



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Dinámica poblacional de los microorganismos  
en un biorreactor de gránulos aerobios para el  
tratamiento de aguas residuales tóxicas

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. GRACIELA IVONNE MAR ALVAREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. IVÁN MORENO ANDRADE

COMITÉ TUTOR: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ  
DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012



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

Dinámica poblacional de los microorganismos  
en un biorreactor de gránulos aerobios para el  
tratamiento de aguas residuales tóxicas

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. GRACIELA IVONNE MAR ALVAREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. IVÁN MORENO ANDRADE

COMITÉ TUTOR: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ  
DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 05 de marzo de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **MAR ALVAREZ GRACIELA IVONNE** con número de cuenta **99210557** con la tesis titulada **"Dinámica poblacional de los microorganismos en un biorreactor de gránulos aerobios para el tratamiento de aguas residuales tóxicas."**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. IVAN MORENO ANDRADE**:

Presidente: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ  
Vocal: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA  
Secretario: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ALVAREZ  
Suplente: DR. ALFONSO LUGO VÁZQUEZ  
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 04 de junio de 2012.

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

c.c.p. Expediente de la interesada.

## *AGRADECIMIENTOS*

---

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por el apoyo recibido durante mis estudios de Maestría.

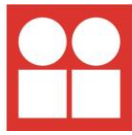
Se agradece el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto 103720 y la Dirección General Asuntos del Personal Académico-UNAM (proyecto PAPIIT IB100612).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

Agradezco a los miembros del Comité Tutor, por todas sus recomendaciones, apoyo y tiempo para el presente trabajo.

Dr. Iván Moreno Andrade  
Dra. Luisa Isaura Falcón Álvarez  
Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Esta tesis se realizó bajo la dirección del **Dr. Iván Moreno Andrade** y fue desarrollada en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.



**INSTITUTO  
DE INGENIERÍA  
UNAM**



## *AGRADECIMIENTOS PERSONALES*

---

Al **Dr. Iván Moreno Andrade** por dirigir esta tesis y las facilidades brindadas para la realización de la misma. Por su confianza, apoyo y motivación, así como, todo el tiempo dedicado y las atenciones que ha tenido conmigo.

A la **Dra. Luisa I. Falcón Álvarez** por abrirme las puertas de su laboratorio, así como, sus consejos, ideas y apoyo mostrado durante todo este tiempo.

Al **Dr. Víctor Manuel Luna Pabello** por sus consejos, apoyo e ideas.

A la **Dra. Rocío J. Alcántara Hernández** por su apoyo técnico durante la realización de esta tesis, Por su tiempo, consejos y la buena compañía.

Al **M. en B. Jaime Pérez Trevilla** por su apoyo técnico, paciencia y por todas las facilidades en el laboratorio así como su compañía y afecto mostrado.

A la **M. en C. Gloria Moreno Rodríguez** por su apoyo técnico en la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado

- **Dr. Germán Buitrón Méndez**
- **Dr. Alfonso Lugo Vásquez**
- **Dr. Pedro Ramírez García**

Por apoyo en este trabajo, sus consejos e ideas con el fin de enriquecer esta tesis.

A mis amigos **Bárbara** y **Miguel**, por ayudarme a iniciar mi vida queretana, por su apoyo, comprensión y amistad, no sólo en esta etapa sino desde que el destino nos permitió encontrarnos. Por todos los momentos buenos y otros no tanto, pero que me ayudaron a crecer y entender las circunstancias vividas. Por esas pláticas tan amenas, los paseos y la convivencia con todo y sus niños (Estopa y Benjamín). Seguiremos siendo uno parte del otro, los quiero mucho.



A **Alma Yadira** por su amistad, los momentos geniales de diversión, el apoyo y su confianza en mí. Te quiero mucho amiga.

A mis compañeros y amigos que encontré en el LIPATA en especial a **Xitlalli Dorian, Javier, Christian, Antonio L. Jorge, Roger, Carlos, Gamaliel**, por su amistad, consejos, diversión, enriquecer mi vida con la destacada sobremesa, la cual era el mejor momento del día; los voy extrañar tanto, pero siempre tendremos las redes sociales para continuarla.

A **Tonatiuh** por todas esas horas de trabajo en el laboratorio, por su apoyo, paciencia, consejos y comprensión tanto en lo laboral como en lo personal. Algún congreso nos reencontrará.

A mis amigos de generación o al menos llegamos al mismo tiempo al laboratorio:

- **Carlos C.**, gracias por tu amistad, por escuchar mis locuras, arrebatos, frustraciones y anhelos; y a veces ser mi cómplice. Por los excelentes momentos en el laboratorio y mejores aún, fuera de él.
- **Gerardo Antonio** por su amistad, por las amenas platicas, alegrarme el día y porque no, hasta los momentos de tensión en becarios. Espero no haber sido mala influencia.

Gracias a ambos por hacer de esta etapa algo genial, los quiero y siempre recordaré tanto buenos momentos.

A las chicas del Instituto de Ecología, **Carla, Paty y Rocío**, fue todo un gusto conocerlas, muchas gracias por su apoyo, consejos, cariño y atenciones durante mi estancia, seguiré en contacto con ustedes.

A mis amigos **Mariana, Yadira, Dafne, Esmeralda, Gabriela, Emma, Anuar, Wendy** y **Luis Núñez**, a los chicos del curso de **Chiapas**, por su amistad, cariño y apoyo.

## DEDICATORIA

---

*“Anyone who has never made a mistake has never tried anything new”*

Albert Einstein

*“Según vamos adquiriendo conocimiento, las cosas no se hacen más comprensibles, sino más misteriosas”*

Albert Schweitzer

Dedicó este trabajo a mis padres **Graciela** y **Zózimo**. Agradezco todo su apoyo y guía durante toda mi vida. Sin ustedes no hubiera podido emprender esta nueva etapa, la cual ha traído grandes alegría, desafíos pero siempre juntos. Gracias por sus consejos, cariño, llamadas de atención y paciencia. Son mi fuente de inspiración.

A mis niños **Geovany** y **Gael**, por todo su amor y comprensión.

A **Nancy Mar** por todo su cariño, complicidad en esta aventura y todas esas noches de largas pláticas, tratando de cambiar al mundo.

A **Cesar Mar** por alentarme en esta etapa y aconsejarme, sabes que eres un gran ejemplo en mi vida.

A **Daniel** por su amistad, la cual nos ha mantenido unidos por más de 24 años. Hemos compartido tanto, que más que mi amigo eres mi hermano. Un gran ejemplo de vida en pie de lucha. Siempre en mi mente, siempre en mi corazón, Te quiero.

A **Adriana Mar, Tíos, primos y sobrinos** por su apoyo y alentarme durante estos años, por los momentos tan amenos en mis escapadas al DF.

A **Wilbert** y **Mike**, que disfruté cada vez que regreso a casa y me reciben con mucho cariño.

## Tabla de contenido

<b>Índice de tablas</b> .....	<b>III</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>III</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Nomenclatura</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Marco Teórico</b> .....	<b>5</b>
2.1 Contaminación del agua .....	5
2.2 Fenol y sus derivados .....	6
2.3 4-Clorofenol .....	9
2.4 Reactor Discontinuo Secuencial .....	12
2.5 Granulación Aerobia .....	13
2.5.1 Factores que afectan la granulación aerobia .....	18
2.5.1.1 Tipo de sustrato.....	18
2.5.1.2 Régimen Abundancia- Ayuno.....	20
2.5.1.3 Oxígeno Disuelto .....	20
2.5.1.4 Tiempo de Sedimentación .....	21
2.5.2 Diversidad y estructura microbiana de los gránulos aerobios .....	22
2.5.2.1 Diversidad microbiana de los gránulos aerobios .....	23
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
3.1 Objetivo General .....	25
3.2 Objetivos Particulares .....	25
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>26</b>
<b>5. Metodología</b> .....	<b>27</b>
5.1 Estrategia experimental .....	27
5.2 Etapa 1. Formación y monitoreo del tamaño de los gránulos aerobios .....	27
5.2.1 Arranque y operación del biorreactor .....	27

5.3 Etapa 2. Estabilidad de los gránulos aerobios bajo condiciones de estrés	29
5.3.1 Periodo de ayuno	29
5.3.2 Picos de concentración	30
5.4 Técnicas Analíticas	30
5.4.1 Técnicas de Fenoles Totales	30
5.4.2 Sólidos suspendidos volátiles y totales (SSV y SST)	31
5.4.3 Índice volumétrico de lodos (IVL)	31
5.4.4 Velocidad de sedimentación (VS)	31
5.4.5 Respirimetría	31
5.4.6 Coeficiente de integridad	32
5.4.7 Sustancias poliméricas extracelulares	32
5.4.8 Análisis de la estructura del gránulo	32
5.5 Biología Molecular	32
<b>6. Resultados y discusión</b>	<b>34</b>
6.1 Aclimatación de la biomasa	34
6.2 Parámetros operacionales del SBR	35
6.3 Comunidad microbiana durante la operación del biorreactor	38
6.4 Condiciones de estrés	43
6.4.1 Efecto de periodos de ayuno sobre los gránulos aerobios	43
6.4.2 Efecto de los picos de concentración sobre los gránulos aerobios	48
6.4.2.1 Pico 200 mg 4CF/L	48
6.4.2.2 Pico 400 mg 4CF/L	50
6.4.2.3 Pico 600 mg 4CF/L	50
6.4.2.4 Pico 800 mg 4CF/L	51
6.4.2.5 Pico 1000 mg 4CF/L	52
<b>7. Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>55</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de algunos compuestos fenólicos (Merck Chemdat, 2005).....	6
Tabla 2. Toxicidad de compuestos fenólicos en diferentes organismos (Merck Chemdat, 2005).....	8
Tabla 3. Microorganismos identificados de las bandas del DGGE.....	42
Tabla 4. Resumen de los parámetros operacionales de los reactores correspondientes a cada periodo de ayuno .....	44
Tabla 5. Resumen de las características operacionales del reactor durante los picos de concentración de 4CF. ....	49

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura química del Fenol y algunos derivados clorados. ....	7
Figura 2. Ruta propuesta para la degradación del 4-Clorofenol.....	11
Figura 3. Fases de operación de un SBR. ....	13
Figura 4. Desarrollo de gránulos mediante ciliados.....	18
Figura 5. Reactor aerobio SBR automatizado.....	28
Figura 6. Gránulos aerobios en periodo de ayuno. ....	30
Figura 7. Cinéticas de degradación de 4CF durante la fase de aclimatación de la biomasa a 50 mg/L y 100 mg/L. ....	34
Figura 8. Eficiencias obtenidas en la degradación de 4CF durante la operación del reactor.....	35
Figura 9. Fluctuaciones del los SST y SSV durante la operación del reactor.....	36
Figura 10. Comportamiento del IVL y VS durante la operación del reactor.....	37
Figura 11. Análisis de DGGE durante la operación del SBR.....	39
Figura 12. Árbol Filogenético construido por el método “weighted neighbour-joining” (Bruno et al., 2000) de los segmentos de 16S ADN secuenciados. ....	43

Figura 13. Cinéticas de degradación de 4CF por gránulos aerobios posterior al periodo de ayuno.....	44
Figura 13. Fotografías de los gránulos aerobios durante el ayuno.....	45
Figura 14. Valores del IC (%) de los gránulos aerobios posterior al periodo de ayuno. ....	46
Figura 15. Variación del tamaño de los gránulos aerobios posterior a períodos de ayuno. ....	47
Figura 16. Cinéticas de degradación de 4CF durante la exposición de los gránulos aerobios a diferentes picos de concentración. ....	49
Figura 17. Coeficiente de integridad de los gránulos aerobio posterior a los picos de concentración. ....	51
Figura 18. Variación de tamaño de los gránulos aerobio posterior al pico de concentración. ....	53
Figura 19. Fotografías de los gránulos aerobios sometidos a picos de concentración puntual de 4CF.....	53

## Resumen

---

Los gránulos aerobios son agregados microbianos, de estructura compacta, biológicamente eficientes, con amplia diversidad de especies microbianas, de gran tamaño (comparados con biomasa en forma de flóculos), fácil para retener en los biorreactores, lo cual resulta una técnica prometedora para el tratamiento de aguas residuales. Se ha observado que en los reactores discontinuos secuenciales o SBR (*Sequencing Batch Reactor* por sus siglas en inglés), se pueden generar gránulos aerobios con la alta sedimentabilidad y una mayor área superficial proporcionando así una biomasa activa y resistente a cambios de carga orgánica. El objetivo de esta tesis fue evaluar los cambios en una comunidad bacteriana que degrada 4-clorofenol (4CF) durante el proceso de granulación aerobia en un reactor discontinuo secuencial. El proceso de granulación se llevó a cabo en un biorreactor SBR automatizado con capacidad de 7 L y un volumen útil de 6 L. El reactor fue inoculado con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (3 g SSV/L). Se alimentó con agua sintética conteniendo 4-clorofenol (4CF) (200 mg<sub>4CF</sub>/L) como única fuente de carbono y energía. Se determinaron los cambios en la composición de la comunidad microbiana por medio de técnicas de biología molecular (PCR, DGGE, secuenciación e identificación). Una vez estable el reactor y concluida la granulación, se dividió la biomasa para ser sometida a condiciones de ayuno de 24, 48, 72, 96 y 120 hrs, y picos de concentración de 200, 400, 600, 800 y 1000 mg 4CF/L. El seguimiento del tamaño de los gránulos se realizó mediante microscopía. El reactor operó de manera estable durante la fase de granulación, alcanzando una eficiencia de degradación de 4CF mayor al 99%. La velocidad de sedimentación fue 6.3 m/h, el índice volumétrico de lodos fue 40 ml/gSSV y los SST del efluente fueron 12 mg/L. Lo anterior demostró una buena sedimentabilidad de los gránulos aerobios formados. El análisis de DGGE demostró que existen cambios en la comunidad microbiana, siendo el género *Pseudoxanthomonas* uno de más representativos de la comunidad degradadora

de 4CF. Los gránulos presentaron un tamaño de  $585 \pm 35 \mu\text{m}$ . En el caso de los ayunos, la estructura y forma del gránulo no se observó afectada por el ayuno en un periodo de 48 horas ( $545 \pm 21 \mu\text{m}$ ). Sin embargo, después de 168 horas de ayuno, los gránulos se disgregaron perdiendo con ello su forma y tamaño ( $460 \pm 14 \mu\text{m}$ ). El coeficiente de integridad se redujo de 92 a 18%, lo cual indica que los gránulos pierden la capacidad de permanecer agregados al estar expuestos a ayunos prolongados. En general, La estructura de los gránulos aerobios se vio afectada por ayuno disminuyendo su integridad un 12%, en tanto, la actividad degradadora también se vio afectada, aumentando el tiempo de reacción hasta 11 veces y la actividad respirométrica disminuyó un 75%. Al estar expuesta la comunidad microbiana a picos de concentración, se observó que existe una reducción de la actividad de los microorganismos relacionada al aumento en la concentración inicial del compuesto tóxico. Al aplicarse un pico de  $1000 \text{ mg4CF/L}$ , el tiempo de reacción aumentó de 3 a 238 h y el coeficiente de integridad se redujo de 93 a 37%. Esto indica que los microorganismos asociados en gránulos aerobios son afectados drásticamente al estar expuestos a condiciones extremas de concentración del sustrato tóxico.

**Palabras claves:** 4-clorofenol, agua residual tóxica, biodegradación, gránulos aerobios, SBR.



## Abstract

---

The aerobic granules are microbial aggregates, with compact structure, biologically efficient, with a several microbial species, large size (compared with biomass in flocs form), easy to retain in bioreactors, which is a promising process for treating toxic wastewater. It has been observed that in sequential batch reactors (Sequencing Batch Reactor), aerobic granules can be generated with high settleability and a greater surface area obtaining an active biomass with high resistant to organic loading. The objective of this work was to evaluate changes in a bacterial community degrading 4-chlorophenol (4CP) during aerobic granulation in a sequencing batch reactor. The granulation process was carried out in an automated SBR bioreactor with capacity of 7 L and a working volume of 6 L. The reactor was inoculated with microorganisms coming from a municipal wastewater treatment plant (3 g VSS/L). The reactor was fed with synthetic wastewater containing 4-chlorophenol (4CP) (200 mg4CP/L) as sole carbon and energy source. The changes in microbial community composition were determined applying molecular biology techniques (PCR, DGGE, sequencing and identification). Once the reactor showed a completed and stable granulation, biomass was divided and exposed to starvation conditions of 24, 48, 72, 96 and 120 hours, and concentration peaks of 200, 400, 600, 800 and 1000 mg 4CP/L. Monitoring the size of the granules was performed by microscopy. The reactor operated stably during the granulation phase, reaching 4CP degradation efficiency higher than 99%. The settling velocity was 6.3 m/h, the sludge volume index was 40 mL/gSSV and TSS of the effluent were 12 mg/L. This showed a good aerobic settleability of the formed granules. DGGE analysis showed that there are changes in the microbial community; the most representative genus was *Pseudoxanthomonas*, which has been reported as 4CP degrader. The granules showed a size of  $585 \pm 35 \mu\text{m}$ . The structure and shape of granules were not affected due to starvation of 48 hours ( $545 \pm 21 \mu\text{m}$ ). However, the granules lost the shape and size after 168 h of starvation ( $460 \pm 14 \mu\text{m}$ ). The integrity coefficient

was reduced from 92 to 18%, indicating that the granules lose the ability to remain aggregated when exposed to prolonged starvation periods. In general, the structure of aerobic granules was affected by starvation, decreasing its integrity by 12%, while the degradation activity was also affected, increasing the reaction time 11-fold and respirometric activity decreased by 75%. It was observed a decrease in the microorganism's activity related to the increased of the initial concentration of the toxic compound due to the concentration peak. When a peak of 1000mg4CP/L was applied, the reaction time increased from 3 to 238 h and the integrity coefficient was reduced from 93 to 37%. This indicates that the microorganisms associated as aerobic granules are drastically affected when exposed to extreme toxic substrate concentration.

Keywords: 4-chlorophenol, toxic wastewater, biodegradation, aerobic granules, SBR.

