica, estructural y funcional, que es justamente lo que se discutirá en más adelante.

En cuanto a la degradación de 4-CF se encontró que el reactor removió más del 99.5% del tóxico sin importar el tipo de operación (FTC o ED-TOC), hallándose menos de 0.5 mg/L de 4-CF en el efluente. En México no existe una norma que regule la cantidad de este tóxico que pueda ser liberada al medio ambiente. La OMS establece como máximo permitido 1 mg/L de fenol en agua para consumo humano⁹⁹. Sin embargo se sugeriría un tratamiento posterior para eliminar las trazas del tóxico.

Al realizar la comparación de las cinéticas de remoción el resultado fue diferente al esperado. Al saber que los microorganismos estarían trabajando en la mayor tasa de crecimiento microbiano y por tanto en la mayor actividad metabólica, se esperaba que

la q_x de la biomasa en el reactor ED-TOC (714 mg_{4-CF}/g_{SSVd}) fuera mayor a la del reactor con la estrategia en FTC (1190 mg_{4-CF}/g_{SSVd}). En cambio se encontró que la q_x del reactor FTC fue 66% mayor al reactor ED-TOC. La clave de este resultado podría estar en la variación de la actividad metabólica y/o de los parámetros cinéticos en la biomasa, que como se observó con el análisis molecular sufre un cambio. Específicamente, el parámetro que variaría es la tasa de crecimiento (μ_{max}), se ha reportado que cuando un sistema de lodos activados es expuesto a cargas de choque de compuestos tóxicos pueden existir cambios en los valores de los parámetros cinéticos¹⁰⁰; saber qué es lo que está ocurriendo con este parámetro en la biomasa granular en contacto con el 4-CF sería un nuevo punto para investigar. No existen muchos reportes al respecto, sin embargo Okaygun *et al.*¹⁰⁰ reportaron el estudio de los efectos en los parámetros cinéticos al alimentar pulsos de un sustrato inhibitorio (fenol), y solo observaron cambios en las constantes medias de afinidad (K_s) y de inhibición (K_i). Resultados preliminares de respirometría dinámica (anexo 1) revelaron una diferencia en ambas constantes entre las dos estrategias, observándose una menor K_s en los gránulos ED-TOC, es decir mayor afinidad por el 4-CF al estar constantemente en contacto con este, que correlaciona con el aumento de los microorganismos degradadores, aunque se observó un valor más grande de la K_i para la estrategia FTC, mismo que lo relacionamos con las concentraciones de 4-CF a las que está sujeta la biomasa, recordando que para la estrategia ED-TOC el valor máximo de concentración de 4-CF que se llega a encontrar en el licor mezclado rondó en los 50 mg/L, mientras que para la estrategia FTC la concentración de 4-CF alcanzó valores mayores a los 200 mg/L.

Este punto de las concentraciones y de la tasa de degradación específica es de suma importancia, ya que podría dar paso a una confusión acerca del funcionamiento de la estrategia de optimización, debido a que se nota que el desempeño fue mejor en el modo de operación FTC o “normal”. Lo que se debe de resaltar es que para estas concentraciones de 4-CF se observa una mayor tasa de degradación de 4-CF en la estrategia FTC porque no se ha sobrepasado una concentración tóxica. Se ha reportado que concentraciones mayores a 500 mg/L dentro del reactor causan la inhibición y/o muerte de la biomasa^{22,23}, valores que no se alcanzaron en este estudio, pero que la estrategia ED-TOC soporta sin ningún problema^{3,4,11}.

Para la degradación de 4-CF se han reportado diferentes tasas de degradación. Buitrón *et al.*⁶⁹ reportaron una tasa de degradación de 784 mg_{4-CF}/g_{SSVd} muy similar a la obtenida para la operación en ED-TOC (714 mg_{4-CF}/g_{SSVd}) pero debajo de la estrategia FTC (1190 mg_{4-CF}/g_{SSVd}), sin embargo la biomasa utilizada en el estudio de Buitrón *et al.* trabajaba con concentraciones de 4-CF en el reactor de 30 mg/L, casi 7 veces menos de lo que estaba en el reactor FTC.

En cuanto a degradación de 4-CF con estrategias de control, Buitrón *et al.* utilizaron una estrategia basada en la medición de la concentración de oxígeno disuelto en el licor mezclado. Utilizando biomasa previamente aclimatada a 4-CF en una concentración de 200 mg/L, encontraron una tasa de degradación específica que iba de los 720-1440 mg_{4-CF}/g_{SSVd}, sin embargo picos de 4-CF de 800 mg/L causaron el cese de la actividad metabólica de los microorganismos. En otro estudio, Moreno & Buitrón⁷⁰ buscaron las diferencias que se producían en la tasa de degradación de 4-CF, dependiendo de la estrategia de aclimatación de la biomasa y el inóculo utilizado, encontraron que las tasas de degradación iban desde los 840 hasta los 1392 mg_{4-CF}/g_{SSVd} con las variables óptimas, valores similares a lo encontrado en el presente trabajo de investigación con las operaciones FTC y ED-TOC. En cuanto a biomasa fija Moreno-Andrade *et al.*²² al estudiar los efectos de los periodos de ayuno y de cargas de choque en un SBR de lecho fluido, encontraron tasas de degradación de 4-CF por parte de la biomasa adherida a los soportes que iban desde los 588 hasta los 732 mg_{4-CF}/g_{SSVd}.

Para granulación aerobia no existen muchos reportes de remoción de 4-CF, Carucci *et al.*²⁸ reportan porcentajes de remoción de 4-CF del 99-100% y tasas específicas de degradación de hasta 110 mg_{4-CF}/g_{SSVd}, aunque la biomasa granular que utilizaron llevaba a cabo un cometabolismo de 4-CF con acetato de sodio, lo que implicaría una comunidad bacteriana que no estuviera totalmente especializada en la degradación de 4-CF. Arellano-Badillo⁹, quien también trabajó con granulación aerobia, reporta remociones de 4-CF de 2088 mg_{4-CF}/g_{SSVd}, es decir un 75% más de lo encontrado para el reactor FTC y 192% más que la operación en ED-TOC, cabe señalar que los gránulos de Arellano-Badillo tuvieron el mismo proceso de aclimatación que los utilizados para esta tesis, y trabajaron en el modo de operación en FTC con

tiempos mínimos de ciclo de 2.5 h y con concentraciones de 4-CF en el licor mezclado de 200 mg/L.

Con estos datos podemos concluir que el reactor que se utilizó en esta tesis degradó 4-CF de manera adecuada tanto para la estrategia FTC, como para la estrategia ED-TOC. La estrategia FTC puede proporcionar una mayor tasa de degradación de 4-CF a concentraciones no inhibitorias, aunque hay que mencionar que en el agua residual de proceso es muy difícil controlar la concentración de salida del tóxico o las cargas de choque, que en una operación del tipo FTC causaría la inhibición o la muerte de la biomasa y el paro del reactor²², en cambio aunque la operación ED-TOC presenta una tasa de degradación menor que la operación FTC a concentraciones no inhibitorias, ha demostrado soportar influentes con una concentración de 4-CF de 800 mg/L⁴ sin tener consecuencias en el proceso ni en la biomasa, debido a que las concentraciones dentro del reactor no eran mayores a 50 mg/L.

El reactor se trabajó a una concentración de sólidos totales de 1.709 +/- 0.060 g/L en la estrategia FTC y de 1.990 +/- 0.0115 g en la estrategia ED-TOC, de los cuales el 85 y el 83% correspondieron a los sólidos totales volátiles, quedando un 15-17% de sólidos inorgánicos, valor reportado para los procesos biológicos como los lodos activados².

La OLR utilizada en el reactor con las diferentes estrategias fue de 0.499-0.833 y de 1.171-1.953 g_{DQO}/g_{SSvd} para la estrategia FTC y ED-TOC respectivamente. El aumento en la OLR para el reactor ED-TOC fue debido al aumento en el número de ciclos que realizó por día. Para sistemas de lodos activados de mezcla completa, los valores de OLR reportados son de 0.2-0.6 g_{DBO}/g_{SSvd} , sin embargo observamos que el consumo de oxígeno se reporta en cantidades de DBO^2 , que por lo general son menores a la DQO, en cambio el 4-CF lo estamos reportando como DQO. Por lo tanto la carga utilizada por el sistema SBR es mayor que el que se podría utilizar en un sistema de lodos activados.