# Nomenclatura

---

4CF	4-clorofenol
2-CF	2-clorofenol
2,4.DCF	2,4-clorofenol
2,4,6-TCF	2,4,6-triclorofenol
°C	Grados Centígrados
ATP	Adenosin-trifosfato
CE <sub>50</sub>	Concentración media máxima efectiva
CFs	Clorofenoles
CI	Coeficiente de Integridad
CL <sub>50</sub>	Concentración letal
CLSM	Microscopía Confocal Láser de Barrido ( <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> por sus siglas en inglés)
cm	Centímetros
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante ( <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> por sus siglas en inglés)
DL <sub>50</sub>	Dosis media letal
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos ( <i>Environmental Protection Agency</i> por sus siglas en inglés).
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> ( <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> por sus siglas en inglés)
F/M	Relación alimento/microorganismos ( <i>food to microorganism ratio</i> por sus siglas en inglés)
GAO	Organismos acumuladores de glucógeno ( <i>Glycogen accumulating organisms</i> por sus sigla en inglés)
h	Hora
IVL	Índice Volumétrico de Lodos
L	Litro

m	Metro
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimolar
mm	Milímetro
OD	Oxígeno disuelto
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAO	Organismos acumuladores de fósforo ( <i>polyphosphate-accumulating organisms</i> por sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> por sus siglas en inglés)
q	Tasa específica de degradación
rADN	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
rpm	Revoluciones por minuto
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
s	Segundo
SBR	Reactor discontinuo secuencial ( <i>Sequencing Batch Reactor</i> por sus siglas en inglés)
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido ( <i>Scanning Electron Microscope</i> por sus siglas en inglés)
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
TECO	Tasa Específica de Consumo de Oxígeno
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente ( <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> por sus siglas en inglés)
VS	Velocidad de Sedimentación
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
µM	Micromolar

# 1. INTRODUCCIÓN

---

La industrialización nos ha llevado no sólo al incremento en la demanda de agua sino también a una mayor contaminación de la misma debido a las descargas industriales, las cuales contienen compuestos tóxicos o dañinos al ambiente, por lo que se han desarrollado y se sigue investigando diferentes métodos para tratar las aguas residuales.

El factor que más influye sobre el tratamiento de las aguas residuales es, sin duda, su composición. En tanto, su procedencia determina gran parte de sus características físicas, químicas y biológicas. De acuerdo a su origen, las aguas residuales pueden ser clasificadas en: 1) domésticas o urbanas, 2) industriales, 3) agropecuarias, y 4) pluviales (Ramalho *et al.*, 1991). Para el objetivo de esta investigación nos centraremos en las industriales.

En México, existen 2,186 plantas de tratamiento de aguas residuales industriales en operación. De las cuales, 731 se clasifican en tratamiento de tipo primario, 1,193 secundario, 88 terciario y 174 con tratamiento no especificado. La industria genera alrededor de  $188.7 \text{ m}^3/\text{s}$  ( $6.01 \text{ km}^3/\text{año}$ ), lo que representa 7 millones de toneladas de  $\text{DBO}_5$  al año (*Demanda Bioquímica de Oxígeno* en 5 días, es la cantidad de oxígeno requerido para la descomposición bacteriana de la materia orgánica) y de la cual solamente se remueve 1.15 millones de toneladas en los sistemas de tratamiento existentes (CONAGUA, 2011).

Para el cumplimiento de los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales establecidos en la NOM- 001-ECOL-1996, en condiciones particulares de descarga, solamente 475 cumplen y tienen un gasto de  $7.6 \text{ m}^3/\text{s}$ . El resto no lo cumple, y el volumen tratado por ellas es de  $14.6 \text{ m}^3/\text{s}$  (CONAGUA, 2011).

La selección del tipo de tratamiento dependerá de varios factores; entre ellos, el tiempo del tratamiento para efectuar la remoción, la robustez de la tecnología, las

normas locales referentes a las descargas, la factibilidad del proceso y el mantenimiento del mismo así como la generación de compuestos orgánicos volátiles.

La tecnología más ampliamente utilizada en el tratamiento de aguas residuales, es el sistema biológico comúnmente conocido como proceso de lodos activados. De manera general este proceso consiste en dos fases, una fase bioquímica (tanque de aireación) y una fase física (clarificador secundario).

El tanque de aireación se caracteriza por la acción combinada de microorganismos para transformar la materia orgánica biodegradable, tanto soluble como coloidal, a través de sus diferentes rutas metabólicas teniendo como única fuente de energía las sustancias presentes en el agua residual para cubrir sus necesidades metabólicas. De esta manera transforman completamente los contaminantes, transformándolos en sustancias inocuas como el dióxido de carbono, el metano, el nitrógeno molecular y agua. La mineralización de compuestos contaminantes mediante microorganismos es, por tanto, un proceso de transformación completo (Daphne, 1994).

Los microorganismos utilizan este sustrato por dos vías fundamentales: la vía desasimilatoria (reacciones de producción de energía) y la vía asimilatoria (reacciones de síntesis). La primera de ellas tiene como misión fundamental proveerlos de la energía necesaria para desarrollar las funciones vitales, mientras que la segunda supone la utilización de la materia orgánica para la producción de nueva biomasa celular y/o el mantenimiento de las estructuras celulares.

El hecho de que un contaminante sirva a los organismos heterótrofos como una fuente eficaz de energía es función del estado de oxidación del carbono en la materia orgánica. En general cuanto mayor es el estado de oxidación, menores son los rendimientos energéticos puesto que el compuesto proporciona menos energía. En cualquier caso, para un determinado estado concreto de oxidación del

compuesto, el metabolismo respiratorio aerobio es el proceso más eficaz, en comparación con el metabolismo anaerobio, pues es el que obtiene mayor cantidad de ATP de un compuesto. Es por ello que en casos de compuestos no demasiado energéticos o que tengan que ser incorporados en el influente a baja carga (por su toxicidad, o por su baja solubilidad en agua) sea preferible utilizar un proceso de biodegradación aerobio.

La segunda fase del tratamiento es la sedimentación, basada fundamentalmente en la separación de la biomasa y el agua tratada, por lo que compactación de los lodos activados en el clarificador secundario es una condición necesaria para garantizar una buena calidad de los efluentes provenientes del proceso de los lodos activados (Martins *et al.*, 2004).

Los lodos activados están conformados por comunidades microbianas complejas, donde las bacterias, que representan aproximadamente el 95% de la biomasa activa, son las principales responsables de la degradación de la materia orgánica ya que presentan diferentes capacidades exo- y endoenzimáticas, destacando los géneros *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Comamonadaceae*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*; *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Haliscomenobacter*, *Thauera*, etc. (Li *et al.*, 2008). Suelen encontrarse también protozoos, rotíferos y nematodos, conformando una red trófica en la cual los nematodos se alimentan de protozoos y rotíferos, estos últimos, de protozoos, y todos de las bacterias en suspensión (Kapley y Purohit, 2009). La sucesión de comunidades de bacterias, hongos, protozoos (fagelados, ciliados, etc.) y metazoos (rotíferos, nematodos), se desarrolla durante la maduración del lodo activado. Estos microorganismos se encuentran en un estado de balance ecológico con el medio y por lo tanto la abundancia relativa de los distintos grupos puede estar vinculada con las condiciones de carga orgánica y la calidad de efluente producido (en particular los tiempos de residencia celular y la relación F/M [*food to microorganism ratio*]). La relación ocurre porque si bien existe un intervalo relativamente amplio en el que

estos microorganismos son capaces de sobrevivir, hay un intervalo más estrecho en el que pueden estar presentes en gran cantidad.

Actualmente se sabe que solamente del 5 al 15% de la totalidad de bacterias presentes en muestras de lodos activados pueden ser detectadas mediante conteo en cultivos de laboratorio (Etchebehere *et al.*, 2001). En los últimos años la introducción de nuevos métodos moleculares de análisis, ha posibilitado un progreso extraordinario en el análisis de poblaciones microbianas complejas. Estos métodos, que utilizan preferentemente como marco de referencia la secuencia del gen para la subunidad pequeña del ARN ribosomal (16S rADN), han servido para mostrar la enorme riqueza de diversidad microbiana en la naturaleza y a la vez han puesto en evidencia las limitaciones de las técnicas tradicionales de cultivo para caracterizar la biodiversidad (Lozada *et al.*, 2004), especialmente cuando se trata de efluentes de origen industrial.

El rendimiento y la estabilidad del proceso biológico en el tratamiento de aguas residuales, está condicionado por la adaptación y evolución de los microorganismos, su composición dependerá a su vez del tipo de efluente y otras presiones selectivas, tales como el tiempo de retención celular, la temperatura, las condiciones rédox y demás factores extrínsecos.

Evidentemente, los tratamientos biológicos estarán limitados cuando los influentes a tratar contengan moléculas xenobióticas, inhibitorias, o tóxicas para los microorganismos, como es el caso de las aguas residuales de carácter industrial, por lo que el enriquecimiento en cultivos específicos o aclimatados y tratamientos integrados son algunas de las estrategias posibles en estos casos (Scott y Ollis, 1995). Otra de las estrategias para contrarrestar el efecto tóxico o inhibitorio sobre los microorganismos es la inmovilización de la biomasa. Recientemente se ha propuesto la granulación aerobia como una nueva forma de inmovilización de células, que puede ser explotada en el tratamiento biológico de aguas residuales industriales como se describirá más adelante (Tay *et al.*, 2005).



## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1 Contaminación del agua

Los cuerpos de agua pueden ser afectados en su estructura y su dinámica como ecosistema por las actividades humanas al ser contaminados con diversos compuestos. La contaminación del agua favorece el desarrollo de algunas especies de organismos que pueden soportar o tolerar el desequilibrio creado en el sistema, de la misma forma, la desaparición de otras especies, sobre todo las pequeñas o susceptibles, modificando así las interacciones bióticas y abióticas.

La mayoría de las sustancias de desecho producidas en industrias presenta efectos tóxicos sobre la biota al ser vertidas sin tratamiento previo, de manera natural el sistema receptor (e.g. lago, río) presenta una capacidad de amortiguamiento a cambios en el mismo pero esta puede ser sobrepasada debido a la periodicidad o a la elevada concentración de las descargas, por lo que en muchos de los casos el sistema ya no puede recuperarse. La manera en que se comporten los contaminantes en los cuerpos acuíferos dependerá de varios factores, entre los que se destacan: las características físicas del cuerpo de agua receptor, movimientos del agua, sustratos en el sistema, frecuencia de las descargas, el tipo de contaminante y el tratamiento del agua residual previo a la descarga (Quiroz *et al.*, 2006).

Las aguas residuales industriales pueden contener una gran variedad de compuestos xenobióticos, los cuales debido a su compleja estructura o sustituyentes son difíciles de degradar por los microorganismos, por lo tanto son persistentes en el medio ambiente. Por lo general, tales compuestos se pueden clasificar en 4 principales tipos: (i) hidrocarburos saturados sin dobles o triples enlaces, donde la degradabilidad de estos compuestos disminuye a medida que su peso molecular y el grado de ramificación aumenta, (ii) hidrocarburos aromáticos con dobles enlaces conjugados. Los aromáticos con uno o dos anillos

se degradan con facilidad, mientras que aromáticos de mayor peso molecular son menos biodegradables. Un ejemplo es el benceno, el cual es relativamente degradable ya que es el más simple de los aromáticos, (iii) la resinas, en las cuales se incluyen las piridinas, quinolinas, carbozoles, sulfóxidos y amidas y (iv) los asfaltenos, que incluyen los ácidos grasos, cetonas, ésteres, fenoles y sus derivados (Colwell y Walker, 1977; Leahy y Colwell, 1990).

## 2.2 Fenol y sus derivados

Los compuestos que poseen un grupo hidroxilo unido en forma directa con el anillo bencénico se denominan fenoles. Es conocido comúnmente como ácido carbónico; se ioniza para dar  $H^+$  hasta ciertos límites ( $K_A = 1.2 \times 10^{-10}$ ), y en soluciones concentradas es bastante tóxico para las bacterias. Ha sido muy usado como germicida, en incluso hace tiempo los desinfectantes eran graduados en “coeficientes de fenol”, *i.e.*, poder desinfectante relativo al fenol, aunque actualmente ese sistema ha caído en desuso (Sawyer *et. al.*, 2001). La tabla 1 muestra las propiedades físicas y químicas del fenol y algunos de sus derivados.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de algunos compuestos fenólicos (Merck Chemdat, 2005).

Propiedades físicas y químicas	Compuestos				
	Fenol	2-CF	4-CF	2,4-DCF	2,4,6-TCF
Formula química	$C_6H_6O$	$C_6H_5ClO$	$C_6H_5ClO$	$C_6H_4Cl_2O$	$C_6H_3Cl_3O$
PM (g/mol)	94.11	128.56	128.56	163	197.45
Estado físico	sólido	líquido	cristales	cristales	Polvo cristalino
Color	incolore	incolore	incolore	blanco	beige gris
Olor	característico	característico	fenólico	fenólico	desagradable
Punto de fusión ( $^{\circ}C$ )	40.8	7	41-44	40.43	65-68
Punto de ebullición ( $^{\circ}C$ )	181.8	174	216-218	209-211	244-246
Densidad ( $g/cm^3$ )	1.06	1.26	1.26	1.38	
Solubilidad en agua (g/L, $20^{\circ}C$ )	84	28.50	27	4.5	0.8

La presencia de fenol y compuestos fenólicos en efluentes industriales de desecho se ha convertido en una fuente de contaminación importante de las aguas naturales. Pueden provenir de la degradación de sustancias naturales, actividades industriales y agrícolas. Las principales fuentes antropogénicas de contaminación por compuestos fenólicos son las refinerías de petróleo, licores amoniacales de los hornos de coque, manufactureras de colorantes, resinas sintéticas, plásticos y uso de plaguicidas (Davi y Hundí, 1999).

El fenol (Figura 1) puede permanecer de 2 a 5 días en el suelo, en tanto, en el agua su permanencia se puede prolongar hasta 9 días. Puede tener efectos tóxicos, bioacumularse en tejidos vegetales y organismos acuáticos, así como en los seres humanos (Davi y Hundí, 1999). Dada su alta toxicidad a baja concentración es considerado por la *Environmental Protection Agency* (EPA por sus siglas en inglés) como un contaminante orgánico prioritario. La tabla 1 presenta las propiedades físicas y químicas de algunos compuestos fenólicos.

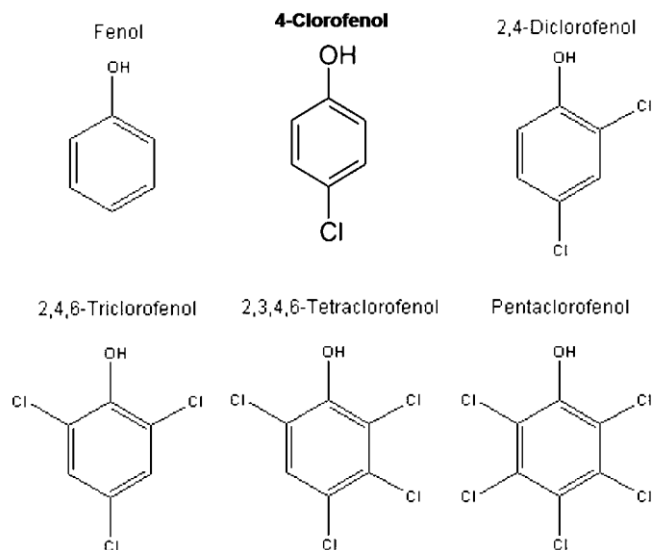


Figura 1. Estructura química del Fenol y algunos derivados clorados.

Dentro de los derivados del fenol encontramos los clorados o Clorofenoles (CFs), los cuales son compuestos orgánicos obtenidos de manera sintética por la cloración de fenol o la hidrólisis del clorobenceno en la industria. También pueden ser intermediarios en la producción del ácido 2,3-diclorofenoxiacetato. Otras fuentes de generación directa o indirecta de estos compuestos recalcitrantes son la industria del papel y la petroquímica (Young y Cerniglia, 1995).

Estos compuestos constituyen una seria amenaza para la vida en caso de introducirse de alguna manera al organismo, debido a su alta toxicidad. En el caso de los clorofenoles (Figura 1), esta toxicidad depende del grado de cloración así como de la posición de los átomos de cloro en relación con el grupo hidroxilo. Se ha observado una mayor toxicidad en cloros sustituidos en la posición 3 -, 4 - y 5 - que en aquellos con sustitución en 2- y 6- (Merck Chemdat, 2005).

La presencia de cloro en su estructura molecular hace a éstos sumamente resistentes a la biodegradación, por lo que pueden persistir en el ambiente (Carucci *et al.*, 2008). En condiciones aerobias se ha observado que la tasa de biodegradación decrece conforme aumenta el número de átomos de cloro presentes. En la tabla 2, se muestran algunas concentraciones letales de compuestos fenólicos en diferentes organismos.

Tabla 2. Toxicidad de compuestos fenólicos en diferentes organismos (Merck Chemdat, 2005)

Compuesto	TOXICIDAD		
	Peces	Daphnia	Ratas
Fenol	-	CE <sub>50</sub> 10 mg/L/24 h	DL <sub>50</sub> 317 mg/kg, oral
2-CF	<i>P. promelas</i> CL <sub>50</sub> 11-13 mg/L/96 h	CE <sub>50</sub> 7.4 mg/L/24 h	DL <sub>50</sub> 670 mg/kg, oral
4-CF	-	CE <sub>50</sub> 6 mg/L/24 h	DL <sub>50</sub> 261 mg/kg, oral
2,4-CF	<i>P. promelas</i> CL <sub>50</sub> 8.2 mg/L/96h	CE <sub>50</sub> 1.4 mg/L/24 h	DL <sub>50</sub> 580 mg/kg, oral
2,4,6-TCF	-	CE <sub>50</sub> 2.2mg/L/48h	DL <sub>50</sub> 820 mg/kg, oral

Notas: CL<sub>50</sub>: Concentración letal, CE<sub>50</sub>: Concentración media máxima efectiva, DL<sub>50</sub>:dosis media letal

La Organización Mundial de la Salud (OMS) presenta tablas de valores guía de sustancias químicas nocivas en agua potable, donde se encuentran algunos compuestos fenólicos como: el pentaclorofenol con un valor guía de 9 µg/L; el 2,4,6-triclorofenol con un valor guía de 200 µg/L. Asimismo, presenta tablas de valores de sustancias en agua potable que pueden causar daños a los consumidores, en las que se encuentran el 2-clorofenol en un intervalo de 0.1-10 µg/L y el 2,4-diclorofenol en un intervalo de 0.3-40 µg/L (OMS, 1996). En 1999 la EPA publicó en su Registro Federal once fenoles sustituidos considerándolos peligrosos para la salud humana y les asigna una concentración máxima admisible en agua potable en un intervalo de 60-400 µg/L en relación con su grado de toxicidad.