Los sólidos suspendidos en el efluente fueron 25.9 +/- 0.6 y 53.2 +/- 10.9 mg/L para las estrategias FTC y ED-TOC respectivamente. Según la NOM-001-SEMARNAT-1996¹⁰¹, por las cantidades de sólidos suspendidos en el efluente del reactor FTC, este podría ser vertido en cualquier cuerpo receptor de aguas del dominio público de la nación sin ningún problema, mientras que el efluente del reactor ED-TOC no podría ser

vertido en ríos donde se busque la protección de vida acuática (límite máximo SST 40 mg/L) o en embalses naturales y artificiales que tengan un uso público urbano. En cuanto al aumento en la cantidad de sólidos suspendidos en el efluente del reactor en ED-TOC, al haber una mayor cantidad de ciclos existe un aumento de los sólidos suspendidos. El reactor en ED-TOC —que llevaba a cabo 8 ciclos diarios— presentó un valor mayor (53.2+/-10.9 mg/L) al reportado por Arellano-Badillo¹⁰² de 43.8 +/- 15.2 mg/L. Carucci *et al.*^{28,103} reporta valores de SST en el efluente de 30 a 70 mg/L para gránulos aerobios co-metabolizando 4-CF con acetato de sodio, argumentando que el bajo valor en los sólidos suspendidos es debido a que mayores concentraciones de 4-CF provocan una mayor compactación de la biomasa granular, haciendo gránulos más densos. En el reactor con la estrategia FTC las concentraciones de 4-CF llegan a ser mayores a 200 mg/L, mientras que en la estrategia ED-TOC las concentraciones son 4 veces menores. Microbiológicamente podemos decir que los microorganismos del orden de los *Burkholderiales* como lo es *Comamonas*, que tuvo un notable aumento en el reactor ED-TOC tienen crecimiento filamentosos, lo que también podría explicar el aumento de SST en el efluente.

El tiempo de retención de sólidos (TRS) es uno de los parámetros de diseño y operación más importantes en el proceso de lodos activados^{2,104}. Un tiempo de entre 3-7 días es el recomendado para reducir la carga en materia orgánica, mientras que tiempos mayores de 7 días, son utilizados para tratamientos en los que se quiere hacer remoción de nutrientes como el nitrógeno². En los reactores granulares SBR que no tienen un control intencional de TRS, se han encontrado valores de TRS que varían en rangos de 2 hasta 40 d en el periodo de granulación, mientras que en SBR trabajando de manera estable se han reportado tiempos de 9 d¹⁰⁴. Hasta el momento hay muy pocos reportes del papel del TRS en el desempeño de la granulación aerobia. El reactor FTC tuvo un TRS 4.8 veces mayor al reactor ED-TOC, 45.6 días y 9.4 días respectivamente, esto se dio por el aumento en la cantidad de ciclos, sin embargo, el diferente TRS no afectó el desempeño del reactor, siguiendo con remociones mayores al 99.5% en ambas estrategias. En la comunidad microbiana, este cambio de TRS pudo tener un efecto lavando microorganismos de crecimiento más lento, aunque como se observó en el perfil de la DGGE, los principales ribotipos, o los más abundantes, se conservaron; con el análisis más detallado de la librería de clonas se encontró menor

diversidad bacteriana para la estrategia ED-TOC, aunque esta disminución también podría atribuirse a la presión de selección que representó la concentración constante de 4-CF dentro del reactor.

Como era de esperarse ambos gránulos presentaron velocidades de sedimentación mayores a lo reportado para lodos activados. Lodos activados de procesos comunes con velocidades de sedimentación de 3-4 m/h son considerados con excelente capacidad de sedimentación². En operación SBR se pueden lograr velocidades de sedimentación de lodos de hasta 11 m/h¹⁰⁵, para gránulos aerobios se han reportado velocidades de sedimentación de 25-70 m/h⁶, recordando que una alta velocidad de sedimentación aumenta la capacidad de retención de biomasa dentro del reactor, aumentando por lo tanto la capacidad de degradación del reactor, acortando el tiempo del ciclo SBR y haciendo más eficiente el proceso. Los gránulos del reactor tuvieron velocidades de sedimentación de 66.9±5.2 m/h en la estrategia FTC y de 39.5±3.8 m/h para la estrategia ED-TOC. La disminución en la velocidad de sedimentación en los gránulos —aún y cuando se mantienen dentro del intervalo reportado— nos indica una disminución en la densidad de la biomasa granular. La prueba de determinación de la densidad de los gránulos no fue realizada, pero sería conveniente en estudios siguientes hacer el monitoreo de este valor, al igual que realizar un estudio, sin la influencia de 4-CF, para determinar cuáles son los microorganismos implicados en el aumento de la capacidad de sedimentación dentro de este reactor. Las bacterias del orden de los *Actinomycetales* se han relacionado a la capacidad autoagregativa y coagregativa¹⁰⁶, recordando que este es un proceso mediado por proteínas adhesinas presentes en un microorganismos, que se complementan con receptores de tipo sacáridos en otros microorganismos. Se ha reportado que las *Proteobacterias*, son ricas en estos receptores¹⁰⁷. En ambos reactores hubo la presencia de *Actinomycetales*. *Arthrobacter* es un microorganismo con capacidad de degradar de 4-CF¹⁰⁷ y que también podría tener la capacidad de agregación. Existen reportes de la capacidad autoagregativa y agregativa de *Sphingomonas* con bacterias como *Paracoccus*, *Micrococcus* y *Pseudomonas*⁹³ microorganismos que se encontraron en el reactor FTC a diferencia del ED-TOC.

El IVL es una prueba que evalúa la capacidad de compactación del lodo, en el proceso de lodos activados. El rango que se maneja está entre los 80-150 mL/g, un

mayor valor indica que el lodo tiene poca edad y que hay crecimiento de organismos filamentosos, mientras que un IVL menor a 80 mL/g se puede decir que es de lodo viejo y se necesita aumentar el retiro de lodo^{2,108}. Para el lodo granular, este parámetro no es tan significativo como lo es para los lodos activados, ya que por la forma semi esférica de los gránulos, no es posible la total compactación de la biomasa así que su valor no nos da información para modificar el proceso. Para gránulos aerobios cultivados en acetato de sodio se reportan valores de 80-100 mL/g⁴⁹, para gránulos cometabolizando acetato de sodio con 4-CF se reportan valores de 65-80 mL/g¹⁰³. Para gránulos en condiciones similares a las que se tenían en este trabajo, Arellano-Badillo⁹ reportó valores de 46-56 mL/g, similar a los 64 mL/g del reactor ED-TOC, en el cual el TRS es mucho menor al FTC, lo que podría estar causando el aumento en IVL en la primer estrategia. En este estudio, no se puede relacionar el cambio de IVL con el desempeño en la degradación de 4-CF por los gránulos aerobios del reactor.

El tamaño de gránulo, también pudo haber afectado el valor del IVL, ya que en la estrategia FTC el tamaño fue de 0.64 +/-0.04 cm, 14% más grandes que en la estrategia ED-TOC, con un valor de 0.56 +/- 0.06 cm. Este decremento en el tamaño se relaciona a la concentración máxima de 4-CF que era alimentada en los ciclos del reactor. Se ha propuesto el aumento del tamaño granular como consecuencia al aumento en la concentración de un tóxico en el agua, es decir, siendo los gránulos de mayor tamaño, hay una menor difusión del contaminante y por lo tanto los niveles de 4-CF que llegarían a los microorganismos degradadores serían menores a los inhibitorios¹⁰³. Por otra parte, se ha sugerido que el tamaño granular pudiera ser un impedimento para la difusión de la materia orgánica y por lo tanto para la alimentación de los microorganismos, aunque hay reportes de gránulos de 2.6 cm de diámetro⁶ que trabajan correctamente. En el reactor ED-TOC se observaron gránulos con diámetros mayores a 1.4 cm, aunque el promedio está debajo de este valor (0.64 +/-0.04 cm para la operación FTC y 0.56 +/-0.06 cm para la operación ED-TOC), sin embargo para la degradación de 4-CF, el tamaño de gránulo no tuvo efecto en la degradación del tóxico.