### **2.3 4-Clorofenol**

El 4-clorofenol (4CF) puede ser originado en procesos de cloración de aguas residuales que contengan fenol, durante la cloración para blanquear la pulpa para la fabricación de papel y de la ruptura de herbicidas fenólicos como por ejemplo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Pritchard et al., 1987). El 4CF es también un producto de la degradación anaerobia de los fenoles más altamente clorados como el pentaclorofenol, que son utilizados intensivamente en el tratamiento de madera (Madsen *et al.*, 1992).

Se han desarrollado varios métodos físico-químicos para la remoción de CFs, tales como la adsorción y el intercambio iónico, generalmente usados en fase sólida, lo cual requiere una mayor mineralización por oxidación química o biológica. La oxidación química es un método rápido pero en muchas ocasiones se producen compuestos intermediarios indeseables de difícil degradación, además de ser costoso (Movahedian *et al.*, 2008).

La biodegradación de CFs es más específica y relativamente menos costosa, los procesos anaerobios y aerobios se han utilizado como tratamiento de aguas residuales para la remoción de estos compuestos, se ha mostrado que numerosas bacterias son capaces de degradar clorofenoles (Jiang *et al.*, 2004; Carucci *et al.*,

2008). El proceso anaerobio puede degradar eficientemente los CFs más sustituidos, sin embargo se ha detectado que durante la remoción pueden acumularse compuestos menos clorados, tal como 4CF (Garibay-Origel *et al.*, 2005, Estrada-Vázquez, 2003) por lo que en muchos de los casos es necesario acoplarlo a un proceso aerobio, donde la degradación de CF's con 2 o menos átomos de cloro en la molécula es más eficaz (por ejemplo en 4CF), donde a la vez se observa una remoción completa sin aparición de intermediarios (Noyola, 2004).

Para el caso del 4CF, la ruta propuesta de biodegradación (Figura 2) consiste en una monooxigenación para formar clorocatecol seguida de una ruptura del anillo *orto* obteniéndose ácido cloromucónico, una lactonización con la pérdida de cloro provoca la subsiguiente degradación del compuesto (Commandeur y Parsons, 1990).

El 4CF es resistente a la biodegradación debido a que los átomos de cloro interfieren con la acción de muchas oxigenasas, las cuales normalmente inician la degradación de los anillos aromáticos (Copley, 1997). La biodegradación del 4CF se ha visto favorecida mediante una aclimatación previa de los microorganismos al tóxico en cuestión, en este periodo se espera la inducción del metabolismo para la producción de enzimas que permitan a los microorganismos utilizar como fuente de energía el sustrato a degradar, en este caso el clorofenol y con ello hacer una selección y multiplicación de los mismos (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004).

Los periodos de aclimatación puede tardar varias horas o hasta días; Moreno-Andrade y Buitrón (2004) estudiaron la influencia de la aclimatación sobre la degradación del 4CF en un reactor discontinuo secuencial (SBR por sus siglas en inglés), la previa aclimatación redujo los tiempos de degradación sugiriendo una mayor afinidad de la comunidad bacteriana al 4CF, haciendo más eficiente el proceso de remoción.

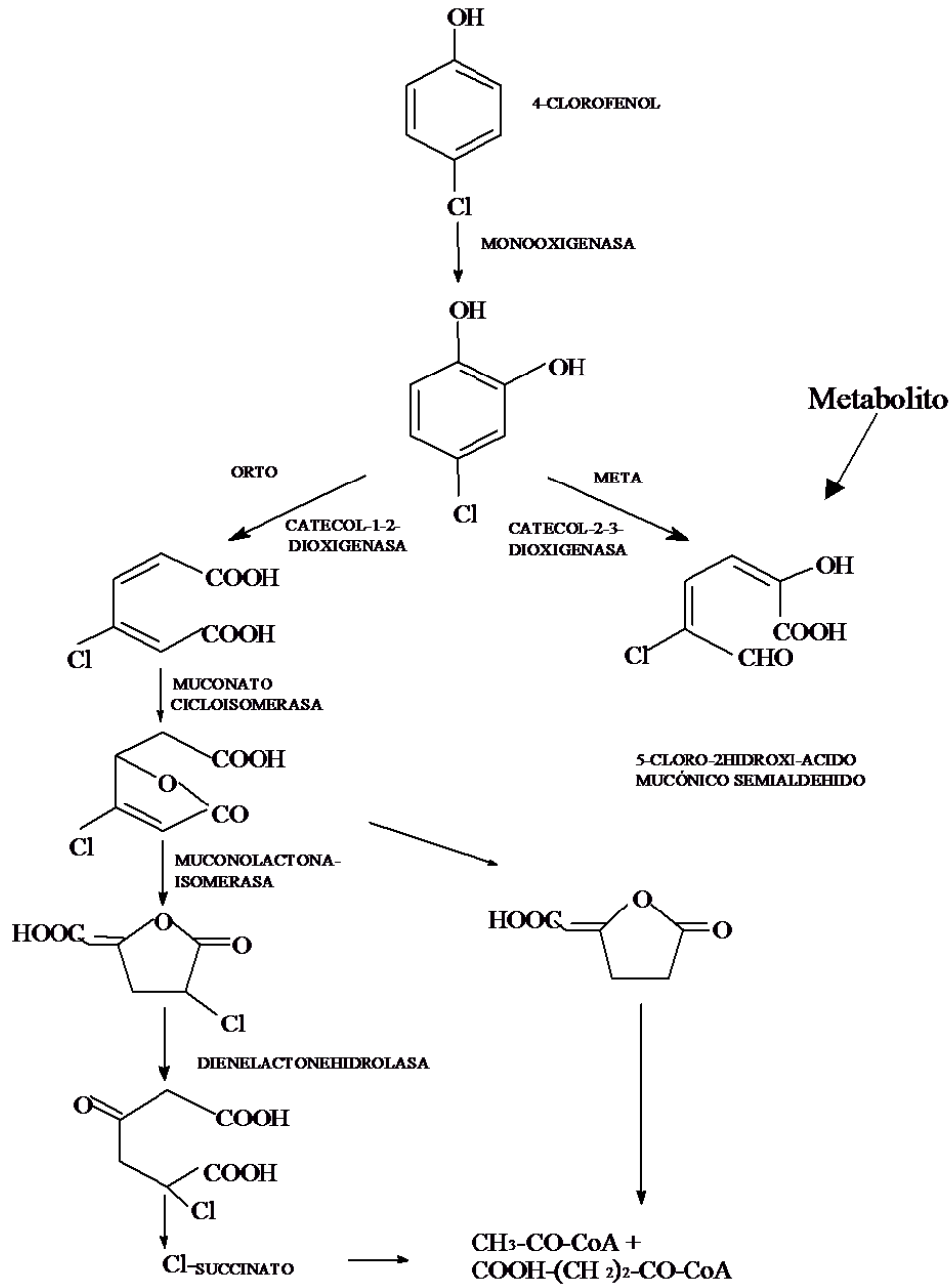


Figura 2. Ruta propuesta para la degradación del 4-Clorofenol. Fuente: Commandeur y Parsons (1990).

El conocimiento de los diferentes tipos de bacterias, así como también de sus metabolismos es una de las bases para el uso de biorreactores tales como el SBR, el cual se describe a continuación.

## 2.4 Reactor Discontinuo Secuencial

Para disminuir el efecto las variaciones en cuanto flujo y concentración de sustancias tóxicas en el agua residual, se ha propuesto el uso de reactores discontinuos secuenciales (SBR), cuyo funcionamiento se basa en la alimentación y vaciado cíclico (Figura 3). Usualmente los biorreactores SBR operan bajo cinco fases bien definidas (Grady *et al.*, 1999) que son:

- Llenado, consiste en la adición del sustrato (agua residual bruta o efluente primario) al reactor,
- Reacción, en esta fase se completan las reacciones iniciadas durante el llenado. El licor mezclado se airea por un tiempo específico para asegurar el contacto de los microorganismos con el sustrato, hasta alcanzar el efluente con las características deseadas,
- Sedimentación, la aireación es detenida y los sólidos se sedimentan en el fondo del tanque. El objetivo de esta fase es permitir la separación de sólidos, para conseguir un sobrenadante clarificado como efluente.
- Vaciado, el propósito de esta fase es la extracción del agua clarificada del reactor,
- Tiempo muerto, corresponde al intervalo de tiempo entre el vaciado y el comienzo de la fase de llenado.

El uso de este sistema representa varias ventajas tanto técnicas como económicas, dentro de las cuales podemos encontrar la disminución de espacio ya que todo el proceso se realiza en un mismo contenedor, se puede ajustar la operación en cualquier momento solo modificando el formato del ciclo, el llenado puede ser de manera continua o discontinua.

A pesar de las ventajas de los mismos, aún existe pérdida de biomasa debido al crecimiento disperso de los microorganismos que son poco sedimentables como es el caso de algunas plantas de tratamiento (Pavan *et al.*, 2007). Esto provoca



una operación deficiente del sistema, resultando en la baja eficiencia de remoción de la materia orgánica y una mala calidad del efluente.

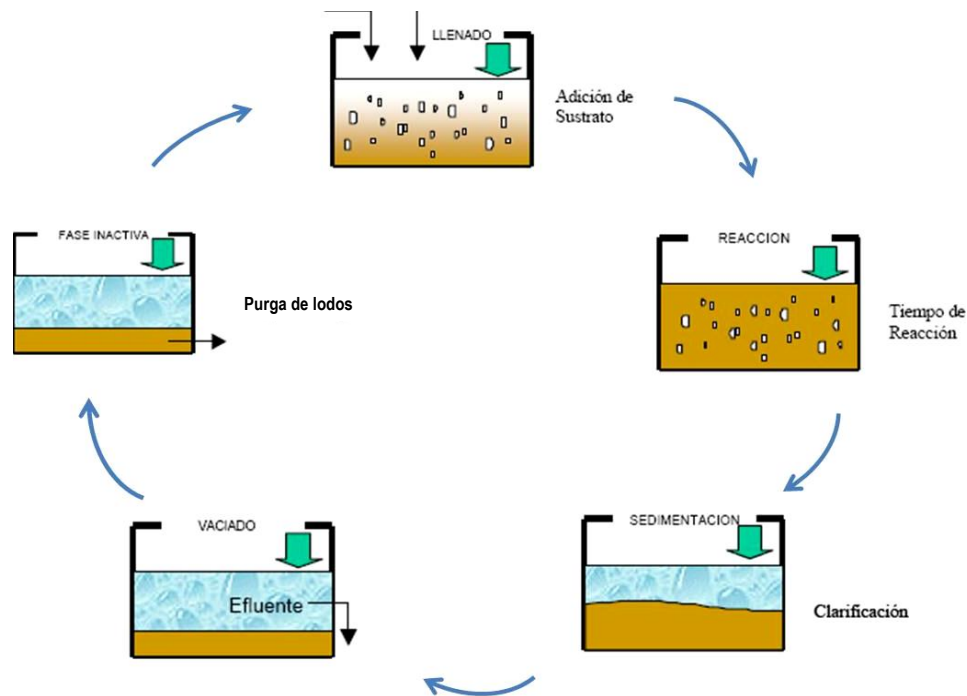


Figura 3. Fases de operación de un SBR.

## 2.5 Granulación Aerobia

La granulación microbiana es un proceso de auto-inmovilización celular, en el cual están involucrados procesos biológicos, físicos y químicos. Los gránulos aerobios son agregados microbianos, de estructura compacta, biológicamente eficientes, con amplia diversidad de especies microbianas, de gran tamaño, fáciles para retener en los biorreactores debido a su excelente sedimentación. Presentan una alta tolerancia a la toxicidad, lo cual resulta una técnica prometedora para el tratamiento de aguas residuales tóxicas (Adav *et al.*, 2008).

Los reactores SBR han demostrado ser una tecnología eficiente para el desarrollo de los gránulos aerobios (Liu y Tay, 2002). El cultivo de gránulos aerobios en reactores discontinuos secuenciales ha sido promovida para ser aplicada en el

tratamiento de aguas residuales de varias industrias tal como la cervecera (Schwarzenbeck *et al.*, 2004) y la de procesos de la soya (Su y Yu, 2005).

El crecimiento de los gránulos aerobios es considerado como un caso especial de desarrollo de biopelículas. De hecho, la granulación aerobia puede ser definida como la aglomeración de células para formar una asociación multicelular estable bajo distintas condiciones (Valera, 2006).

El lodo granular se caracteriza por una estructura compacta, amplia variedad de especies microbianas, excelente capacidad de sedimentación, alta retención de biomasa, habilidad para resistir altas cargas orgánicas y tolerancia a la toxicidad (Morgenroth *et al.*, 1997; Beun *et al.*, 1999; Tay *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003; Liu y Tay, 2002; Adav *et al.*, 2007).

La causa y el mecanismo de granulación aerobia aun no es entendido en su totalidad, pero los factores más importantes han sido descritos en la literatura. Se ha observado que para formar los gránulos esféricos y compactos, la conversión del sustrato biodegradable en sustancias de almacenado intracelular debe ocurrir rápidamente en el reactor. Se ha reportado la granulación espontánea debido a la aplicación de tiempos muy rápidos de llenado (Mc Swain *et al.*, 2004). Así mismo, se ha descrito la formación de gránulos debido a la exposición de la biomasa a régimen de alimentación-ayuno, lo cual se puede aplicar fácilmente en los SBR (de Kreuk y van Loosdrecht, 2004). Además, se han utilizado tiempos cortos de sedimentación, ejerciendo una selección de flóculos y gránulos con mayor velocidad de sedimentación, forzando la eliminación de flóculos menos densos y de microorganismos suspendidos (Beun *et al.*, 2002).

Para la formación de gránulos a partir de bacterias en suspensión, numerosas condiciones deben de ocurrir así como la acción de diferentes fuerzas. A partir de estudios previos, Liu y Tay (2002) propusieron un modelo generalizado para el proceso de granulación, descrito en cuatro pasos:

1. El movimiento físico para iniciar el contacto bacteria-bacteria. Las fuerzas que participan son: la fuerza hidrodinámica, la fuerza de difusión, la fuerza de gravedad, las fuerzas termodinámicas (e.g. el movimiento browniano) y la movilidad celular, ya sea mediante flagelos o cilios.
2. Las primeras fuerzas de atracción para mantener estables los contactos multicelulares, las cuales son: físicas (Van der Waals, atracción de carga opuesta, fuerzas termodinámicas e hidrofobicidad); químicas (puentes de hidrógeno, formación de pares iónicos, formación de tripletes iónicos y enlaces interparticulares) y fuerzas bioquímicas (deshidratación de la superficie celular y la fusión de la membrana celular).  
Cabe señalar que la hidrofobicidad de la superficie bacteriana juega un papel importante durante la formación de biopelículas y gránulos tanto aerobios como anaerobios. De acuerdo con la teoría de la termodinámica, el aumento de la hidrofobicidad puede causar una disminución de la energía libre de Gibbs de la superficie celular, favoreciendo la interacción célula-célula y actuando como una fuerza impulsora para la auto-agregación bacteriana.
3. Fuerzas microbianas para la adhesión bacteriana o maduración de los agregados, tales como: la producción de exo-polímeros, el crecimiento celular en grupos, cambios metabólicos y la competencia genética inducida por el medio ambiente, que facilitan la interacción célula-célula, y resulta en una estructura altamente organizada.
4. La estructura tridimensional estable de los gránulos microbianos es moldeada por fuerzas hidrodinámicas de corte. La forma externa y el tamaño de los gránulos estará determinado por la interacción entre la fuerza de corte y los gránulos, las especies microbianas y la tasa de carga de sustrato.

Con base en el modelo propuesto por Liu y Tay (2002), podemos ver que existen varios factores que pueden estar involucrados durante el proceso de granulación,

los cuales estarán determinados por las condiciones del medio y por los microorganismos presentes en el mismo.

La formación de gránulos aerobios se entiende como un proceso gradual, esto ha sido comprobado mediante el uso técnicas microscópicas y análisis de imágenes (Beun *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2007). A partir de un inóculo de lodos activados, el cual se caracterizaba por una estructura dispersa, esponjosa e irregular con abundantes organismos filamentosos, Tay *et al.* (2001a) observaron al cabo de una semana, la formación de pequeños agregados, los cuales evolucionaron hasta convertirse en un lodo granular compacto, madurando finalmente en gránulos aerobios con un tamaño promedio de 0.25 mm.

En cuanto a la participación de los microorganismos durante la formación de los gránulos aerobios, Weber *et al.* (2007), siguieron el proceso mediante microscopio óptico y por *Microscopio Electrónico de Barrido* (SEM sus siglas en inglés). Este análisis reveló la importancia de la interacción entre protozoarios y bacterias durante la granulación aerobia, la cual se puede dividir en tres fases.

Fase 1. Los protozoos ciliados pululantes de la subclase Peritrichia se asentaron en los flóculos presentes en los lodos activados (Figura 4A). Posteriormente, proliferaron hasta formar grandes colonias, en tanto, los pedúnculos o tallos eran colonizados por bacterias (Figura 4B). Después de unos días, la superficie de los flóculos fue cubierta por varios cientos de células ciliadas en forma de árbol, colonias características de los géneros *Opercularia* y *Epistylis*.