Para la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO), en gránulos aerobios se ha reportado un rango de valores de 34-168 mg_{O2}/g_{SSV}h. Para biomasa floculenta degradando 4-CF a una concentración de 200 mg/L Buitrón *et al.*²³ reportaron valores de 100 mg_{O2}/g_{SSV}h, que aumentaron hasta 160 mg_{O2}/g_{SSV}h cuando se alimentó un pico

de 4-CF de 400 mg/L. En el presente estudio, los gránulos de la estrategia FTC presentaron una actividad respirométrica 2 veces mayor ($197 \pm 48 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{g}_{\text{SSV}}\text{h}$) en comparación con la estrategia ED-TOC ($98 \pm 28 \text{ mg}_{\text{O}_2}/\text{g}_{\text{SSV}}\text{h}$), este resultado correlaciona con la tasa de degradación de 4-CF encontrada (q_x) que fue mayor en el reactor FTC. Por otra parte, la relación TECO/q_x para el reactor FTC fue de $3.97 \text{ g}_{\text{O}_2}/\text{g}_{4\text{-CF}}$ y para el reactor en ED-TOC de $3.31 \text{ g}_{\text{O}_2}/\text{g}_{4\text{-CF}}$, esta relación es muy interesante debido a que señala que la biomasa en el reactor FTC tiene mayor capacidad de respiración (16% más) que la biomasa en ED-TOC, es decir, al estar en contacto con concentraciones mayores de 4-CF las vías metabólicas de degradación están más activas, habiendo una regulación que podría estar relacionada a la concentración de sustrato. Este comportamiento fue observado también en el estudio de Buitrón *et al.*³ donde se probaron dos estrategias de operación: VTC, control a tiempos variables y OB-TOC, control óptimo de tiempo dirigido por observador —que es la estrategia antecesora de la ED-TOC— y observaron que la TECO de la biomasa que utilizó la estrategia OB-TOC era menor a la VTC, donde la alimentación se hace en un solo pulso, similar a la FTC.

El coeficiente de integridad para los gránulos no mostró modificación alguna en las dos estrategias, siendo mayor al 97% en ambas. El coeficiente de integridad es un parámetro que nos permite conocer la fuerza con la que están unidos los gránulos, es decir, la biomasa estuvo muy bien compactada, lo que le permite a la biomasa granular soportar fuerzas de corte altas gracias a una capa que protege a los microorganismos. Dentro de este punto cabe señalar a las EPS, que son las sustancias poliméricas extracelulares, una matriz que rodea a los microorganismos, y que está compuesta por una mezcla de proteínas, carbohidratos, lípidos, material genético y sustancias húmicas, siendo las proteínas y carbohidratos el componente principal⁴⁰. En este estudio se cuantificaron las fracciones solubles y ligadas de proteínas y polisacáridos, y no se encontró diferencia estadísticamente significativa, aún y cuando se observa una pequeña disminución en las EPS de los gránulos de la estrategia ED-TOC. Para gránulos aerobios trabajando con 4-CF Arellano-Badillo *et al.*⁹ reportaron valores de 50 a $80 \text{ mg}_{\text{polisacáridos}}/\text{g}_{\text{SSV}}$ en la fracción ligada y de $1\text{-}4 \text{ mg}_{\text{polisacáridos}}/\text{g}_{\text{SSV}}$ en la fracción soluble. Los gránulos trabajados en las estrategias FTC y ED-TOC tuvieron valores en la fracción soluble muy similares (6.3 ± 7.7 y $4.0 \pm 1.4 \text{ mg}/\text{g}_{\text{SSV}}$), pero menores en

la fracción ligada (23.6 ± 14.8 y 15.3 ± 7.3), que era de esperarse ya que los gránulos del estudio de Arellano-Badillo eran gránulos recién formados. En el inicio de la granulación los carbohidratos sirven como material aglutinante, por lo que su concentración es mayor que en gránulos maduros, donde la fracción principal son las proteínas, que confieren la forma y dan estructura al esqueleto granular¹⁰⁹. Para el componente proteico, en la fracción soluble, los gránulos de la estrategia FTC tuvieron 14.3 ± 8.9 $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{gSSV}$, mientras que en el reactor ED-TOC tuvieron 8.8 ± 4.5 $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{gSSV}$, sin que se presentara diferencia estadísticamente significativa. Para la fracción ligada los gránulos del reactor FTC presentaron 86.8 ± 57.1 $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{gSSV}$ y los gránulos de la estrategia ED-TOC 178.6 ± 50.3 $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{gSSV}$, tampoco sin diferencias estadística significativas. Estos resultados se corroboraron al hacer la observación con la microscopia de fluorescencia y con la CLSM, donde se observa el esqueleto de proteínas rodeado por una capa de carbohidratos, y a los aumentos de 63X se observó a los microorganismos embebidos en una capa de proteínas, y la proteína rodeada con carbohidratos. Esta misma capa de EPS es la que complicó tanto el proceso de extracción del material genético, es tanta la cantidad de proteína que hay que remover, que las columnas de purificación que se encuentran en los kits de extracción comerciales se saturan sin poder retener las moléculas de ADN.

Para cerrar la discusión se harán algunas propuestas y recomendaciones que quedan abiertas para siguientes investigaciones.

Respecto al alcance del proyecto, se debe considerar el punto de que, aún y cuando se buscó tener a la biomasa del reactor en FTC lo menos activa metabólicamente, la estrategia solamente trabajó en la concentración de 4-CF de 200 mg/L, y que justamente es esta concentración a la que se atribuye que la biomasa de la estrategia FTC tenga tasas de degradación de 4-CF mayores que la estrategia ED-TOC. Sería recomendable realizar este estudio de nuevo con el reactor FTC trabajando en la concentración no inhibitoria de 4-CF de 50 mg/L y posteriormente trabajando a la concentración de 200 mg/L, pero con los tiempos de ciclo más cortos que se pudieran tener ($2 \frac{1}{2}$ h). De igual manera sería interesante recuperar la biomasa que se obtuvo de la operación en ED-TOC y ponerla a trabajar con la estrategia FTC tanto a concentraciones de 4-CF no inhibitorias (50 mg/L), como inhibitorias (200 mg/L).

De igual manera se debe tener muy presente que este estudio está basado en un modelo, es decir no es la realidad, pero a pesar de no estar apegado a un funcionamiento real, los datos que se obtienen son útiles, porque algunas de las situaciones que predice eventualmente se cumplirán. Y al respecto con lo anterior, el paso más importante para este modelo sería el estudio y aplicación, primero en aguas residuales con 4-CF, donde se tiene presencia de otros contaminantes, y observar cómo es dirigida la comunidad microbiana y por último la aplicación en aguas industriales contaminadas con 4-CF y otros compuestos fenólicos.

En torno al estudio molecular, lo primero por hacer es la purificación, reamplificación y secuenciación de las bandas de la DGGE, para conocer cuáles son los microorganismos que fueron resueltos por la electroforesis y que representan los OTUs más abundantes.

Este proyecto abre la idea de que la diversidad de la biomasa trabajando aguas residuales inhibitorias es mayor de la que se esperaba. Se consideró hacer una librería de 48 clonas para cada tratamiento, ya que en un estudio previo se contemplaban 8 OTUs diferentes³⁶, sin embargo, la clonación permitió ver mejor la diversidad en los gránulos aerobios, por lo que se podría clonar de nuevo y secuenciar un número mayor de clonas, por ejemplo 96 por tratamiento. Otro acercamiento que se puede hacer en torno a la biología molecular es con las tecnologías de nueva generación, como la pirosecuenciación o los Illumina I-tag, que dan una cantidad enorme de información de las secuencias, aunque para la reconstrucción filogenética, la clonación y la secuenciación Sanger capilar siguen siendo la mejor opción por el tamaño de fragmento que se puede analizar y por la fidelidad de la lectura, sin contar que el manejo, tratamiento y análisis de los datos obtenidos en una corrida de un secuenciador de nueva generación no es una tarea trivial y demanda personal, equipo y software calificado. Este punto abre la pregunta acerca de qué tan confiables o cercanos a la realidad son los estudios que se han publicado donde el DGGE y algunas técnicas de huella molecular son el estándar dorado para el seguimiento de reactores biológicos; sí en este modelo en el que se utilizó la DGGE se perdió de vista más del 50% de los OTUs presentes, en reactores como los metanogénicos y los productores de hidrógeno, la pérdida de consciencia de la diversidad podría ser del mismo porcentaje el problema, ¿y eso cuántos géneros representaría? Antes de utilizar las técnicas de huella

molecular sería conveniente realizar estudios a detalle de la diversidad y una vez se tengan estos resultados, saber a qué organismos corresponden las bandas encontradas en los patrones de bandeo en reactores que estén en estado estacionario.