Durante la fase 2, pudo observarse flóculos condensados y un enorme crecimiento de células ciliadas (Figura 4C). Durante la formación de estos flóculos voluminosos, la zona central estaba predominantemente formada por restos de pedúnculos y bacterias. Estos pedúnculos sirven como "columna vertebral" para el desarrollo de los gránulos, ya que son utilizados por las bacterias como sustrato de fijación y crecimiento. Los agregados condensados fueron considerados como precursores de gránulos.

Posteriormente, con el inicio de la fase 3, los zooides (cuerpos celulares) de los ciliados fueron embebidos por bacterias en una biopelícula en expansión, para después de un tiempo ser completamente cubiertos. La mayoría de los ciliados muere durante este proceso. Algunas células de ciliados, se desprenden de la biopelícula para escapar de la decadencia (Figura 4D). Así finalmente, se forman gránulos bacterianos lisos y compactos (Figura 4E).

Sin embargo, estos gránulos maduros son colonizados paso a paso por ciliados sobrevivientes (Figura 4E), que a su vez forman tallos nuevos y colonias, los cuales posteriormente serán utilizados como sustrato para el crecimiento bacteriano. El tamaño de los gránulos puede alcanzar un estado estacionario debido a la abrasión, lavado, y la flotación de gránulos.

Un proceso similar al anterior se pudo observar en presencia de los hongos en las muestras de lodo. Comparado con el proceso ciliado anterior, la formación de gránulos, mediante las hifas de los hongos como “columna vertebral”, no dio lugar a la lisis observada en la fase 2, ni a una recolonización de las superficies de los gránulos en la fase 3. En cambio, esporas germinadas de hongos en los flóculos crecieron rápidamente y de forma continua. Las bacterias utilizaron las hifas, al igual que los tallos de ciliados, como un sustrato para crecer, pero nunca fueron completamente cubiertas (Weber *et al.*, 2007).

El que ocurra la granulación mediada por ciliado u hongos dependerá de la abundancia de los mismos; en cuanto al tamaño, compactación, sedimentabilidad y composición microbiana de los gránulos dependerá del tipo de agua residual y la operación del reactor.

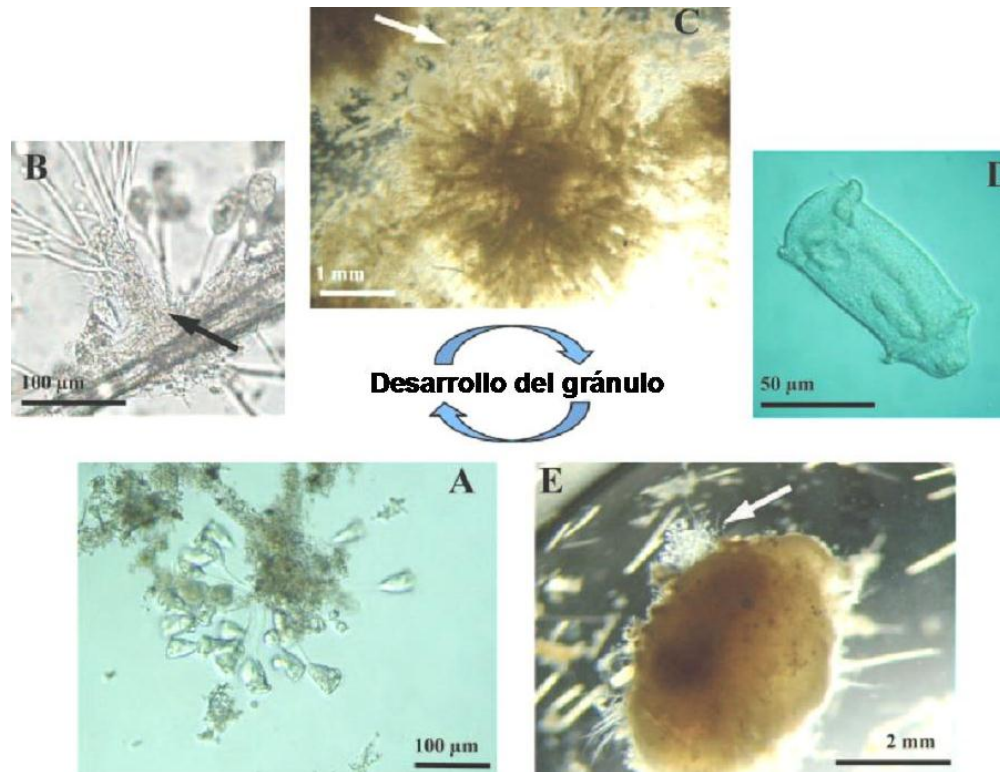


Figura 4. Desarrollo de gránulos mediante ciliados. A) Fase 1, formación de flóculos. Ciliados sedimentados junto con otros organismos y partículas. B). Crecimiento de ciliados (e.g. *Epistylis* sp.) las flechas indican el inicio de la colonización por bacterias. C) Fase 2, crecimiento del gránulo y desarrollo de la zona central. La flecha marca zooides translucidos de la colonia de ciliados y los restos celulares de los ciliados actúan como “columna vertebral”. D) Fase 3. Gránulo “maduro”. Gránulos compactos se han formado, los cuales pueden servir como sustrato de fijación para ciliados. E) Asentamiento de colonias de ciliados en la superficie del granulo. Modificado de Weber et al., 2007.

### 2.5.1 Factores que afectan la granulación aerobia

Existen varios factores que afectan la formación y el mantenimiento de gránulos aerobios en procesos de tratamiento de aguas residuales entre los que se han mencionado en la literatura se encuentran: el tipo de sustrato, régimen abundancia-ayuno, oxígeno disuelto y el tiempo de sedimentación.

#### 2.5.1.1 Tipo de sustrato

En el caso de granulación aerobia, la evidencia experimental indica que la granulación parece ser insensible a la naturaleza de la fuente de sustrato de carbono; por ejemplo, han sido cultivados gránulos aerobios con éxito con una

amplia variedad de sustratos, incluyendo glucosa, acetato, etanol, fenol, y las aguas residuales sintéticas, lo cual facilita su aplicación en diferentes tipos de tratamientos de aguas residuales (Morgenroth *et al.*, 1997; Tay *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002; Adav *et al.* 2008).

Sin embargo, la microestructura y la diversidad de especies microbianas se ha relacionado con la fuente de carbono. Evidencia de esto es el trabajo de Tay *et al.* (2001), los cuales cultivaron gránulos aerobios en dos reactores SBR alimentados en un caso con glucosa y acetato en otro, como única fuente de carbono. El inóculo utilizado presentaba estructura irregular y suelta, dominado por bacterias filamentosas. Al cabo de una semana de operación de los SBR, los gránulos aerobios alimentados con acetato presentaron una estructura compacta; sin embargo en el reactor alimentado con glucosa la estructura predominante fue esponjosa, debido a la presencia de bacterias filamentosas durante toda la operación del reactor. Las observaciones a través de SEM, revelaron que los gránulos aerobios alimentados con glucosa tenían efectivamente una superficie exterior filamentosa, mientras que los gránulos alimentados con acetato estaban conformados predominantemente por bacterias de forma esférica y con uniones más estrechas.

Wang *et al.* (2005) también realizaron experimentos con diferentes fuentes de carbono como sustrato, llegando a la conclusión de que el uso de sacarosa como única fuente de carbono producía inestabilidad en el lodo granular debido a la proliferación de hongos. Al usar una mezcla de acetato y sacarosa, se logró un buen crecimiento de los gránulos y la proliferación de hongos disminuyó. En 1999, Wang *et al.* demostraron que una alta concentración de carbohidratos con baja concentración de oxígeno disuelto en el medio también favorecía el crecimiento de hongos y en general de bacterias filamentosas, desestabilizando la operación del sistema.

### **2.5.1.2 Régimen Abundancia-Ayuno**

Durante el período de reacción en el SBR podemos destacar dos fases: una fase de degradación en la que se agota el sustrato, seguido por una fase de ayuno aerobio en la que el sustrato externo ya no está disponible. Por lo tanto, los microorganismos en el SBR son sometidos a un periodo de abundancia y posteriormente a un periodo de ausencia de sustrato, llamado ayuno periódico (Tay *et al.* 2001).

Bajo condiciones periódicas de abundancias-ayunos, las bacterias se hacen más hidrofóbicas y una hidrofobicidad alta a su vez facilita la agregación microbiana (Tay *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2004). McSwain *et al.* (2004) desarrollaron una estrategia de operación para mejorar la granulación mediante alimentación intermitente, i.e. diferentes tiempos de llenado fueron aplicados a reactores SBR, resultando en diferentes grados de abundancia-ayuno para los microorganismos. La formación de gránulos aerobios compactos y densos fue favorecida por periodos prolongados de saciedad-ayuno así como la alimentación en pulsos. Sin embargo, hasta ahora no hay evidencia experimental sólida para demostrar que los periodos de ayunos actúen como fuerza inductora de la granulación aerobia en SBR's.

### **2.5.1.3 Oxígeno Disuelto**

El oxígeno disuelto (OD) es un importante parámetro en la operación de sistemas de tratamiento aerobio de aguas residuales. Los gránulos aerobios pueden formarse en una concentración de oxígeno bajo (0.7-1.0 mg/L) en un SBR (Peng *et al.*, 1999), mientras que los estudios muestran que también se puede desarrollar con éxito en concentraciones de OD de 6.2 mg/L (Yang *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2004a). Beun *et al.* (2002) observaron que durante el periodo en que estaba disponible el sustrato, el oxígeno disuelto se consumía rápidamente y descendía hasta el 75% de saturación de oxígeno, mientras que en la etapa en que el



sustrato escaseaba tras haber sido consumido por los microorganismos (periodo de ayuno), el porcentaje de saturación de oxígeno era cercano al 100%. El oxígeno disuelto se incrementaba bruscamente durante la transición de abundancia a ayuno. Además, observaron que un descenso prolongado del 50% de OD produce rupturas en los gránulos aerobios formados. Por lo cual se puede concluir que si es mantenida una aireación suficiente, la concentración de oxígeno no es un parámetro decisivo en la granulación aerobia.

#### **2.5.1.4 Tiempo de sedimentación**

En el SBR, las aguas residuales son tratadas en ciclos sucesivos con duración de algunas horas cada uno. Al final de cada ciclo, la sedimentación de la biomasa ocurre antes de que el efluente sea drenado. Los microorganismos que no puedan establecerse en un tiempo dado de sedimentación podrían ser lavados del reactor. Por lo tanto, este tiempo ejercerá una presión de selección hidráulica en la comunidad microbiana. Qin *et al.* (2004a, b) estudiaron el efecto del tiempo de sedimentación en la granulación aerobia en reactores SBR diseñados con un orificio de descarga fijo situado a una altura de 0.63 m, y encontraron que los gránulos aerobios se cultivaron con éxito y se convirtieron en la biomasa dominante del SBR operado en tiempo de menos de 5 minutos de sedimentación. Sin embargo, cuando el tiempo de sedimentación fue largo, se observó una mezcla de gránulos aerobios y lodos en suspensión.

En la investigación de granulación aerobia, se han establecido comúnmente tiempos de sedimentación para mejorar la granulación aerobia en el SBR (Jiang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). De hecho, tiempos largos de sedimentación, forman flóculos con pobre capacidad de sedimentación los cuales pueden ser eliminados del reactor, y también en caso de mantenerse en el reactor, competir con los microorganismos formadores de gránulos. Esto parece indicar que los gránulos aerobios se pueden formar sólo en tiempos cortos por debajo del

nivel crítico, por lo que, el tiempo de sedimentación es un factor decisivo en la formación de gránulos aerobios en SBR.

### **2.5.2 Diversidad y estructura microbiana de los gránulos aerobios**

Los sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales son ecosistemas complejos en los que ocurren múltiples interacciones, que pueden explicarse con modelos ecológicos clásicos (Figuerola y Erijman, 2007). Las comunidades microbianas en las plantas de tratamiento son diversas, producto de las interacciones con los recursos disponibles, con sus competidores y depredadores. La inmensa diversidad genética y metabólica que poseen los microorganismos les permite catalizar las transformaciones indispensables para la degradación de casi todos los contaminantes orgánicos conocidos (Erijman *et al.*, 2011).

La estructura de la comunidad y su función en los gránulos aerobios ha sido un tema de reciente interés donde la distribución espacial de microorganismos dentro de gránulos aerobios ha sido visualizada en secciones delgadas de gránulos utilizando diferentes sondas de oligonucleótidos, fluorocromos específicos y microscopía confocal láser de barrido (CLSM, por sus siglas en inglés) (Tay *et al.*, 2002, Lemaire *et al.*, 2008).

Mediante la combinación de las técnicas de Hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés) y CLSM, Tay *et al.* (2002) identificaron la presencia de *Nitrosomonas* spp., bacteria aerobia obligada amonio-oxidante, en la capa aerobia de gránulos de un proceso de nitrificación-desnitrificación. Esta capa comprende una profundidad de 70-100  $\mu\text{m}$  desde la superficie del gránulo. Condiciones aerobias en el interior del gránulo se mantuvieron probablemente por el transporte de oxígeno a través de canales y poros detectados en los gránulos. Los valores de porosidad alcanzaron un máximo de 300-500  $\mu\text{m}$  de profundidad desde la superficie del gránulo.

En la capa anaerobia en el gránulo de crecimiento aerobio fue detectada la presencia de *Bacteroides* spp. bacterias anaerobias obligadas. Esta capa estaba situada a una profundidad de 800 a 900  $\mu\text{m}$  de la superficie del gránulo. La capa de bacterias anaerobias fue seguida por otra capa de células microbianas muertas a una profundidad de 800-1000  $\mu\text{m}$  desde la superficie del gránulo. Se determinó que existe anaerobiosis y muerte celular en el interior del gránulo provocado posiblemente por la formación de “tapones” de polisacáridos en los canales y poros. Estos “tapones” disminuyen la tasa de transferencia de masa de nutrientes y metabolitos (Tay *et al.*, 2002).

Lemaire *et al.* (2008), analizaron gránulos aerobios menores a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, identificando *Accumulibacter* spp. como dominante en la región superficial y hasta una profundidad de 200  $\mu\text{m}$  de los gránulos, mientras que *Competibacter* spp., dominó la zona central del gránulo. La estratificación de estas dos poblaciones entre la parte exterior aerobia e interior anóxica de los gránulos fue altamente significativa ( $P < 0.003$ ).

### **2.5.2.1 Diversidad microbiana de los gránulos aerobios**

La abundancia relativa y la estructura de la comunidad bacteriana de los grupos funcionales en gránulos aerobios ha sido estudiada usando diversas técnicas de microbiología clásica (aislamiento e identificación morfológica) y de biotecnología molecular, principalmente basados en la secuenciación de genes 16S rRNA (Aday *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2004). La diversidad microbiana de gránulos aerobios está estrechamente relacionada con la composición del medio de cultivo en el que se desarrollan y la estructuran los gránulos aerobios (Liu y Tay, 2004).

Se han identificado bacterias heterótrofas, nitrificantes, desnitrificantes, acumuladoras de fósforo (PAO) y glucógeno (GAO), hongos en gránulos aerobios desarrollados bajo diferentes condiciones (Jang *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Lemaire *et al.*, 2008). Whiteley y Bailey (2000) estudiaron la población

bacteriana en compartimientos específicos de una planta de tratamiento de lodos activados degradando aguas con fenol, encontraron que estaba dominada por bacterias pertenecientes a la clase  $\beta$ -proteobacteria y  $\gamma$ -proteobacteria. Jiang *et al.* (2004) identificaron diez aislados de gránulos maduros alimentados con fenol, de los cuales seis pertenecieron a la clase  $\beta$ -proteobacteria, uno a  $\gamma$ -proteobacteria y tres gram-positivas con altos contenidos de G+C.

Adav *et al.* (2008) aislaron nueve cepas (I1-I9) de gránulos aerobios degradadores de fenol, basados en la morfología de las colonias, color y forma. Su afiliación se determinó mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. Las cepas fueron agrupadas en los siguientes grupos taxonómicos *Eubacteria*, *Ascomycetes*, *Enterobacteria* y  $\gamma$ -*Proteobacteria*, esta última fue dominante en los gránulos aerobios. Todos los aislados excepto el I3, exhibieron alta capacidad degradadora de fenol. I1 y I5 presentaron un rápido crecimiento a 500 mg fenol /L. Adicionalmente, I2, I6, y I8 presentaron gran capacidad de auto-agregación.

Mediante análisis de tinción de Gram y Neisser así como FISH, se ha encontrado que la mayoría de las bacterias filamentosas en gránulos aerobios cultivados a partir de lodos activados de la industria cervecera pertenecían al género *Thiothrix* o a *Sphaerotilu natans* (Weber *et al.*, 2007).

Juang *et al.* (2009) estudiaron la estructura de la comunidad microbiana en un biorreactor aerobio granular con membrana a altas cargas orgánicas. Demostraron la dominancia de la comunidad microbiana desnitrificante, la cual está afiliada con miembros de las familias *Comamonadaceae* y *Alcaligenaceae*, de la clase  $\beta$ -proteobacteria.

A pesar de lo anterior, no existe hasta este momento un conocimiento detallado de la dinámica poblacional y los cambios en la estabilidad del gránulo al ser sometidos a condiciones de estrés microbiano, las cuales normalmente se presentan en las plantas de tratamiento de aguas residuales tóxicas.

## 3. OBJETIVOS

---

### 3.1 Objetivo General

Determinar si existen cambios en una comunidad bacteriana que degrada 4-clorofenol durante el proceso de granulación aerobia en un reactor discontinuo secuencial.

### 3.2 Objetivos Particulares

- Inducir la formación de gránulos aerobios que degradan 4-clorofenol en un reactor discontinuo secuencial aerobio
- Evaluar los cambios en la comunidad bacteriana durante la formación gránulos aerobios por medio de técnicas de biología molecular.
- Determinar el efecto de la exposición de gránulos aerobios a condiciones puntuales de estrés microbiano (ayunos y picos de concentración) sobre la actividad microbiana y el tamaño del gránulo.

## 4. HIPÓTESIS

---

La formación de gránulos aerobios en un reactor discontinuo secuencial producirá diferencias significativas en la presencia de especies bacterianas de la comunidad y en las características de sedimentabilidad de la biomasa.