Teniendo la información molecular, el siguiente paso es el diseño de sondas para FISH, que acoplado a la CLSM nos permitiría observar la ubicación exacta de los microorganismos en el gránulo, y si quisiéramos un estudio más a fondo, se podrían hacer inmunotinciones dirigidas a proteínas como las dioxigenasas para saber en dónde se lleva a cabo la degradación de 4-CF.

En cuanto a la microscopía, por limitaciones de tiempo, solo se pudo llevar a cabo la microscopía de fluorescencia y la CLSM, pero se hubieran obtenido muy buenas imágenes con microscopía electrónica de barrido, permitiéndonos observar detalladamente las bacterias en la estructura granular.

Los microorganismos encontrados en este estudio también forma parte de los aspectos a remarcar, con estos resultados, microorganismos como *Renibacterium* o *Zhihengliuella* que tienen una relación filogenética muy cercana a *Arthrobacter* se pueden proponer como posibles degradadores de 4-CF, y los demás encontrados como tolerantes a altas concentraciones del compuesto tóxico e inhibitorio. Sería interesante el tratar de aislarlos y comprobar estas hipótesis. Así como conocer la respuesta de los gránulos de la estrategia ED-TOC con una población más especializada, si se regresaran al trabajo en FTC.

Con todos estos puntos tratados, se debe comprender que el tratamiento biológico de aguas residuales, y sobre todo de las aguas industriales es un trabajo, del que si se quieren obtener los mejores resultados, se debe de hacer en un ambiente multidisciplinario, desde el diseño y puesta en operación de un reactor donde participan ingenieros, bioquímicos, químicos y demás, hasta los análisis a profundidad con microbiólogos, biólogos moleculares, bioinformáticos, etc.

Con este trabajo se abre la posibilidad de investigar nuevos microorganismos que degraden 4-CF, así como nuevos mecanismos que participan en la degradación de compuestos tóxicos, y dejar abierta una línea de investigación para la formación de más recursos humanos que trabajen en temas que tengan aplicación en la resolución de problemas no solo de interés nacional, sino mundial, como lo es el tratamiento de aguas.

11. CONCLUSIONES

- Se presentó una especialización en la comunidad bacteriana de los gránulos aerobios que operaron en la estrategia ED-TOC con relación a la comunidad bacteriana presente en los gránulos que operaron con la estrategia FTC. La comunidad de los gránulos ED-TOC fue menos diversa (6 fila y 21 géneros) en comparación con la comunidad de los gránulos FTC (7 fila y 27 géneros). Entre las dos comunidades solo se compartieron un total de 5 géneros de 43 encontrados lo que representa el 12% de los géneros totales.
- Para la estrategia FTC las clonas secuenciadas estuvieron distribuidas principalmente en los fila: *Proteobacteria* (46%), *Bacteroidetes* (27%) y *Actinobacteria* (13%). Para la estrategia ED-TOC las clonas estuvieron distribuidas en: *Bacteroidetes* (36%), *Proteobacteria* (30%) y *Actinobacteria* (30%).
- En la comunidad bacteriana de la estrategia ED-TOC, hubo un aumento en el porcentaje de microorganismos degradadores de 4-CF, como *Arthrobacter chlorophenolicus* —miembro del filum *Actinobacteria*, que pasó del 5% de las clonas en la estrategia FTC al 22% de las clonas de la estrategia ED-TOC— o *Comamonas testosteroni* —miembro del filum *Proteobacteria*, que pasó del 2% de las clonas en la estrategia FTC al 15 % de las clonas en la estrategia ED-TOC—. La otra parte de la comunidad, que fue constante para las dos estrategias, estaba conformada por *Sphingobacteriales*, *Cytophagales* —del filum *Bacteroidetes*—, *Rhizobiales*, *Rhodobacterales*, *Rhodospirales* y *Sphingomonadales* —del filum *Proteobacteria*—, que forman el sistema granular de producción/consumo de EPS.
- A pesar de los cambios a nivel de género que hubo en los microorganismos de los gránulos aerobios de una estrategia de operación a otra, el análisis filogenético demostró que ambas comunidades son filogenéticamente similares, por lo que la estructura granular y las actividades metabólicas y funcionales de la biomasa se conservan.

- Se registraron cambios en varios de los parámetros seguidos durante la operación del reactor con ambas estrategias. La tasa de degradación (q_x) de 4-CF y la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) fueron mayores en la estrategia FTC (66% y 101%, respectivamente), que se atribuye al cambio en las constantes cinéticas de la biomasa, en especial al cambio en la tasa máxima de crecimiento microbiano y a la constante de inhibición K_s . El tamaño de gránulo fue 14% más grande en la estrategia FTC que en la ED-TOC, debido a que el estar en contacto con concentraciones mayores de 4-CF provoca un aumento de la matriz de EPS. La velocidad de sedimentación de los gránulos FTC fue 69% mayor que la de los gránulos ED-TOC, debido a que en la segunda estrategia hubo una proliferación de microorganismos filamentosos como *Comamonas* (*Burkholderiales*) o *Arthrobacter* (*Actinomycetales*), que de igual manera se reflejó en el aumento de sólidos suspendidos en el efluente de la estrategia ED-TOC. Parámetros como la concentración de EPS y coeficiente de integridad no sufrieron modificaciones. Por último, el porcentaje de remoción de 4-CF fue similar para las dos estrategias. Sin embargo se debe recordar que se trabajó con un intervalo de concentraciones no tóxicas para la biomasa en FTC, que de haber sido mayores a 500 mg/L dentro del reactor hubieran ocasionado el cese de la operación del reactor.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. *Departamento de sanidad del estado de Nueva York. Manual de tratamiento de aguas negras.* Limusa: México, 2011.
2. Metcalf & Eddy, I.; Tchobanoglous, G.; Burton, F. L.; Stensel, H. D., *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse.* 4 ed.; McGraw Hill: 2002; p 1819.
3. Buitron, G.; Schoeb, M. E.; Moreno-Andrade, I.; Moreno, J. A., Evaluation of two control strategies for a sequencing batch reactor degrading high concentration peaks of 4-chlorophenol. *Water Research* **2005**, *39* (6), 1015-24.
4. Moreno-Andrade, I.; Buitrón, G.; Betancur, M. J.; Moreno, J. A., Optimal degradation of inhibitory wastewaters in a fed-batch bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2006**, *81* (4), 713-720.
5. de Kreuk, M. K.; Kishida, N.; van Loosdrecht, M. C., Aerobic granular sludge--state of the art. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* **2007**, *55* (8-9), 75-81.
6. Adav, S. S.; Lee, D. J.; Show, K. Y.; Tay, J. H., Aerobic granular sludge: recent advances. *Biotechnology Advances*, 2008/06/25 ed.; 2008; Vol. 26, pp 411-23.
7. Khan, M. Z.; Mondal, P. K.; Sabir, S., Aerobic granulation for wastewater bioremediation: A review. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **2013**, *91* (6), 1045-1058.
8. de Kreuk, M. K.; McSwain, B. S.; Bathe, S.; Tay, S. T.-L.; Schwarzenbeck, N.; Wilderer, P. A., *Discussion outcomes. Ede. In: Aerobic Granular Sludge.* IWA Publishing: 2005.
9. Arellano-Badillo, V. M.; Moreno-Andrade, I.; Buitrón, G., Effect of the Organic Matter to Ammonia Ratio on Aerobic Granulation during 4-Chlorophenol Degradation in a Sequencing Batch Reactor. *CLEAN--Soil, Air, Water* **2014**, *42* (4), 428-433.
10. Mace, S.; Mata-Alvarez, J., Utilization of SBR Technology for Wastewater Treatment: An Overview. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2002**, *41* (23), 5539-5553.
11. Moreno, J. A.; Betancur, M. J.; Buitron, G.; Moreno-Andrade, I., Event-driven time-optimal control for a class of discontinuous bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **2006**, *94* (4), 803-14.
12. Betancur, M. J.; Moreno, J. A.; Moreno-Andrade, I.; Buitrón, G., Practical optimal control of fed-batch bioreactors for the waste water treatment. *International Journal of Robust and Nonlinear Control* **2006**, *16* (3), 173-190.
13. Li, W.; Raoult, D.; Fournier, P. E., Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews* **2009**, *33* (5), 892-916.
14. Kirk, J. L.; Beaudette, L. A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J. N.; Lee, H.; Trevors, J. T., Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* **2004**, *58* (2), 169-188.
15. Kircher, M.; Kelso, J., High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **2010**, *32* (6), 524-36.
16. Madigan, M. T.; Martinko, J. M., *Brock Biología de los Microorganismos.* 10 ed.; Pearson Educación: Madrid, 2004.
17. Ferrer Polo, J.; Torrecillas Seco, A., *Tratamientos biológicos de aguas residuales.* 1 ed.; México, 2008.
18. Moreno Andrade, I. Biodegradación óptima de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial. UNAM, México, DF., 2006.
19. Denir, O.; Fatos, G. B.; Ozlem, K., *Industrial Wastewater treatment by Activated Sludge.* IWA Publishing: 2009.
20. CONAGUA Atlas Digital del Agua <http://www.conagua.gob.mx/atlas/usosdelagua31.html> (accessed 15 Diciembre).
21. INEGI Anuario estadístico y geográfico por entidad federativa 2013. http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/aepef/2013/AEGPEF_2013.pdf (accessed 23 agosto).

22. Moreno-Andrade, I.; Buitron, G.; Vargas, A., Effect of starvation and shock loads on the biodegradation of 4-chlorophenol in a discontinuous moving bed biofilm reactor. *Applied Biochemical Biotechnology* **2009**, *158* (1), 222-30.
23. Buitron, G.; Schoeb, M. E.; Moreno, J., Automated sequencing batch bioreactor under extreme peaks of 4-chlorophenol. *Water Science and Technology* **2003**, *47* (10), 175-81.
24. Singh, M.; Srivastava, R. K., Sequencing batch reactor technology for biological wastewater treatment: a review. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* **2011**, *6* (1), 3-13.
25. Mahvi, A., Sequencing batch reactor: a promising technology in wastewater treatment. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* **2008**, *5* (2).
26. Mayani, S. V.; Mayani, V. J.; Kim, S. W., Decomposition of 2-chlorophenol, 4-chlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol by catalytic oxidation over cobalt and nickel impregnated SBA-15. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **2013**, *91* (7), 1270-1280.
27. Huang, L.; Sun, Y.; Liu, Y.; Wang, N., Mineralization of 4-chlorophenol and analysis of bacterial community in microbial fuel cells. *Procedia Environmental Sciences* **2013**, *18* (0), 534-539.
28. Carucci, A.; Milia, S.; Cappai, G.; Muntoni, A., 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* **2010**, *177* (1-3), 1119-1125.
29. Lettinga, G.; van Velsen, A. F. M.; Hobma, S. W.; de Zeeuw, W.; Klapwijk, A., Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and Bioengineering* **1980**, *22* (4), 699-734.
30. Tay, J. H.; Liu, Q. S.; Liu, Y., Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *Journal of Applied Microbiology* **2001**, *91* (1), 168-175.
31. Jiang, H. L.; Tay, J. H.; Maszenan, A. M.; Tay, S. T., Bacterial diversity and function of aerobic granules engineered in a sequencing batch reactor for phenol degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **2004**, *70* (11), 6767-75.
32. Weber, S. D.; Wanner, G.; Ludwig, W. S., K. H.; Fried, J., Microbial Composition and Structure of Aerobic Granular Sewage Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73*, 6233-6240.
33. Tay, S. T.; Ivanov, V.; Yi, S.; Zhuang, W. Q.; Tay, J. H., Presence of anaerobic bacteroides in aerobically grown microbial granules. *Microbial Ecology* **2002**, *44* (3), 278-85.
34. Liu, Y.-Q.; Liu, Y.; Tay, J.-H., The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, *65* (2), 143-148.
35. Zheng, Y.-M.; Yu, H.-Q.; Liu, S.-J.; Liu, X.-Z., Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere* **2006**, *63* (10), 1791-1800.
36. Mar Alvarez, G. I. Dinámica poblacional de los microorganismos en un biorreactor de gránulos aerobios para el tratamiento de aguas residuales toxicas. UNAM, México, D.F., 2012.
37. McSwain, B. S.; Irvine, R. L.; Wilderer, P. A., The effect of intermittent feeding on aerobic granule structure. *Water Science and Technology* **2004**, *49* (11-12), 19-25.
38. Liu, Y.; Tay, J. H., The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* **2002**, *36* (7), 1653-65.
39. Adav, S. S.; Lee, D. J.; Tay, J. H., Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Research* **2008**, *42* (6-7), 1644-50.
40. Liu, H.; Fang, H. H. P., Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology* **2002**, *95* (3), 249-256.
41. Cammarota, M.; Sant'Anna, G., Jr., Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. *Biotechnology Letters* **1998**, *20* (1), 1-4.
42. Zhang, X.; Bishop, P. L., Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* **2003**, *50* (1), 63-69.

43. Yi, S.; Zhuang, W.-Q.; Wu, B.; Tay, S. T.-L.; Tay, J.-H., Biodegradation of p-Nitrophenol by Aerobic Granules in a Sequencing Batch Reactor. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (7), 2396-2401.
44. Khan, M. Z.; Mondal, P. K.; Sabir, S., Bioremediation of 2-chlorophenol containing wastewater by aerobic granules-kinetics and toxicity. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, *190* (1–3), 222-228.
45. Moy, B. Y.; Tay, J. H.; Toh, S. K.; Liu, Y.; Tay, S. T., High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. *Letters in Applied Microbiology* **2002**, *34* (6), 407-12.
46. Liu, Q. S.; Tay, J. H.; Liu, Y., SUBSTRATE CONCENTRATION-INDEPENDENT AEROBIC GRANULATION IN SEQUENTIAL AEROBIC SLUDGE BLANKET REACTOR. *Environmental Technology* **2003**, *24* (10), 1235-1242.
47. Wang, F.; Lu, S.; Wei, Y.; Ji, M., Characteristics of aerobic granule and nitrogen and phosphorus removal in a SBR. *Journal of Hazardous Materials* **2009**, *164* (2–3), 1223-1227.
48. Hailei, W.; Guangli, Y.; Guosheng, L.; Feng, P., A new way to cultivate aerobic granules in the process of papermaking wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal* **2006**, *28* (1), 99-103.
49. Dangcong, P.; Bernet, N.; Delgenes, J.-P.; Moletta, R., Aerobic granular sludge—a case report. *Water research* **1999**, *33* (3), 890-893.
50. Qin, L.; Liu, Y.; Tay, J.-H., Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochemical Engineering Journal* **2004**, *21* (1), 47-52.
51. Adav, S. S.; Lee, D.-J.; Lai, J.-Y., Aerobic granulation in sequencing batch reactors at different settling times. *Bioresource Technology* **2009**, *100* (21), 5359-5361.
52. Sheng, G.-p.; Li, A.-j.; Li, X.-y.; Yu, H.-q., Effects of seed sludge properties and selective biomass discharge on aerobic sludge granulation. *Chemical Engineering Journal* **2010**, *160* (1), 108-114.
53. Li, Z. H.; Kuba, T.; Kusuda, T., The influence of starvation phase on the properties and the development of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, *38* (5), 670-674.
54. Tay, J. H.; Ivanov, V.; Pan, S.; Tay, S. T., Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Letters in Applied Microbiology* **2002**, *34* (4), 254-7.
55. Liu, Y.-Q.; Tay, J.-H., Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology* **2008**, *99* (5), 980-985.
56. Zhu, L.; Xu, X.; Luo, W.; Tian, Z.; Lin, H.; Zhang, N., A comparative study on the formation and characterization of aerobic 4-chloroaniline-degrading granules in SBR and SABR. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, *79* (5), 867-74.
57. Kong, Y.; Liu, Y.-Q.; Tay, J.-H.; Wong, F.-S.; Zhu, J., Aerobic granulation in sequencing batch reactors with different reactor height/diameter ratios. *Enzyme and Microbial Technology* **2009**, *45* (5), 379-383.
58. Beun, J. J.; Hendriks, A.; van Loosdrecht, M. C. M.; Morgenroth, E.; Wilderer, P. A.; Heijnen, J. J., Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research* **1999**, *33* (10), 2283-2290.
59. Pan, S.; Tay, J. H.; He, Y. X.; Tay, S. T., The effect of hydraulic retention time on the stability of aerobically grown microbial granules. *Letters in Applied Microbiology* **2004**, *38* (2), 158-63.
60. Wang, Z.-W.; Liu, Y.; Tay, J.-H., The role of SBR mixed liquor volume exchange ratio in aerobic granulation. *Chemosphere* **2006**, *62* (5), 767-771.
61. Yang, S. F.; Li, X. Y.; Yu, H. Q., Formation and characterisation of fungal and bacterial granules under different feeding alkalinity and pH conditions. *Process Biochemistry* **2008**, *43* (1), 8-14.
62. Song, Z.; Ren, N.; Zhang, K.; Tong, L., Influence of temperature on the characteristics of aerobic granulation in sequencing batch airlift reactors. *Journal of Environmental Sciences (China)* **2009**, *21* (3), 273-8.
63. Yang, S.-F.; Tay, J.-H.; Liu, Y., Inhibition of free ammonia to the formation of aerobic granules. *Biochemical Engineering Journal* **2004**, *17* (1), 41-48.