# 5. METODOLOGÍA

---

## 5.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental contempló dos fases, en la primera de ellas se estudió la formación de los gránulos aerobios en un reactor discontinuo secuencial; en especial se hizo un monitoreo del tamaño de los gránulos y los cambios en la composición de la comunidad microbiana. Con el conocimiento generado y el reactor granular operando de manera estable, se procedió a la segunda fase del proyecto, en la cual se evaluó la estabilidad de los gránulos bajo condiciones de estrés (ayunos y picos de concentración), similares a las que se encontrarían en una planta de tratamiento de aguas residuales.

## 5.2 Etapa 1. Formación y monitoreo del tamaño de los gránulos aerobios

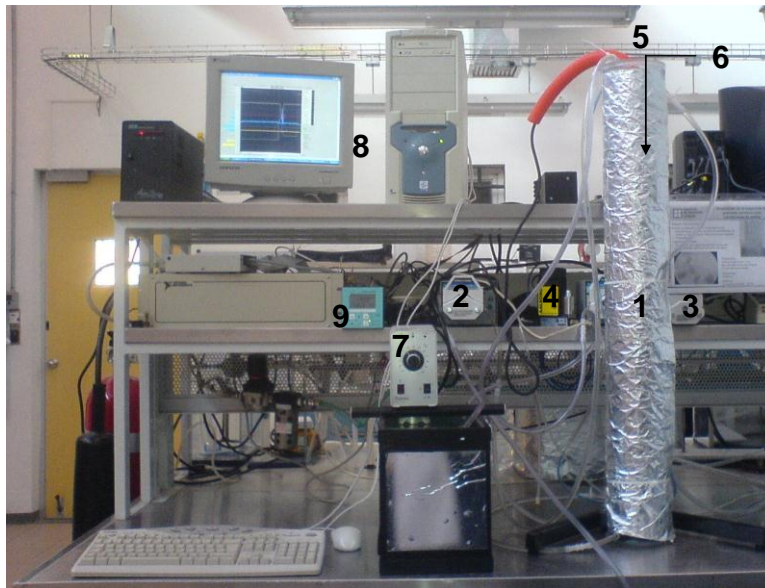
En esta etapa se llevo a cabo el arranque de un reactor operado de forma SBR para la formación de gránulos aerobios. Uno de los principales objetivos fue la aclimatación de los microorganismos al 4CF para su subsecuente degradación, posteriormente se dio paso a la fase de granulación en donde se evaluaron los cambios en el tamaño de los gránulos así como en la composición de la comunidad bacteriana.

### 5.2.1 Arranque y operación del biorreactor

El montaje del biorreactor se realizó en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados para el Tratamiento de Aguas de la Unidad Académica del Instituto de Ingeniería, en Juriquilla, Querétaro.

Se empleo un biorreactor con capacidad de 7 L y volumen útil de 6 L, el volumen de intercambio fue de 50%. El flujo de aire empleado fue de 1 L/min (fuerza de corte de 0.23 cm/s) y la temperatura se mantuvo controlada a 20°C dentro del reactor a través de la recirculación de agua con un calentador, que se equipó con

un sensor en línea de oxígeno disuelto y temperatura Hendress+Hauser Modelo COS41 el cual cuenta con un transmisor (Liquisys-M COM223-DX1105). Los flujos de entrada y salida se controlaron mediante el uso de bombas peristálticas (Masterflex, 200 rpm) (Figura 5).



*Figura 5. Reactor aerobio SBR automatizado. Reactor (1), bomba de llenado (2), bomba de vaciado (3), controlador de flujo másico (4), termómetro (5), oxímetro (6), calentador (7) ordenador (8), interfase (9)*

El SBR operó bajo los siguientes tiempos en cada etapa: pre-aeración: 15 min; llenado: 5 min; reacción, variable dependiendo del tiempo necesario para conseguir una eficiencia de remoción de 4CF de 99%; sedimentación variable: 60 a 5 min., vaciado: 5min. y un tiempo muerto de 1 min.

El biorreactor fue inoculado con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (3600 mg sólidos totales/L). Como sustrato se empleó agua sintética que incluía como única fuente de carbono y energía el 4CF (Aldrich, pureza  $\geq 99.0\%$ ) a una concentración inicial de 50 mg/L; una vez alcanzado el 99% de degradación del 4CF se aumentó a 100 mg/L. En ambos casos se agregaron los siguientes nutrientes por cada litro de agua preparada: 8.5 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10.87 mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 25.15 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,



2.5 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 8.67 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 36.4 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 mg  $\text{Fe}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.036 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.057 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.02 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0347 mg  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 0.055 mL EDTA y 0.054 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

La aclimatación de los microorganismos en todos los casos se realizó por medio de la estrategia de tiempos de reacción variables (y eficiencias fijas) descrita por Moreno-Andrade y Buitrón (2004).

### **5.3 Etapa 2. Estabilidad de los gránulos aerobios bajo condiciones de estrés**

En esta etapa se determinaron los cambios en la biomasa granular durante la operación estable del biorreactor bajo condiciones de estrés microbiano, en este caso ayunos prolongados y picos de concentración tal como ocurre en una planta de tratamiento.

#### **5.3.1 Periodos de ayuno**

Una vez que el reactor degradó el 4CF de manera estable ( $\geq 98\%$ ) y concluida la granulación, 2.1 L del Licor Mezclado Granular fue colocado en probetas (500 mL) para ser sometida a condiciones de ayuno de 24, 48, 72, 96 y 120 hrs (Figura 6). La toma de muestra se realizó una vez terminado el ciclo de degradación de 4CF y se corroboró por medio de la técnica de Fenoles Totales que la concentración fuese menor a 1 mg/L 4CF.

La biomasa se mantuvo en aireación durante todo este tiempo, una vez terminado el ayuno se alimentó con 4CF (100mg/L). Se dio seguimiento a la cinética de degradación, la estabilidad de los gránulos y la medición de los parámetros físico-químicos.

### 5.3.2 Picos de concentración

La biomasa granular del SBR fue sometida a picos de concentración de 4CF (200, 400, 600, 800 y 1000 mg/L) entre cada pico se dio un lapso de tiempo hasta que el reactor operara de manera estable como antes del pico de concentración. Durante cada pico de concentración se dio seguimiento a la cinética de degradación del 4CF, al final se midió la estabilidad de los gránulos así como los parámetros físico-químicos.

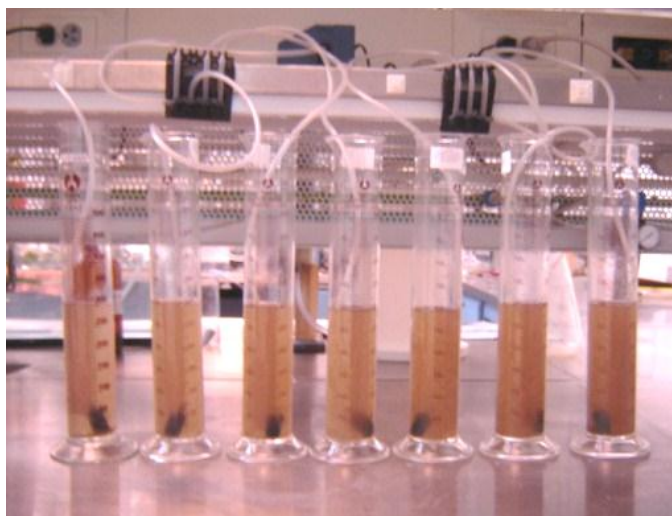


Figura 6. Gránulos aerobios en periodo de ayuno.

## 5.4 Técnicas Analíticas

### 5.4.1 Técnica de Fenoles Totales

La concentración de 4CF fue medida mediante muestreo y su análisis fuera de línea. El método estándar fotométrico directo para cuantificar las concentraciones de fenoles totales (APHA, 2005) está basado en la reacción de los compuestos fenólicos con 4-aminoantipirina a pH  $7.9 \pm 0.1$  en presencia de ferrocianuro de potasio para formar un complejo de color que va del amarillo al naranja, el cual absorbe a una longitud de onda de 500 nm. La concentración de fenol es proporcional a la absorbancia, por lo que previamente se realizó una curva de calibración.

#### 5.4.2 Sólidos suspendidos volátiles y totales (SSV y SST)

Los sólidos suspendidos volátiles y totales (SSV y SST) se determinaron de acuerdo a *Standard Methods* ( APHA 2005) por métodos gravimétricos.

#### 5.4.3 Índice volumétrico de lodos (IVL)

Esta se realizó con la finalidad de evaluar la capacidad de compactación del lodo. Es definida como el volumen que ocupa un gramo de lodo después de sedimentar durante 30 min. Se determino de acuerdo a *Standard Methods* (APHA, 2005).

#### 5.4.4 Velocidad de sedimentación (VS)

Indica la rapidez con la que sedimenta un lodo y es expresado en m/h. Se realizo de acuerdo a *Standard Methods* (APHA, 2005). Para obtener la VS se empleando los resultados obtenidos del IVL en la ecuación 1:

$$VS= 0.6 (m/At) \quad (1)$$

Donde m es la pendiente máxima en el experimento de IVL ( $\text{cm}^3/\text{min}$ ). At es el área transversal de la probeta ( $\text{cm}^2$ ) y 0.6 es el factor de conversión de tiempo y volumen (minutos a horas y cm a m, 60 min/1 h y 1 m/100 cm).

#### 5.4.5 Respirometría

Mediante una solución saturada de oxígeno con nutrientes y sustrato (acetato [50mg/L] o 4CF [50mg/L]), a la cual se le añadió 10ml de los microorganismos de SBR y se monitoreo la cantidad de oxígeno disuelto en el reactor durante 15 minutos. La *tasa específica de consumo de Oxígeno* (TECO) fue determinada por medio de la pendiente obtenida al graficar la concentración de oxígeno en función del tiempo y dividida por la concentración de SSV.

#### **5.4.6 Coeficiente de integridad.**

Para determinar la estabilidad de los gránulos aerobios se usó el coeficiente de integridad de los gránulos aerobios (CI) de acuerdo a lo recomendado por Ghangrekar *et al.*, (1996). De manera cualitativa el coeficiente de integridad está relacionado con la fuerza de los gránulos.

#### **5.4.7 Sustancias poliméricas extracelulares**

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) se determinaron de acuerdo a Ng y Hermanowicz (2005) con el fin de establecer su importancia en la formación del gránulo.

#### **5.4.8 Análisis de la estructura del gránulo**

La estructura del gránulo se analizó mediante la digitalización de imágenes de muestras obtenidas del reactor, donde se obtuvo el tamaño y forma de los mismos. El tamaño de gránulo se determinó por medio del análisis por microscopía (Leica DM500). La adquisición de imágenes se realizó por medio de la cámara Leica ICC50 (Leica Microsystems). El análisis cuantitativo de las imágenes se realizó utilizando el software Axiovision 4.8 (Carl Zeiss).

### **5.5 Biología Molecular**

Durante la operación del reactor se tomaron muestras de manera periódica de la biomasa, las cuales permanecieron en congelación (-20°C) previo a su análisis. La extracción del ADN se realizó por medio de *UltraClean® Soil DNA Isolation Kit* conforme a lo recomendado por el fabricante. La extracción fue verificada mediante gel de agarosa al 1%.

El ADN extraído fue usado como templado para la amplificación del gen rRNA 16S vía PCR. La mezcla de la reacción (25 µl) contenía 1 µl de ADN; el primer apropiado a 0.5 µM; dATP, dCTP, dGTP and dTTP, cada uno a una concentración de 200 µM; 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; y 1U de DNA Taq polimerasa en el buffer de PCR

(Invitrogen Life Technologies, Sao Paulo, Brazil). Los iniciadores específicos para el gen rRNA 16S fueron 534R (ATT ACC GCG GCT GCT GG) y 46F-GC (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAA CAC ATG CAA GTC). Las condiciones de amplificación fueron incluyendo el paso de desnaturalización durante 2 min a 94°C seguido de 30 ciclos que consistieron en 1 min 94°C, 2 min 54 a 72°C y 7 min a 72° C extensión final.

Los productos del PCR fueron separados por medio de la técnica DGGE (40% / 60%). Las porciones centrales de las bandas seleccionadas fueron cortadas y los amplicones extraídos se utilizaron como plantilla para la re-amplificación, fueron secuenciadas e identificadas por medio de una búsqueda en la base de datos de RDP (*Ribosomal Database Project*, Michigan State University).

Se realizó el árbol filogenético usando la aplicación Tree Builder en RDP. La construcción del árbol está basado en el método llamado “*weighted neighbour joining*” (Bruno *et al.*, 2000), donde es calculada una matriz de distancia utilizando un modelo corregido de *Jukes Cantor*. La cual asume que dos secuencias divergen, por lo que la probabilidad de una segunda sustitución de un nucleótido en cualquier sitio aumenta. Los niveles de confianza de cada rama se calcularon por *bootstrap* de 100 matrices generadas al azar.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Aclimatación de la biomasa

La biomasa fue aclimatada a una concentración inicial de 4CF de 50 mg/L. Una vez alcanzada una remoción mayor al 99%, al cabo de 97 h (Figura 7), la concentración de 4CF se aumentó en un 100%.

En la Figura 6, se puede observar que la pre-aclimatación de la biomasa a 4CF (50 mg/L) favoreció el tiempo de aclimatación al aumentar la concentración del 4CF, alcanzando una remoción mayor al 99% en 25 h durante el primer ciclo.

Movahedyan *et al.*, (2008) muestran que un aumento gradual en la concentración de 4CF, favorece la aclimatación de la biomasa, reduciendo el número de ciclos necesarios para obtención de eficiencias mayores a 99%. En nuestro estudio a partir del ciclo 132 el valor promedio del tiempo de reacción necesario para la remoción mayor al 99% de 4CF fue de 2.5 h.

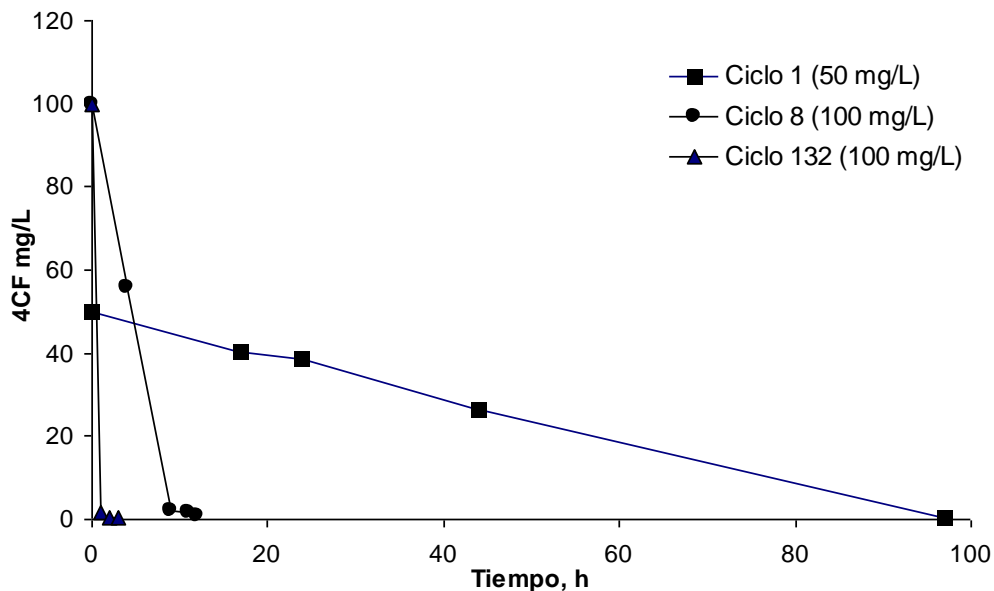


Figura 7. Cinéticas de degradación de 4CF durante la fase de aclimatación de la biomasa a 50 mg/L y 100 mg/L.

## 6.2 Parámetros operacionales del SBR

El biorreactor fue operado durante 1323 ciclos de degradación. Tomando en cuenta todos los datos de operación del reactor se obtuvieron eficiencias de  $93\pm 12\%$ . Sin embargo, es importante puntualizar que esta eficiencia fue menor a 90% durante algunos ciclos en el periodo de aclimatación, debido a los ajustes en el tiempo de reacción. La eficiencia de remoción del biorreactor después de la aclimatación fue de  $99\pm 0.8\%$  (Figura 8). Para la formación de los gránulos aerobios, se realizó la disminución gradual del tiempo establecido para la fase de sedimentación en el SBR, el cual fue empleado como estrategia para la obtención de una biomasa granular (Beun *et al.*, 2002). Esta estrategia consiste en la eliminación de flóculos menos densos y de microorganismos suspendidos, la disminución del tiempo se realizó de manera puntual una vez que el reactor operaba de manera estable (Figura 8). Por lo que la pérdida de biomasa en el reactor afectó la eficiencia de remoción de 4CF, sin embargo, esta fue recuperada al cabo de un tiempo.

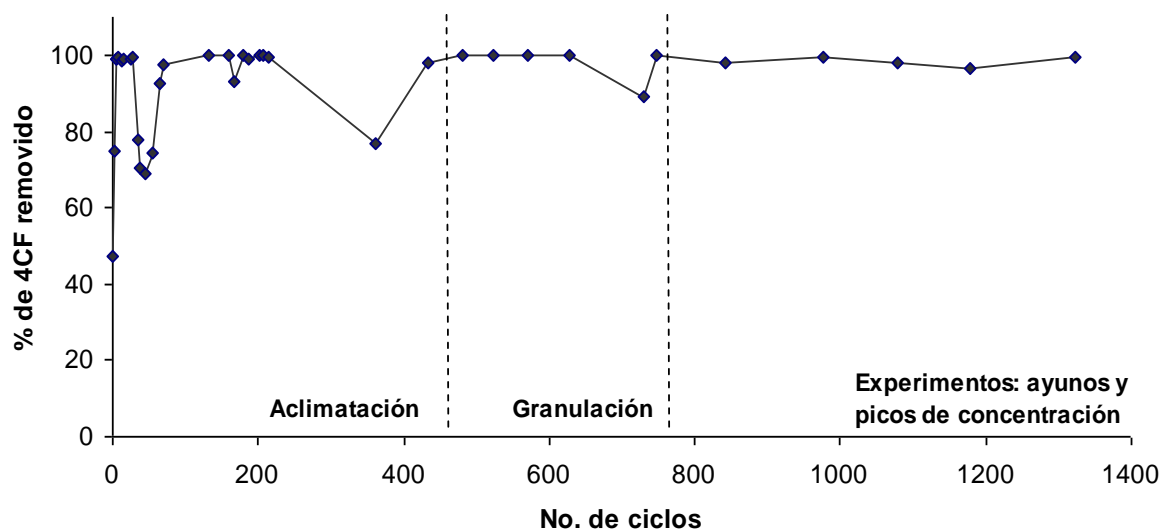


Figura 8. Eficiencias obtenidas en la degradación de 4CF durante la operación del reactor.