64. Tsuneda, S.; Nagano, T.; Hoshino, T.; Ejiri, Y.; Noda, N.; Hirata, A., Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor. *Water Research* **2003**, *37* (20), 4965-4973.
65. Ellis, T. G.; Smets, B. F.; Magbanua, B. S.; Leslie Grady Jr, C. P., Changes in measured biodegradation kinetics during the long-term operation of completely mixed activated sludge (CMAS) bioreactors. *Water Science and Technology* **1996**, *34* (5-6), 35-42.
66. Elvang, A. M.; Westerberg, K.; Jernberg, C.; Jansson, J. K., Use of green fluorescent protein and luciferase biomarkers to monitor survival and activity of *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 cells during degradation of 4-chlorophenol in soil. *Environmental Microbiology* **2001**, *3* (1), 32-42.
67. Woods, S. L.; Ferguson, J. F.; Benjamin, M. M., Characterization of chlorophenol and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment. *Environmental Science & Technology* **1989**, *23* (1), 62-68.
68. Commandeur, L. C. M.; Parsons, J. R., Degradation of halogenated aromatic compounds. *Biodegradation* **1990**, *1* (2-3), 207-220.
69. Buitrón, G.; González, A.; López-Marín, L. M., Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Science and Technology* **1998**, *37* (4-5), 371-378.
70. Moreno, G.; Buitron, G., Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol. *Bioresource Technology* **2004**, *94* (2), 215-8.
71. Moreno-Andrade, I. Biodegradación óptima de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial. UNAM, México, 2006.
72. Sanz, J. L.; Köchling, T., Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* **2007**, *42* (2), 119-133.
73. Fernandez, A.; Huang, S.; Seston, S.; Xing, J.; Hickey, R.; Criddle, C.; Tiedje, J., How stable is stable? unction versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology* **1999**, *65* (8), 3697-704.
74. Whiteley, A. S.; Bailey, M. J., Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Applied and Environmental Microbiology* **2000**, *66* (6), 2400-7.
75. Wells, G. F.; Park, H. D.; Eggleston, B.; Francis, C. A.; Criddle, C. S., Fine-scale bacterial community dynamics and the taxa-time relationship within a full-scale activated sludge bioreactor. *Water Research* **2011**, *45* (17), 5476-88.
76. Matsumoto, S.; Katoku, M.; Saeki, G.; Terada, A.; Aoi, Y.; Tsuneda, S.; Picioreanu, C.; van Loosdrecht, M. C., Microbial community structure in autotrophic nitrifying granules characterized by experimental and simulation analyses. *Environmental Microbiology* **2010**, *12* (1), 192-206.
77. Wiggins, B. A.; Jones, S. H.; Alexander, M., Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology* **1987**, *53* (4), 791-796.
78. AFNOR, *Evaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles*. Normalisation française: France, 1985; Vol. NFT 90-312.
79. APHA, *Standard methods for examination of water or wastewater* 20 ed.; American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation: Baltimore, USA., 2005.
80. Oliveira, C. S.; Ordaz, A.; Ferreira, E. C.; Alves, M.; Thalasso, F., In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities. *Biochemical Engineering Journal* **2011**, *58-59* (0), 12-19.
81. Moreno-Andrade, I.; Buitron, G., Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology* **2004**, *50* (10), 251-8.

82. Laguna, A.; Ouattara, A.; Gonzalez, R. O.; Baron, O.; Famá, G.; El Mamouni, R.; Guiot, S.; Monroy, O.; Macarie, H., A simple and low cost technique for determining the granulometry of upflow anaerobic sludge blanket reactor sludge. *Water Science and Technology* **1999**, *40* (8), 1-8.
83. Ghangrekar, M. M.; Asolekar, S. R.; Joshi, S. G., Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. *Water Research* **2005**, *39* (6), 1123-1133.
84. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **1951**, *193* (1), 265-75.
85. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P.; Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **1956**, *28* (3), 350-356.
86. Lopez, J. M.; Koopman, B.; Bitton, G., INT-dehydrogenase test for activated sludge process control. *Biotechnology and Bioengineering* **1986**, *28* (7), 1080-5.
87. Ashby, M. N.; Rine, J.; Mongodin, E. F.; Nelson, K. E.; Dimster-Denk, D., Serial Analysis of rRNA Genes and the Unexpected Dominance of Rare Members of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73* (14), 4532-4542.
88. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J., Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **1990**, *215* (3), 403-10.
89. Caporaso, J. G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F. D.; Costello, E. K.; Fierer, N.; Pena, A. G.; Goodrich, J. K.; Gordon, J. I.; Huttley, G. A.; Kelley, S. T.; Knights, D.; Koenig, J. E.; Ley, R. E.; Lozupone, C. A.; McDonald, D.; Muegge, B. D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J. R.; Turnbaugh, P. J.; Walters, W. A.; Widmann, J.; Yatsunenko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R., QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **2010**, *7* (5), 335-6.
90. Wang, Q.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M.; Cole, J. R., Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73* (16), 5261-7.
91. Gouy, M.; Guindon, S.; Gascuel, O., SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* **2010**, *27* (2), 221-4.
92. Swofford, D. L., PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. . *Snauer Associates* **1998**.
93. Min, K. R.; Rickard, A. H., Coaggregation by the freshwater bacterium *Sphingomonas natatoria* alters dual-species biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75* (12), 3987-97.
94. Weissbrodt, D. G.; Neu, T. R.; Kuhlicke, U.; Rappaz, Y.; Holliger, C., Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. *Frontiers in Microbiology* **2013**, *4*, 175.
95. Yang, C. F.; Lee, C. M.; Wang, C. C., Degradation of chlorophenols using pentachlorophenol-degrading bacteria *Sphingomonas chlorophenolica* in a batch reactor. *Current Microbiology* **2005**, *51* (3), 156-60.
96. Weissbrodt, D. G.; Lochmatter, S.; Ebrahimi, S.; Rossi, P.; Maillard, J.; Holliger, C., Bacterial Selection during the Formation of Early-Stage Aerobic Granules in Wastewater Treatment Systems Operated Under Wash-Out Dynamics. *Frontiers in Microbiology* **2012**, *3*, 332.
97. Bae, H.; Lee, J.; Kim, Y.; Lee, S.-T., Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation* **1996**, *7* (6), 463-469.
98. Nordin, K.; Unell, M.; Jansson, J. K., Novel 4-chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, *71* (11), 6538-44.
99. Saravanan, P.; Pakshirajan, K.; Saha, P., Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor. *Bioresource Technology* **2008**, *99* (1), 205-209.
100. Okaygun, M. S.; Green, L. A.; Akgerman, A., Effect of consecutive pulsing of an inhibitory substrate on biodegradation kinetics. *Environmental Science & Technology* **1992**, *26* (9), 1746-1752.

101. "Límites máximos permisibles de contaminates en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales". Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996. . Diario oficial de la Federacion: 1997.
102. Arellano Badillo, V. M. Implementación de un proceso aerobio de lodos granulares con membranas sumergidas. UNAM, México, DF., 2013.
103. Carucci, A.; Milia, S.; De Gioannis, G.; Piredda, M., Acetate-fed aerobic granular sludge for the degradation of chlorinated phenols. *Water Science and Technology* **2008**, *58* (2), 309-15.
104. Li, Y.; Liu, Y.; Xu, H., Is sludge retention time a decisive factor for aerobic granulation in SBR? *Bioresource Technology* **2008**, *99* (16), 7672-7677.
105. Janczukowicz, W.; Szewczyk, M.; Krzemieniewski, M.; Pesta, J., Settling properties of activated sludge from a sequencing batch reactor (SBR). *Polish Journal of Environmental Studies* **2001**, *10* (1), 15-20.
106. Rickard, A. H.; Gilbert, P.; High, N. J.; Kolenbrander, P. E.; Handley, P. S., Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in microbiology* **2003**, *11* (2), 94-100.
107. Rickard, A.; McBain, A.; Ledder, R.; Handley, P.; Gilbert, P., Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities. *FEMS Microbiology Letters* **2003**, *220* (1), 133-140.
108. España, J. L. T., Parámetros de operación en el proceso de tratamiento de agua residual por lodos activados. *Aquaforum* 2009.
109. Sheng, G.-P.; Yu, H.-Q.; Li, X.-Y., Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology advances* **2010**, *28* (6), 882-894.

ANEXO 1

Determinación de parámetros cinéticos en la biodegradación de 4-clorofenol con biomasa granular aclimatada mediante microrrespirometría

Determinación de parámetros cinéticos en la biodegradación de 4-clorofenol con biomasa granular aclimatada mediante microrrespirometría.

Estancia de investigación realizada en el laboratorio de Bioprocesos Ambientales, CINVESTAV, Unidad Zacatenco; con la cooperación del M. en C. Miguel Ángel Vital Jácome y el Dr. Frédéric Thalasso.

1. Introducción

La respiración, desde una perspectiva bioquímica, es el proceso metabólico de generación de adenosina trifosfato (ATP), en el cual pueden servir como donadores de electrones tanto materia orgánica e inorgánica, y donde compuestos inorgánicos como O_2 , NO_2^- , NO_3^- and SO_4^{2-} sirven como el último aceptor de electrones. Si el oxígeno es el último aceptor entonces el proceso es llamado: respiración aerobia¹.

La respirometría es la medición y la interpretación de la tasa de consumo biológico de oxígeno bajo condiciones experimentales bien definidas. Ya que el consumo de oxígeno está relacionado directamente tanto con la el crecimiento de la biomasa como con la remoción de sustrato. Desde la década de los 90, la respirometría combinada con la inyección de un pulso de sustrato ha sido empleada para obtener constantes biocinéticas. La respirometría es una técnica útil para el modelado y operación de procesos de biotecnología ambiental, como los lodos activados².

Desde el descubrimiento del proceso de lodos activados a principios del siglo XX, se reconoció que la tasa en la que los lodos activados consumen oxígeno, es decir, la tasa de respiración, es un indicador importante de la condición del proceso. La respiración se mide con un respirómetro, que van desde botellas operadas manualmente, como las utilizadas para medir DBO, a instrumentos muy avanzados que realizan las mediciones automáticamente³.

En este Proyecto se determinaron los parámetros cinéticos en la biomasa granular del sistema de degradación de 4-clorofenol, tanto para la estrategia FTC, como para la estrategia ED-TOC.

2. Metodología

Las muestras de gránulos fueron transportadas al laboratorio de Bioprocesos Ambientales, CINVESTAV, Unidad Zacatenco, D.F. para ser analizadas y

caracterizadas con la técnica microrespirométrica desarrollada en el CINVESTAV. A partir de los resultados se determinaron los parámetros cinéticos para la biomasa de cada estrategia. Se utilizó la técnica de respirometría dinámica de pulsos¹ adecuada a un equipo de microrreactores *Micro-24* (PALL® Corporation) (figura A.1).



Figura A.1. Placa de microrreactores (24) utilizado para las determinaciones respirométricas.

La técnica consiste en la inyección de pulsos de sustrato de concentración conocida bajo condiciones controladas. Durante el consumo del sustrato los cambios en la concentración de oxígeno disuelto se siguen y se registran por medio del uso de sensores. En el análisis de datos, los parámetros cinéticos se ajustan al modelo matemático que mejor describa los datos experimentales.

La técnica respirométrica acoplada al uso de microrreactores, permite aumentar significativamente el número de réplicas de cada experimento, lo que mejora la precisión de parámetros calculados².

Las condiciones experimentales usadas en cada caso se muestran en la tabla A.1.

Tabla A.1. Condiciones experimentales

<i>Estrategia de control de la cual provienen los gránulos</i>	FTC	EDTOC
<i>Tipo de cassette</i>	BFL	PRC
<i>Volumen de operación</i>	4 mL	4 mL
<i>Rango de kLa en los microrreactores</i>	14 – 24 h ⁻¹	16 – 21 h ⁻¹
<i>Número de gránulos por microrreactor</i>	5	7
<i>Diámetro promedio de los gránulos</i>	5 mm	5 mm
<i>Rango de concentración de los pulsos de sustrato</i>	17.1 – 164.8 mgDQO/L	3.3 – 129.2 mgDQO/L
<i>Concentración de biomasa promedio</i>	1747.97 ± 90.38 mgDQO/L	2461.40 ± 68.43 mgDQO/L

3. Resultados

La figura A.2 muestra ejemplos de perfiles de oxígeno disuelto (respirogramas) observados a diferentes concentraciones de sustrato con los gránulos de las 2 estrategias de control.

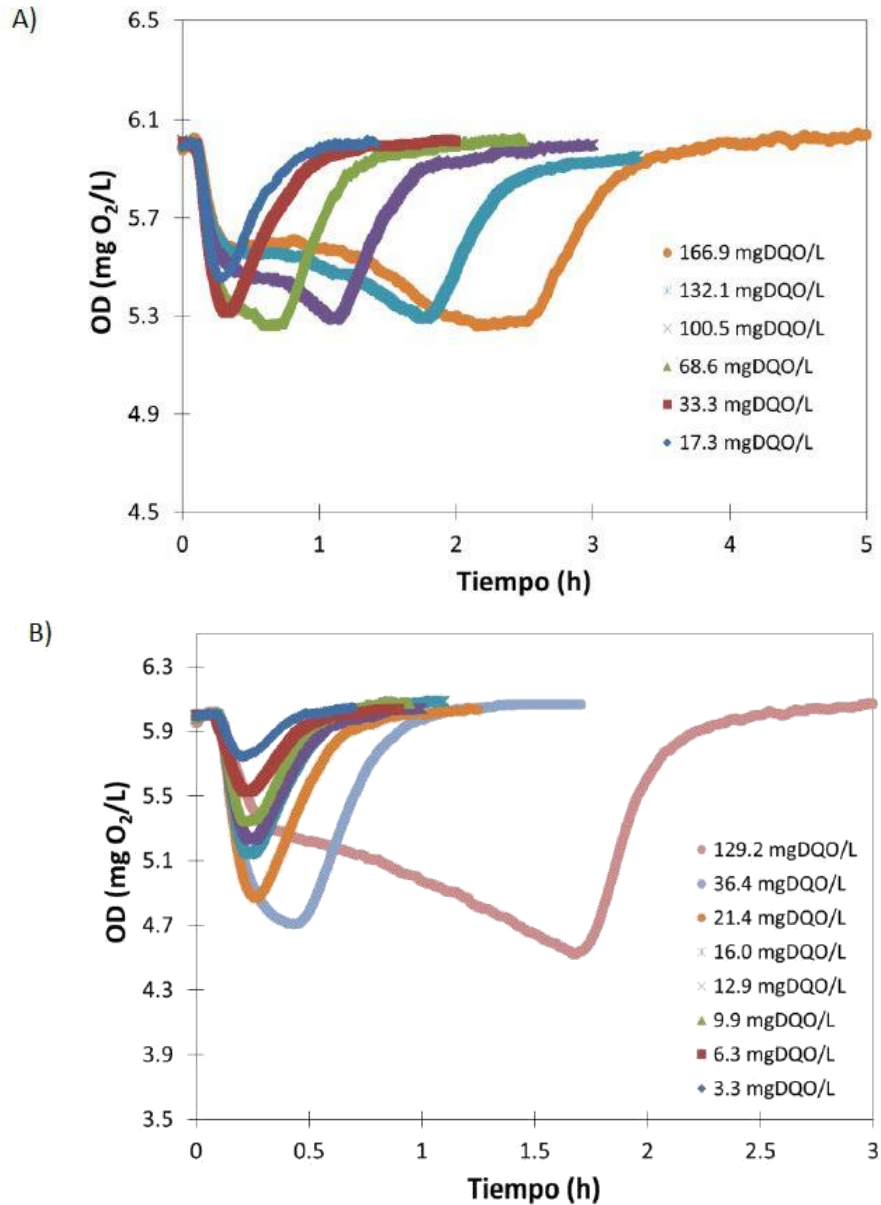


Figura A.2. Respirogramas obtenidos de los gránulos con las estrategias FTC (A) y ED-TOC (B). Las líneas de colores muestran las diferentes concentraciones de sustrato (4-CF).