Con respecto a la cantidad de biomasa presente en el reactor los SST y SSV, fueron disminuyendo significativamente con respecto al inoculo (3.60 g/L SST y 3.5 g/L SSV). El valor promedio fue de  $1.77 \pm 0.73$  g/L y  $1.73 \pm 0.78$  g/L para SST y SSV, respectivamente durante toda la operación del reactor (Figura 9).

En cuanto a la sedimentabilidad y la compactación de lodos, usualmente son cuantificadas mediante el IVL. En general, valores menores a 80 mL/g se considera una excelente sedimentabilidad y compactación del lodo, en tanto, valores mayores a 150 mL/g son considerados con pobre sedimentabilidad y un lodo esponjoso debido a la presencia de bacterias filamentosas (Ng, 2005). En nuestro estudio, los valores de IVL se redujeron de 141 mL/g SSV (inóculo) hasta 20 mL/g SSV debido a la formación de gránulos aerobios (Figura 10). Los valores reportados en la literatura varían de entre 30 y 60 mL/g SSV en el tratamiento de aguas industriales (Schwarzenbeck *et al.*, 2004; Schwarzenbeck y Wilderer, 2005; Val del Río *et al.*, 2012), por lo que los gránulos obtenidos en este estudio presentan una excelente sedimentabilidad y compactación.

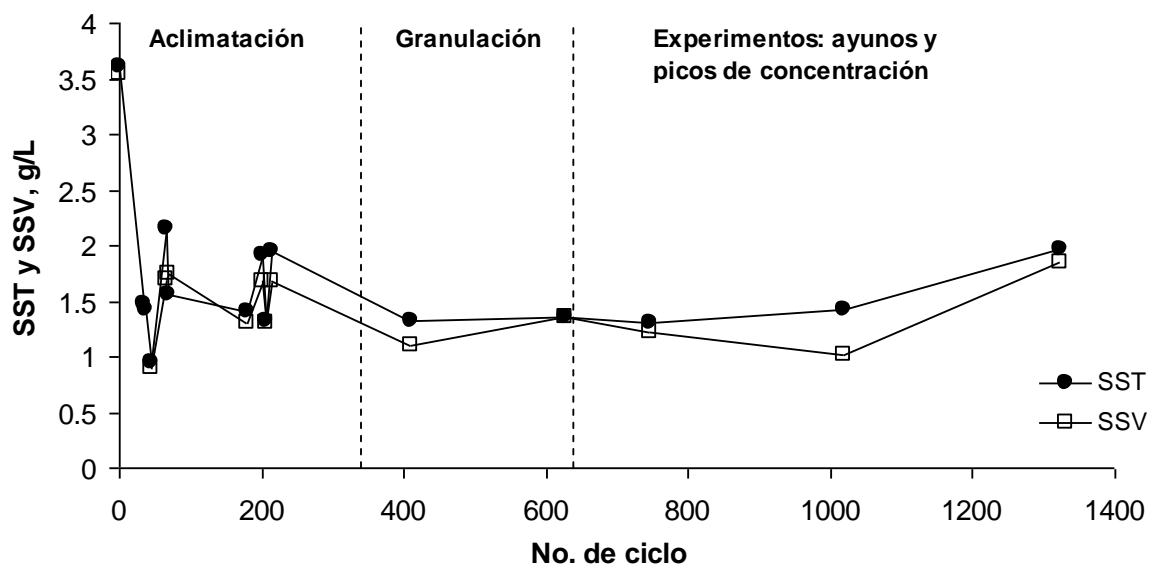


Figura 9. Fluctuaciones de los SST y SSV durante la operación del reactor.



La velocidad de sedimentación inicial fue 0.6 m/h, una vez granulada la biomasa del reactor se alcanzaron valores significativamente mayores al inoculo que variaron de 9.6 m/h hasta un máximo de 11.8 m/h. Se sabe que velocidades altas de sedimentación incrementan la retención de la biomasa y subsecuentemente la capacidad de degradación (Adav *et al.*, 2008). Esto coincide con la concentración de sólidos suspendidos totales en el efluente el cual fue de 30 mg/L además de que una vez estable el reactor, alcanzaron eficiencias mayores al 99%.

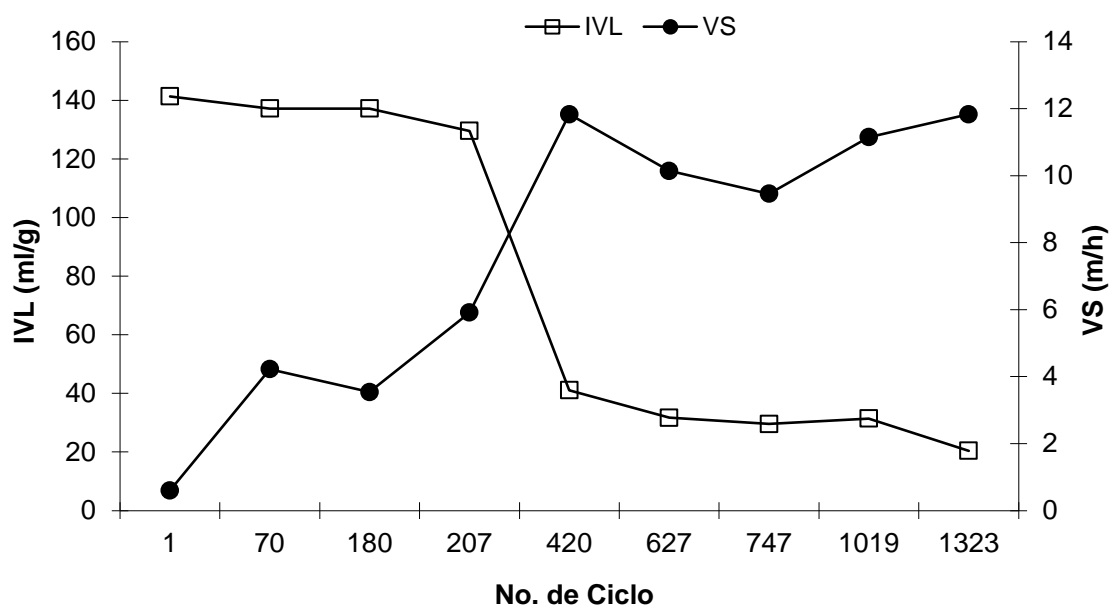


Figura 10. Comportamiento del IVL y VS durante la operación del reactor.

Los gránulos aerobios obtenidos presentaron un diámetro promedio de  $0.62 \pm 0.16$  mm, estos resultados son similares a los obtenidos por Jiang *et al.*, 2002, donde el 80 % del volumen de los gránulos capaces de degradar fenol midieron entre 0.35 mm y 0.6mm. Se han obtenido gránulos aerobios de mayor tamaño usando sustratos de fácil asimilación, tales como el acetato de sodio y la glucosa (Tay *et al.*, 2001).

En el caso de la tasa específica de degradación ( $q$ ) del sustrato, esta fue aumentando debido a la aclimatación. En el ciclo 1, la  $q$  fue de 0.29 mg4CF/gSSV/h y en el ciclo 8 aumentó a 5.66 mg4CF/gSSV/h. Una vez que la

biomasa fue aclimatada (a partir del ciclo 34), durante el resto de la operación del biorreactor, la tasa de degradación fue de  $51 \pm 24$  mg4CF/gSSV/h. Esto coincide por lo reportado en trabajos previos por Moreno-Andrade y Buitrón (2004).

### **6.3 Comunidad microbiana durante la operación del biorreactor**

Durante el proceso de aclimatación y granulación se tomaron muestras de la biomasa del reactor para hacer el seguimiento de los cambios en la estructura de la comunidad microbiana.

Una vez extraído el ADN total del inóculo y del reactor a diferentes tiempos (arranque del reactor y en los ciclos: 24, 201, 403, 578, 747 y 1320), los fragmentos del ADN 16S fueron amplificados y analizados mediante DGGE. Las bandas representativas fueron cortadas, posteriormente secuenciadas para su identificación.

El patrón de bandas del DGGE (Figura 11) indica que la estructura de la comunidad microbiana es dinámica durante el proceso de aclimatación al igual que durante la granulación de la biomasa.

Tomando en cuenta el número de bandas individuales presentes en el DGGE, se puede observar que existe una mayor diversidad en el inóculo ( $\geq 35$ ), las cuales fueron disminuyendo conforme aumentaba el tiempo de operación del reactor ( $\approx 17$ ). Indicando una selección de los microorganismos capaces de degradar 4CF y su permanencia durante la formación de gránulos aerobios.

Como se puede observar en la Figura 11, algunas bandas permanecieron constantes durante toda la operación del reactor con menor o mayor intensidad (Banda 2, 19 y 29) sugiriendo un papel importante en la degradación del 4CF y posiblemente en la estabilidad de los gránulos aerobios. Algunas otras fueron aumentando hasta establecerse o ser dominantes, ejemplo de ello son las bandas 27 y 33. Las cuales no presentaron una gran intensidad en la muestra del inóculo,

conforme avanzó el proceso de granulación la presencia de ambas bandas fue evidente. Por lo que en este caso, la presión de selección durante la granulación favoreció al establecimiento de la especie asociadas a la banda 27 y 33, identificadas como *Pseudoxanthomonas japonensis* (91%) y *Haliangium tepidum* (88%), respectivamente.

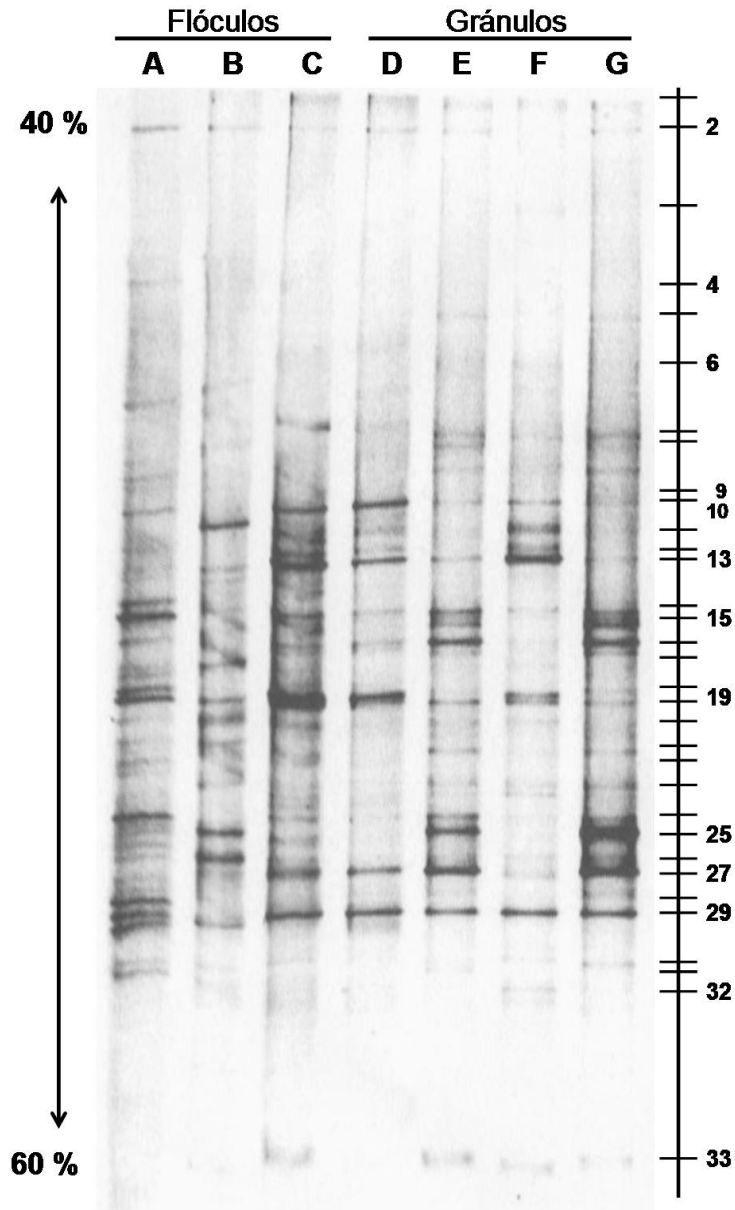


Figura 11. Análisis de DGGE durante la operación del SBR. A: inóculo, B: ciclo 24, C: ciclo 201, D: ciclo 403, E: ciclo 578, F: ciclo 747 y G: ciclo 1320

La composición de la comunidad bacteriana en los gránulos aerobios degradadores de 4CF mostró una dominancia del phylum *Proteobacteria* (Tabla 3), agrupadas mayormente en  $\gamma$ -*proteobacteria* (8) seguido por  $\beta$ -*proteobacteria* (3) y  $\delta$ -*proteobacteria* (1). También se obtuvo un aislado de *Acidobacteria*, así como de *TM7*. La dominancia del phylum *Proteobacteria* concuerda con lo reportado en la literatura tanto para lodos activados como en los gránulos aerobios (Jiang *et al.*, 2004; Juang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008).

Como se muestra en la Figura 12, el árbol filogenético construido a partir de las secuencias obtenidas se pueden identificar 3 clusters, destacando los dos primeros. El primer cluster está formado por tres secuencias de  $\beta$ -*proteobacterias* y seis de  $\gamma$ -*proteobacteria*, en este grupo encontramos bacterias desnitrificantes. De manera específica encontramos el género *Acidovorax*, el cual se ha identificado en lodos activados, gránulos aerobios y relacionado con bacterias formadoras de flóculos (Schulze *et al.*, 1999; Adav *et al.*, 2010), también encontramos bacterias identificadas como *Pseudorhodofera soli* y *Pseudoxanthomonas japonensis*, las cuales han sido recientemente aisladas del suelo y clasificadas en la familias Comamonadaceae y Xanthomonadaceae, respectivamente (Bruland *et al.*, 2009; Thierry *et al.*, 2004).

De acuerdo con la descripción de *P. japonensis*, ésta presenta la propiedad de crecer en ambientes anóxicos y es capaz de reducir nitrito, por lo que en los gránulos aerobios se ubicaría en el centro de los mismos ya que en esta zona pueden existir este tipo de ambientes y contribuir en los procesos desnitrificantes. La presencia de la familia Comamonadaceae y Xanthomonadaceae coincide con lo observado por Adav *et al.* (2010), las cuales se distribuyeron entre los 200–250  $\mu\text{m}$  desde la superficie de los gránulos aerobios degradadores de nitrito. En cuanto a la actividad desnitrificadora en gránulos aerobios ha sido atribuida a especies pertenecientes a la familia Comamonadaceae (Juang *et al.*, 2009).

En el segundo cluster, destaca la presencia *Gamma proteobacterium*, la cual ha sido encontrada en el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos tóxicos como el nonilfenol. Como se observa en el árbol filogenético está relacionada con *Pseudomonas*, este género ha sido reportado por varios investigadores como microorganismos especializados en la degradación de fenoles y clorofenoles como única fuente de carbono y energía (Annachhatre y Gheewala, 1996; Farrell y Quilty, 2002) por lo que en nuestro caso, es posiblemente que la presencia de *Gamma proteobacterium* esté relacionada con la degradación del 4CF.

Cabe destacar la identificación de *Pseudorhodofera soli* TBEA3, *Pseudoxanthomonas japonensis* 12-3 y *Lysobacter panaciterrae* Gsoil068, en nuestro estudio debido a que son especies recientemente descritas por lo que no se tienen datos de su papel en el proceso de tratamiento de aguas residuales. (Bruland *et al.*, 2009; Thierre *et al.*, 2004; Ten *et al.*, 2009).

Tabla 3. Microorganismos identificados de las bandas del DGGE.

Banda	Secuencia determinada (pb)	BLAST				Clasificación Taxonómica RDP *			
		Afiliación <sup>†</sup>	Cepa	Referencia	Similitud (%)	Afiliación Taxonómica (RPD)			Similitud (%)
2 A	373	<i>Bacteroides capillosus</i>	ATCC 29799	NR_025670	79	<i>Acidobacteria</i>	(G)	<i>Gp4</i>	100
6 F	404	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	12-3	NR_024660	92	$\gamma$ - <i>proteobacteria</i>	(F)	<i>Xanthomonadaceae</i>	97
9 D	406	<i>Acidovorax defluvii</i>	BSB411	NR_026506	97	$\beta$ - <i>proteobacteria</i>	(G)	<i>Acidovorax</i>	98
10 C	413	<i>Pseudorhodoferax soli</i>	TBEA3	NR_044574	96	$\beta$ - <i>proteobacteria</i>	(G)	<i>Pseudorhodoferax</i>	99
13 F	400	<i>Pseudorhodoferax soli</i>	TBEA3	NR_044574	97	$\beta$ - <i>proteobacteria</i>	(G)	<i>Pseudorhodoferax</i>	94
15 A	352	<i>Caenispirillum bisanense</i>	K92	NR_044081	83	<i>TM7</i>	(G)	<i>genera incertae sedis</i>	100
19 A	415	<i>Gamma proteobacterium RIB 1-20</i>	RIB 1-20	NR_044323	93	$\gamma$ - <i>proteobacteria</i>	(F)	<i>Xanthomonadaceae</i>	97
19 C	383	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	12-3	NR_024660	92	$\gamma$ - <i>proteobacteria</i>	(F)	<i>Xanthomonadaceae</i>	96
25 E	435	<i>Lysobacter panaciterrae</i>	Gsoil 068	NR_041368	95	$\gamma$ - <i>proteobacteria</i>	(G)	<i>Lysobacter</i>	81
27 E	425	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	12-3	NR_024660	91	$\gamma$ - <i>proteobacteria</i>	(F)	<i>Xanthomonadaceae</i>	97
29 D	407	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	12-3	NR_024660	92	$\gamma$ - <i>proteobacteria</i>	(F)	<i>Xanthomonadaceae</i>	99
29 G	391	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	12-3	NR_024660	93	$\gamma$ - <i>proteobacteria</i>	(F)	<i>Xanthomonadaceae</i>	93
32 F	403	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	12-3	<a href="#">NR_024660</a>	92	$\gamma$ - <i>proteobacteria</i>	(F)	<i>Xanthomonadaceae</i>	95
33 F	435	<i>Haliangium tepidum</i>	SMP-10	NR_024781	88	$\delta$ - <i>proteobacteria</i>	(G)	<i>Kofleria</i>	83

\* Usando el programa "classifier" de RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>), con un mínimo de confianza de 90%. G: genero, F: familia

<sup>†</sup> Usando BLASTN 2.2.26 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

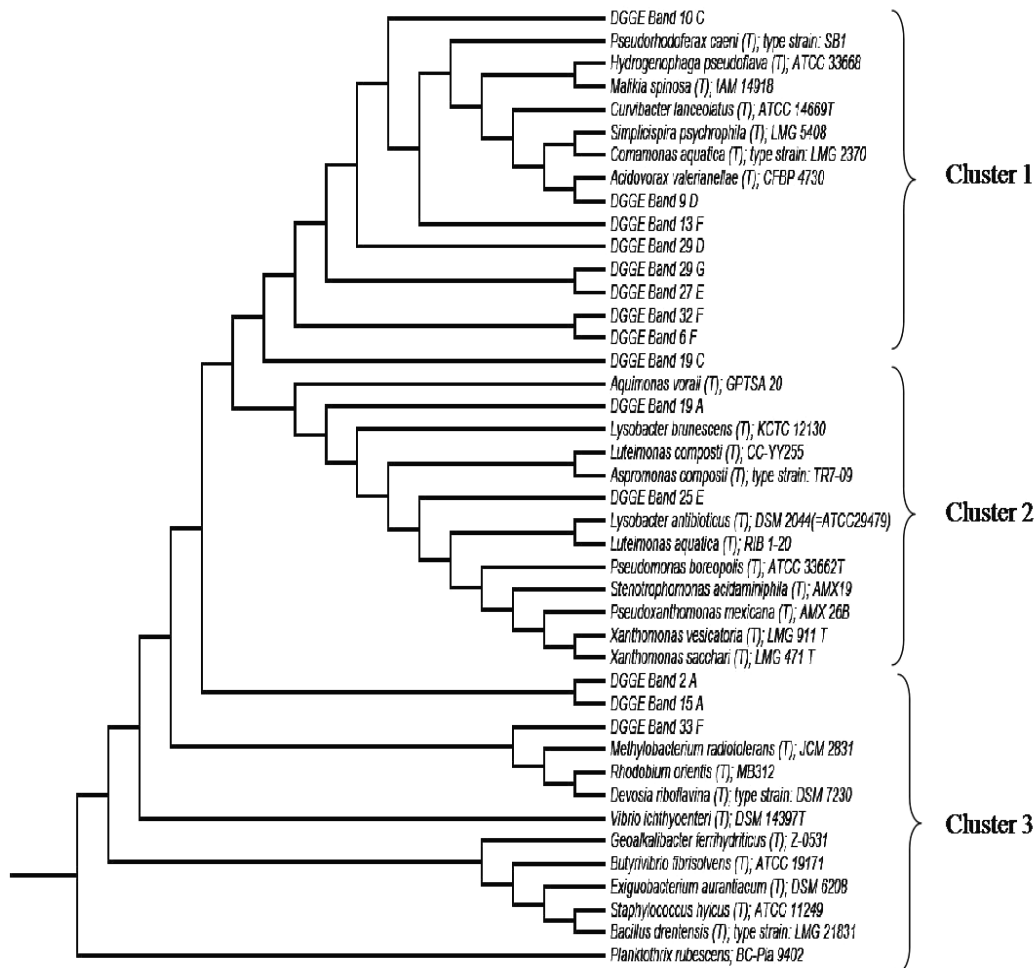


Figura 12. Árbol Filogenético construido por el método “weighted neighbour-joining” (Bruno et al., 2000) de los segmentos de 16S ADN secuenciados. Los niveles de confianza de cada rama se calcularon por bootstrap de 100. La secuencia 16S ADN de *Planktothrix rubescens*; BC-Pla 9420, fue usado como grupo externo (aplicación Tree Builder en Ribosomal Database Project, Michigan State University). — 0.2 cambios por posición de nucleótido.

## 6.4 Condiciones de estrés

### 6.4.1 Efecto de periodos de ayuno sobre los gránulos aerobios

Una vez granulada toda la biomasa del reactor, los microorganismos fueron sometidos a distintos periodos de ayuno (24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h). Los gránulos se mantuvieron con aireación constante. Una vez terminado el lapso de tiempo se volvió a alimentar con 4CF (100 mg/L) y se siguió la cinética de

degradación mediante un muestreo periódico y procesado posteriormente. Como se observa en la Figura 13, el tiempo de degradación de 4CF fue mayor en periodos de ayuno prolongados ( $\geq 96$  h). A pesar de que la actividad degradadora en los gránulos aerobios fue disminuida, estos mantuvieron la capacidad para degradar el 4CF. Estudios han demostrado que la actividad inicial de la biomasa puede ser recuperada como antes del ayuno (Buitrón y Moreno, 2004). En nuestro caso, el tiempo de degradación fue disminuyendo conforme aumentó el número de ciclos de degradación.

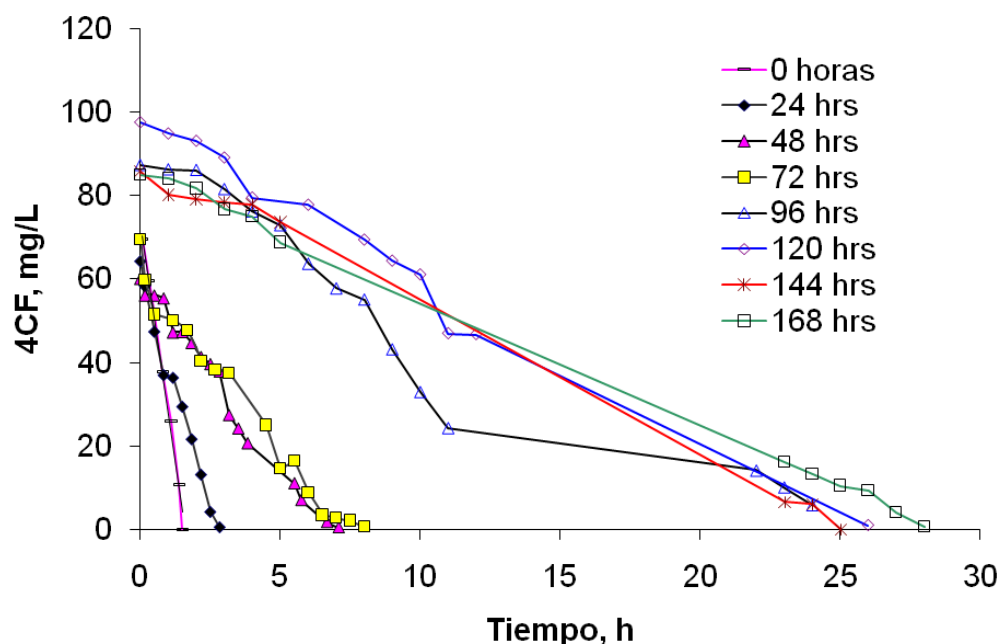


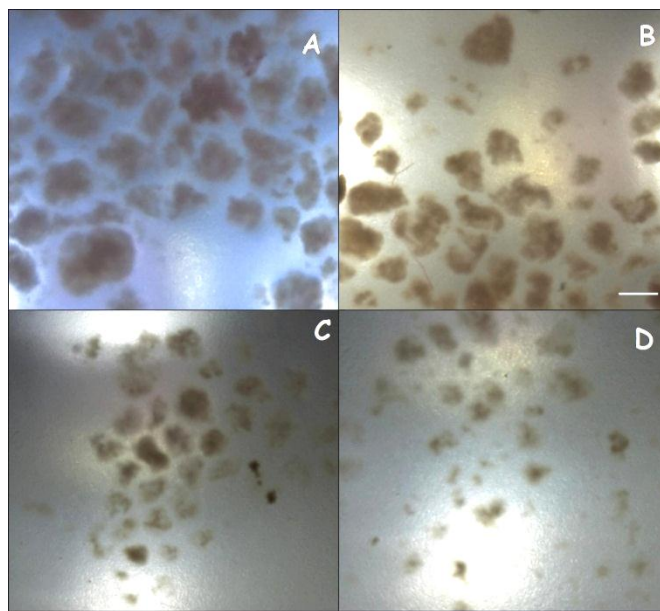
Figura 13. Cinéticas de degradación de 4CF por gránulos aerobios posterior al periodo de ayuno.

Tabla 4. Resumen de los parámetros operacionales de los reactores correspondientes a cada periodo de ayuno

Parámetro	Ayuno, h							
	0	24	48	72	96	120	144	168
IVL (mL/g)	21	10	14	16	15	15	13	10
VS (m/h)	11.83	5.09	3.40	3.18	3.18	2.55	4.24	4.24
q, g 4CF/g SSV/h	46.8	44.0	20	17.8	2.3	2.3	1.9	1.6
Tiempo de reacción, h	3	3	7	8	24	26	25	28



La estructura y forma del gránulo no se vio afectada por el ayuno en un periodo de 24 horas (Fig. 13B), al cabo de 96 los gránulos fueron disminuyendo en tamaño ( $685 \pm 196$ , Fig. 13C), hasta  $461 \pm 145$  (Fig. 13D) para 168 horas.



*Figura 13. Fotografías de los gránulos aerobios durante el ayuno. A: 0 h de ayuno, B: 24 h, C: 120h y D: 168 h, — 500  $\mu$ m.*

La integridad y la fuerza de los gránulos (Figura 10) inferida mediante el coeficiente de integridad, se ve comprometida a partir de 120 h de ayuno; para las 196 h el CI fue de 12%. Este valor refleja una baja fuerza de los gránulos para mantenerse agregados, esto es corroborado por un alto contenido de sólidos suspendidos en el efluente (120 mg/L). El coeficiente de integridad se redujo de 92 a 12% debido a los diferentes periodos de ayuno (Fig. 14), lo cual indica que los gránulos pierden la capacidad de permanecer agregados al estar expuestos a ayunos prolongados.

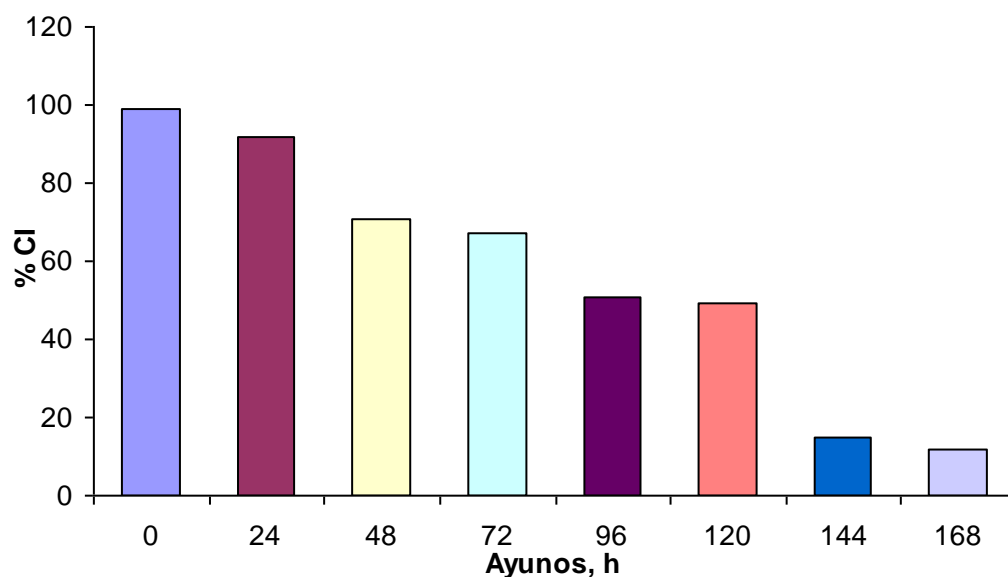


Figura 14. Valores del IC (%) de los gránulos aerobios posterior al periodo de ayuno.

De acuerdo al gráfico, el tamaño de los gránulos aerobios, posterior a períodos de ayuno (Figura 15) podemos ver que existe una tendencia a la disminución en el tamaño de los gránulos como respuesta al ayuno. Estudios a nivel de colonias así como a nivel individuo muestran una disminución en el tamaño en ambos debido a periodos cortos de ayuno, ejemplo de esto último es el trabajo realizado por Sanin *et al.* (2003), donde sometió una cepa de *Pseudomonas*, aislada de agua residual, a un ayuno de fuente de carbono y nitrógeno durante 4 semanas. Se tomaron micrografías electrónicas al principio y al final de 16 días de ayuno. Inicialmente la cepa de *Pseudomonas A*, presentaba una forma de bastón con dimensiones de 2.5 y 0.6  $\mu\text{m}$ ; posterior al periodo de ayuno presentó una forma esférica con un diámetro promedio inferior a 0.6  $\mu\text{m}$  al término de 16 días. En cuanto al ayuno de nitrógeno, la hidrofobicidad de la superficie celular fue menor y con ello la capacidad de agruparse disminuyó. Dado que en nuestro caso el ayuno consistía en la eliminación de toda fuente de energía, la presencia de nitrógeno también se vio afectada, y extrapolando lo encontrado por Sanin *et al.* (2003), es probable que la hidrofobicidad de la superficie celular haya disminuido y con ella la capacidad de agruparse de los gránulos aerobios por lo que esto pudo favorecer su disgregación, reflejado en la disminución del coeficiente de integridad (Figura 14).

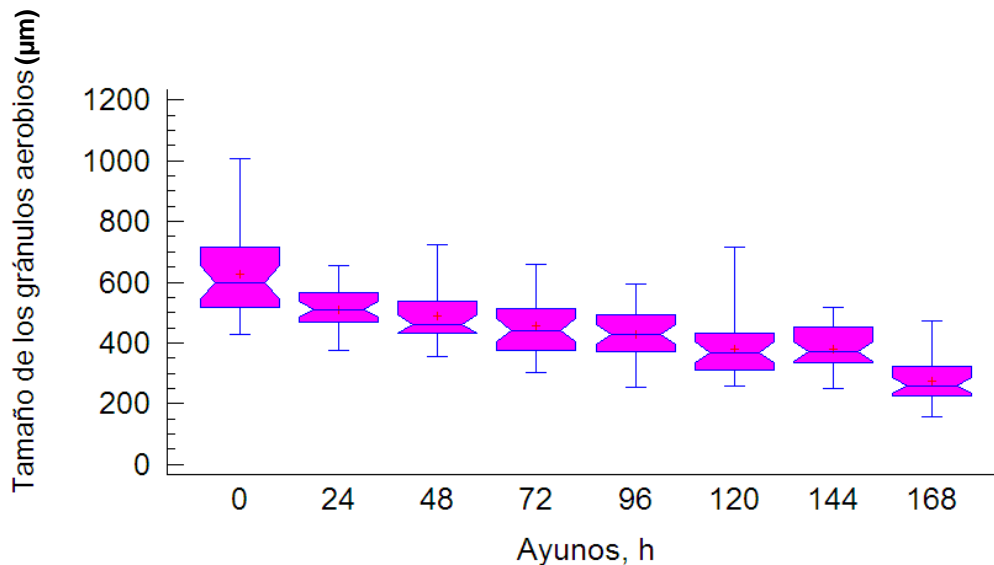


Figura 15. Variación del tamaño de los gránulos aerobios posterior a períodos de ayuno.

En general, se observó que los periodos cortos de ayuno, en este caso de 24 a 72 hrs, no afectaron la estabilidad de los gránulos aerobios, varios estudios han reportado que la granulación se ve favorecida por tiempos de ayuno durante este proceso (Tay *et al.*, 2001; Liu y Tay, 2008), ya que durante esta fase la superficie bacteriana es mas hidrofóbica lo cual facilita la agregación o adhesión de otras bacterias (Bossier y Verstraete 1996), como respuesta al estrés que provoca el ayuno. Como se puede observar en la tabla 4, el tamaño de los gránulos presentó fluctuaciones llegando a un máximo de  $866 \pm 260 \mu\text{m}$  durante un ayuno de 48 hrs.

Sin embargo en ayunos prolongados (>120 hrs), la integridad de los gránulos se ve comprometida (CI de 12%). Como se observa en la figura 13 el tiempo de degradación del 4CF fue mayor en ayunos prolongados, además de que la actividad respirométrica disminuyó hasta un 75%. Respuestas similares fueron obtenidas por Coello *et al.*, (2003), obteniendo una disminución del 50% en la actividad respirométrica de lodos activados en ayuno.

Un punto a notar es que durante el tercer día de ayuno no se observó afectada la actividad respirométrica, caso contrario en lo visto por Teuber y Brodish (1977),

quienes obtuvieron un decremento del 80% en la actividad respirométrica en lodos activados en los primeros tres días, lo cual nos sugiere una mayor estabilidad y resistencia al estrés generado por el ayuno en los gránulos aerobios comparado con los lodos activados.

A pesar de que la actividad degradadora en los gránulos aerobios fue disminuida, estos mantuvieron la capacidad de degradar el 4CF; estudios han demostrado que la actividad inicial de la biomasa puede ser recuperada a niveles estables como los existentes antes del ayuno (Buitrón y Moreno, 2004).