La degradación del 4-CF presenta una cinética de inhibición por sustrato. En los respirogramas se observa una disminución lenta del oxígeno disuelto conforme

disminuye la concentración del sustrato. Para describir los cambios en el oxígeno disuelto (ecuación 1).

$$(1) \quad OUR_{ex} = \frac{OUR_{max}S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_i}}$$

Donde OUR_{max} es la tasa de respiración máxima, K_S la constante de afinidad por el sustrato y K_i la constante de inhibición.

Los parámetros cinéticos se determinaron mediante el ajuste de los diferentes pulsos al modelo de Haldane, como se ilustra en la figura A.3 para cada estrategia de control.

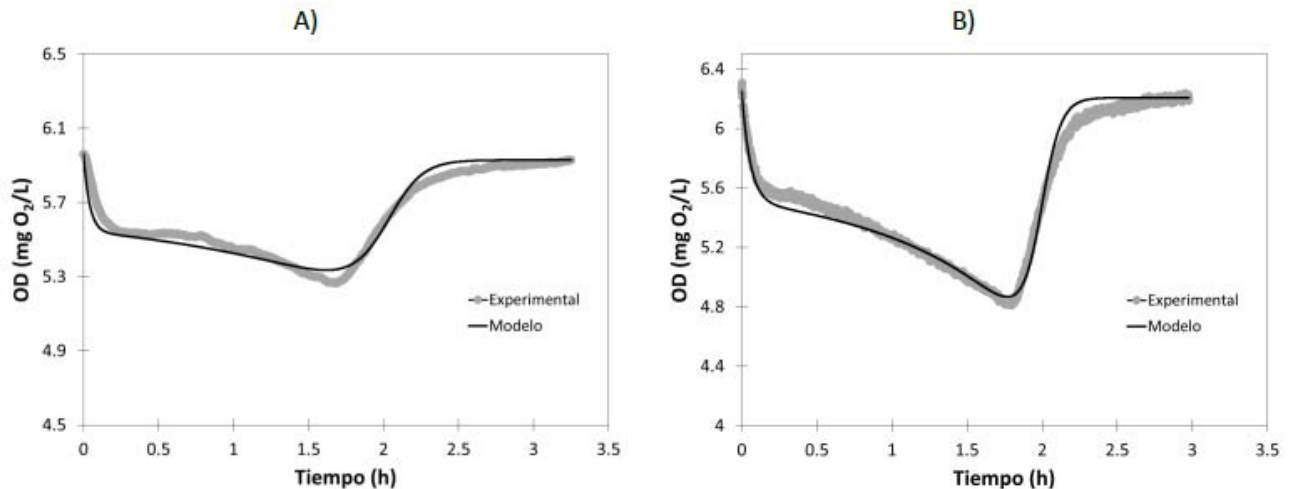


Figura A.3. Respirogramas obtenidos de los gránulos con las estrategias FTC (A) y ED-TOC (B). Las líneas de colores muestran las diferentes concentraciones de sustrato (4-CF).

El modelo de Haldane, al igual que otros modelos cinéticos no estructurados, es un modelo cuyos parámetros presentan problemas de identificabilidad, es decir, es difícil hallar un conjunto de valores únicos para los parámetros que describan satisfactoriamente los datos experimentales, por lo que existen múltiples combinaciones de parámetros que pueden ajustarse a los datos experimentales con el modelo de Haldane, lo anterior nos llevó a desarrollar la siguiente estrategia:

1.- Se usaron los pulsos a bajas concentraciones de sustrato, donde el efecto inhibitorio es menor. Se ajustaron estos pulsos a un modelo de Monod para la determinar la

constante de afinidad K_S . A bajas concentraciones de sustrato, el término de inhibición del modelo de Haldane toma valores muy bajos, por lo que se asemeja más a un modelo de Monod. De esta manera evadimos los problemas de identificabilidad que adiciona la constante de inhibición K_i sobre la determinación de K_S .

2.- Posteriormente, se usaron los pulsos con altas concentraciones de sustrato para determinar simultáneamente los parámetros OUR_{max} y K_i , de tal forma que se pudiera maximizar la inhibición por sustrato. Para esta determinación se tomó en cuenta el valor calculado previamente para K_S a concentraciones bajas de sustrato.

Con base en la estrategia anterior, se determinaron los siguientes parámetros cinéticos:

Tabla A.2 Parámetros calculados

<i>Estrategia de control de la cual provienen los gránulos</i>	FTC	EDTOC
OUR_{max}/X [mgO_2 $mgDQO^{-1}$ h^{-1}]	0.0178 +/- 0.0014	0.0139 +/- 0.0019
K_s (mgDQO/L)	16.01 +/- 2.22	7.25 +/- 1.24
K_i (mgDQO/L)	124.39 +/- 34.31	56.51 +/- 5.96
$Y_{O_2/S}$ (mgO ₂ /mgDQO)	0.22 +/- 0.02	0.28 +/- 0.02
$Y_{X/S}$ (mgDQO/mgDQO)	0.78 +/- 0.02	0.72 +/- 0.02
Número de réplicas	23	24

Con este estudio se determinó que existen diferencias significativas en los parámetros cinéticos de los gránulos entre las 2 estrategias de control. La tasa de respiración máxima, presenta una disminución del 22% por unidad de biomasa (OUR_{max}/X) al pasar a la estrategia ED-TOC. Este efecto en la tasa de respiración específica entre la biomasa de las 2 estrategias, también se ha reportado en los experimentos de respirometría estática realizados en el Instituto de Ingeniería (Sección 7.4).

La constante de afinidad de los gránulos de ED-TOC es menor que en el caso de los gránulos FTC, lo que significa que con esta estrategia, la biomasa ha desarrollado una mayor afinidad por el sustrato. Lo anterior puede deberse a un incremento de la cantidad y actividad de las poblaciones especializadas en la degradación del sustrato, que es lo que se observó cuando se realizaron los estudios de biología molecular.

La constante de inhibición es notablemente diferente entre las dos estrategias, lo que indica que los gránulos FTC se inhiben a una mayor concentración de sustrato que los gránulos de ED-TOC. Este resultado es consistente con lo que se sabe de la estrategia

de control, pues los gránulos ED-TOC no están en contacto con altas concentraciones de sustrato, por lo que una disminución de la K_i puede atribuirse, al menos en parte, a un fenómeno de desaclimatación.

Se observó un menor rendimiento celular en los gránulos ED-TOC respecto a los gránulos FTC, lo que significa que bajo la estrategia ED-TOC, existe una menor cantidad de biomasa producida por cada miligramo de sustrato consumido.

Consideramos que hará falta mayor investigación en el área, que tome en cuenta la naturaleza granular de la biomasa, así como fenómenos de difusión y otros factores involucrados en sistemas heterogéneos. No obstante, esta breve colaboración abre las puertas para ampliar la investigación en el tema.

4. Bibliografía

1. Spanjers, H.; Vanrolleghem, P. A.; Olsson, G.; Dold, P. L. *Respirometry in Control of the Activated Sludge Process: Principles*; England, 1998; p 47.
2. Ordaz, A.; Oliveira, C. S.; Aguilar, R.; Carrion, M.; Ferreira, E. C.; Alves, M.; Thalasso, F., Kinetic and stoichiometric parameters estimation in a nitrifying bubble column through "in-situ" pulse respirometry. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, *100* (1), 94-102.
3. Esquivel-Rios, I.; Ramirez-Vargas, R.; Hernandez-Martinez, G. R.; Vital-Jacome, M.; Ordaz, A.; Thalasso, F., A microrespirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic cultures. *Biochemical Engineering Journal* **2014**, *83* (0), 70-78.

ANEXO 2

Productos del trabajo de investigación

- Premio al mejor cartel de la 4th IWA Mexico Young Water Professionals Conference 2015. Guanajuato 2015.



- Premio a una de las mejores exposiciones en cartel durante el 39 Congreso Nacional de Microbiología, Querétaro 2015.