#### **6.4.2 Efecto de los picos de concentración sobre los gránulos aerobios**

Con el fin de determinar la capacidad degradadora de los gránulos aerobios a altas cargas de un compuesto inhibitorio como lo es el 4CF, los gránulos aerobios fueron sometidos a incrementos puntuales en la concentración inicial de 4CF (200, 400, 600, 800 y 1000 mg/L). El reactor fue normalmente operado a una concentración inicial del influente a 200mg 4CF/L (100 mg 4CF/L en el reactor). Una vez aclimatada y granulada la biomasa, se dio inicio a los experimentos de picos de concentración. Después de que un pico de concentración fue aplicado, el reactor fue operado a concentración normal (100 mg/L), hasta alcanzar las variables operacionales como antes del pico.

##### **6,4.2.1 Pico 200 mg 4CF/L**

Comparado con la operación estable del reactor, el duplicar la concentración de 4CF no afectó significativamente la eficiencia de remoción, se alcanzó una remoción mayor al 99% en 4 h (Figura 16). La tasa específica de remoción ( $q$ ) aumentó en un 150% (Tabla 5). El tiempo original de remoción de 4CF fue recuperado después del pico y los parámetros operacionales no presentaron cambios significativos.

La estabilidad de los gránulos no presentó efecto alguno al ser sometido al pico de concentración, el valor de CI se mantuvo mayor al 90% (Figura 17), lo que indica que presentan la fuerza suficiente para el mantenimiento de la forma granular por los microorganismos que constituyen el gránulo. En lo que respecta al tamaño de los gránulos no se encontraron diferencias significativas (Figura 18).

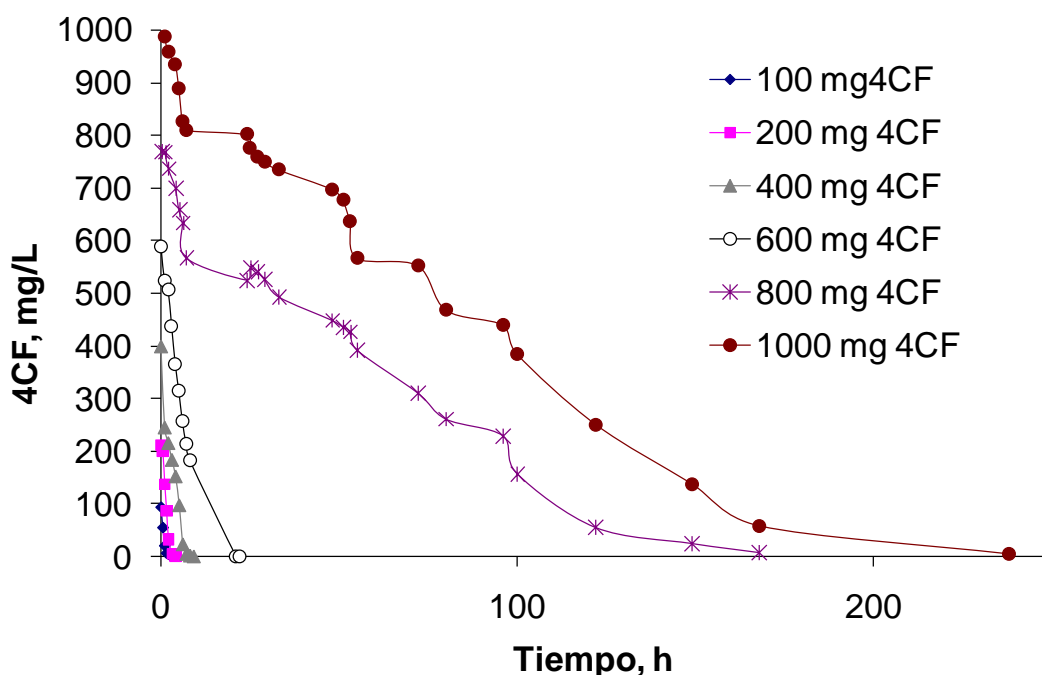


Figura 16. Cinéticas de degradación de 4CF durante la exposición de los gránulos aerobios a diferentes picos de concentración.

Tabla 5. Resumen de las características operacionales del reactor durante los picos de concentración de 4CF.

Parámetro	Picos de concentración					
	100	200	400	600	800	1000
4CF inicial, mg/L	100	200	400	600	800	1000
IVL, mL/g	21	29	23	27	31	30
VS, m/s	11.83	7.44	6.76	7.44	6.76	7.44
q, mg 4CF/gSSV/h	46.8	45.0	39.7	27.3	5.7	4.6
Tiempo total de reacción, h	3	4	9	22	168	238

#### **6.4.2.2 Pico 400 mg 4CF/L**

La eficiencia de remoción no se vio afectada (Figura 16) pero si el tiempo de degradación del 4CF, triplicándose para obtener una eficiencia mayor al 99%. Las eficiencias obtenidas concuerdan con lo observado por Buitron *et al.* (2003) cuando aplicaron una concentración similar de 4CF a lodos activados previamente aclimatados a 200 mg 4CF/L. Con respecto al tiempo, en su estudio no se encontraron diferencias significativas como en nuestro caso, lo cual sugiere que un factor importante es la concentración de 4CF a la que son aclimatados los microorganismos, cuando estos son sometidos a altas carga de concentración de 4CF.

Se observó una disminución en el valor del CI (78%) y con ello un aumento en los SST del efluente (65 mg/L). El tamaño de los gránulos también se vio afectado disminuyendo en un 27% (447  $\mu\text{m}$ , Figura 18). Tanto el tiempo de degradación como los parámetros operacionales se recuperaron como antes del pico de concentración.

#### **6.4.2.3 Pico 600 mg 4CF/L**

Como se muestra en la Figura 16, la remoción mayor al 99% de 4CF por los gránulos aerobios se obtuvo al cabo de 22 h. Durante la degradación del 4CF la actividad microbiana presentó un aumento del 50% (27.3 mg 4CF/gSSV/h). La mineralización del carbono orgánico total no fue completa (quedando un remanente de 13 mg/L de COT). El valor de CI disminuyó un 20% así como el tamaño de los gránulos (386  $\mu\text{m}$ , Figura 17). El tiempo original de degradación se recuperó a los 6 días posteriores al pico, así como los valores operacionales del reactor.

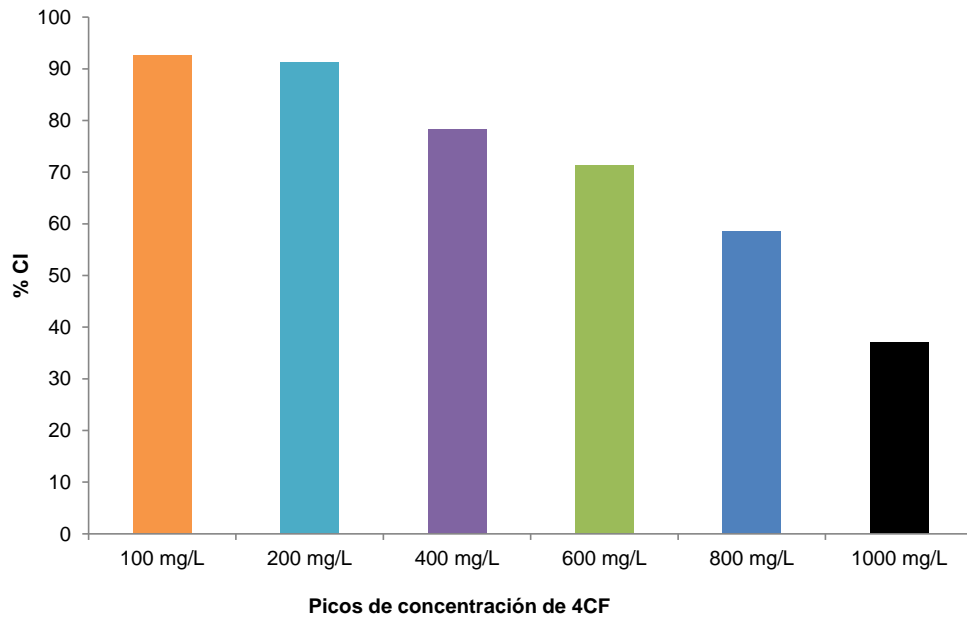


Figura 17. Coeficiente de integridad de los gránulos aerobios posterior a los picos de concentración.

Comparado con los lodos activados sometidos a la misma concentración de 4CF (Buitron *et al.*, 2003), el uso de gránulos aerobios presentó varias ventajas: i) un menor tiempo en la remoción de 4CF (>99%), ii) la mineralización fue mayor y iii) la estabilidad del reactor posterior al pico de concentración fue recuperada en un periodo corto de tiempo.

#### 6.4.2.4 Pico 800 mg 4CF/L

La eficiencia de remoción fue menor a la establecida (97%) con un tiempo de 168 h (Figura 16). La actividad degradadora de los gránulos aerobios fue disminuyendo conforme el paso del tiempo, indicando un efecto inhibitorio, al final del proceso se obtuvo una  $q$  de 5.7 mg 4CF/SSV/h. La mineralización fue incompleta (quedando un remanente de 43 mg/L de COT).

El tamaño de los gránulos disminuyó en un 60%, se observó una mayor disgregación de los gránulos (58% de CI, Figura 17) y con ello un aumento en la cantidad de SST del efluente (92 mg/L). La eficiencia de remoción de 4CF fue

recobrada como antes del pico al cabo de unos días no así el tiempo de remoción (6 h) y el resto de los parámetros operacionales.

#### **6.4.2.5 Pico 1000 mg 4CF/L**

La remoción de 4CF no fue mayor al 95% (Figura 16). Se observó un efecto inhibitorio del 4CF sobre de la actividad microbiana disminuyendo la  $q$  en un 75% (Tabla 5). La mineralización fue incompleta (remanente de 350 mg/L de COT) y el proceso se detuvo al cabo de 238 h.

Con respecto a la estabilidad de los gránulos tanto el valor del CI como el tamaño del gránulo se vieron afectados por el pico de concentración, disminuyendo ambos alrededor del 60%. Los gránulos aerobios presentaron un menor tamaño (Figura 19).

Los resultados obtenidos llevan a pensar que la estructura granular proporciona un mecanismo de defensa contra altas concentraciones de compuestos tóxicos, en este caso el 4CF. Esta propiedad hace a los gránulos aerobios una estrategia útil como inóculo para el arranque de sistemas de tratamiento de aguas residuales que contengan compuestos tóxicos.



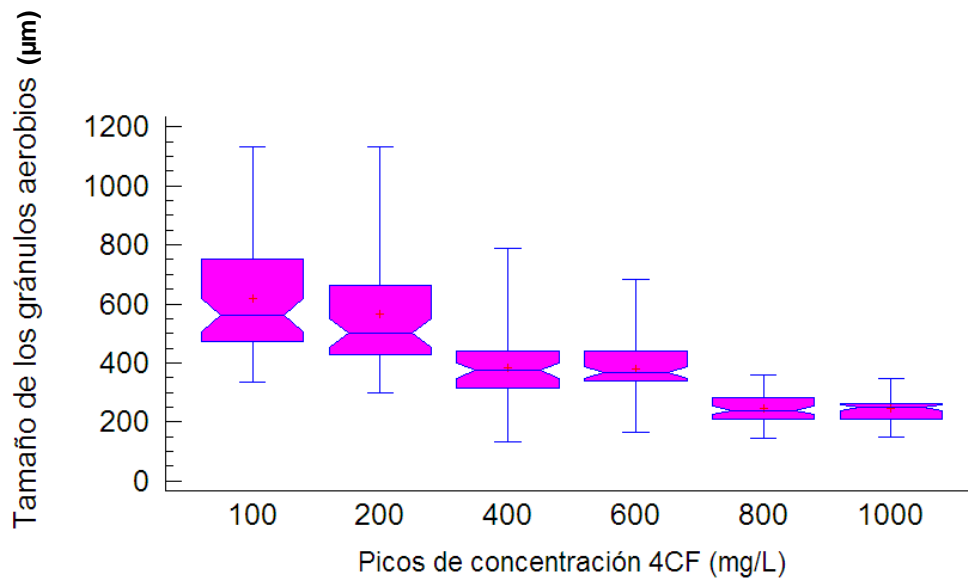


Figura 18. Variación del tamaño de los gránulos aerobio posterior al pico de concentración.

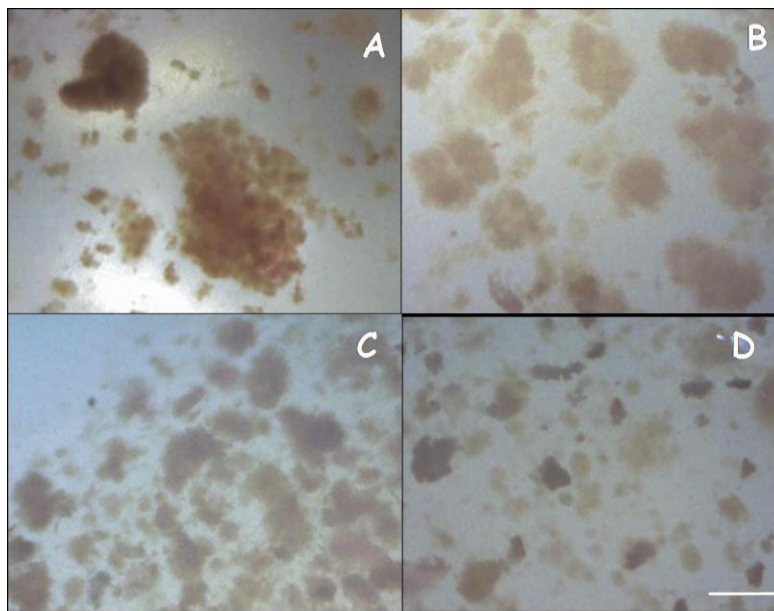


Figura 19. Fotografías de los gránulos aerobios sometidos a picos de concentración puntual de 4-CF. A: 100 mg/L, B: 200 mg/L C: 800 mg/L y D: 1000 mg/L. — 500 µm.

## 7. Conclusiones

---

Los gránulos aerobios cultivados en 4-CF presentaron una excelente sedimentabilidad y compactación, además de eficiencias de remoción mayores al 99%.

La aclimatación al 4-CF y el proceso de granulación favorece la selección de las bacterias especializadas en degradar el 4CF, así como aquellas capaces de agregarse. Se identificaron 14 secuencias, presentando una dominancia el phylum *Proteobacteria* (57%), el cual estaba representado en su mayoría por la clase  $\gamma$ -*proteobacteria* (8), seguida de  $\beta$ - *Proteobacteria* (3) y  $\delta$ - *Proteobacteria* (1). De acuerdo a la relaciones filogenéticas, se encontraron especies que han sido reportadas como bacterias desnitrificantes.

El ayuno prolongado ( $\geq 120$  h) afecta de manera negativa la actividad degradadora de los gránulos aerobios disminuyendo en un 75% la actividad metabólica, alargando el tiempo de la remoción de 4-CF. Tanto el tamaño como el CI se vieron comprometidos mostrando una disminución  $\geq 50\%$  y 87%, respectivamente.

Los picos de concentración no mayores a 600 mg/L 4-CF aumentaron la tasa específica de degradación hasta un 150%. Concentraciones mayores afectaron negativamente la eficiencia de remoción de 4-CF, mostrando al final del proceso efecto inhibitorio sobre los gránulos aerobios. La estabilidad de los gránulos aerobios presento efectos negativos a concentraciones mayores a 600 mg/L 4-CF, disminuyendo el valor del CI hasta un 55%.

## 8. REFERENCIAS

---

- Adav S.S, Lee D.J. (2008). Physiological characterization and interactions of isolates in phenol-degrading aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78, 899–905.
- Adav S.S, Lee D.J, Lai J.Y. (2010) Microbial community of acetate utilizing denitrifiers in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85, 753–762.
- Adav S.S, Lee D.J, Show K.Y, Tay J.H. (2008) Aerobic granular sludge: Recent advances. *Biotechnology Advances*. 26, 411–423.
- Adav S.S, Lee D.J, Tay J.H. (2007). Activity and structure of stored aerobic granules. *Environmental Technology*. 28, 1227–1235.
- Alves M., Cavaleiro A.J., Ferreira E.C., Amaral A.L., Mota M., da Motta M., Vivier H., Pons M.N. (2000). Characterization by image analysis of anaerobic sludge under shock conditions, *Water Science and Technology* 41, 207-214.
- Annachhatre A.P., Gheewala S.H. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnology Advances*. 14 (1), 35-56.
- APHA (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. 21th ed., Port city press. Baltimore, Maryland.
- Beun J.J., van Loosdrecht M.C.M, Heijnen J.J. (2002). Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research*. 36, 702-712.
- Bossier P., Verstraete W. (1996). Triggers for microbial aggregation in activated sludge? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45 (1-2), 1-6.
- Bruland N., Bathe S., Willems A., Steinbuchel A. (2009). *Pseudorhodofera soli* gen. nov., sp. nov. and *Pseudorhodofera caeni* sp. nov., two members of the class *Betaproteobacteria* belonging to the family *Comamonadaceae*.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59, 2702-2707.
- Buitrón G., Moreno J. (2004). Modeling of the acclimation/deacclimation processes of a mixed culture degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology* 49 (1), 79-86
- Buitrón, G., Schoeb, M.-E., Moreno, J. 2003. Automated Sequencing Batch Bioreactor Under Extreme Peaks of 4-Chlorophenol. *Water Science and Technology*. 47 (10), 175–181.
- Carucci, A., S. Milia, G. De Gioannis and M. Piredda. (2008) Acetate-fed aerobic granular sludge for the degradation of chlorinated phenols. *Water Science and Technology*, 58, 309-315.
- Coello M.D., López-Ramírez J.A., Sales D., Quiroga J.M. (2003). Evolution of an activated sludge system under starvation conditions. *Chemical Engineering Journal*. 94, 139-146.
- Colwell R.R., Walker, R.D. (1977). Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Critical Reviews in Microbiology*. 5, 423-445.
- CONAGUA. 2011. Estadísticas del agua en México. Edición 2011. Capítulo 4to. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- Commandeur L.C.M., Parson J.R. (1990). Degradation of halogenated aromatic compound. *Biodegradation*. 1, 207-220.
- Copley S.D. (1997). Diverse mechanistic approaches to difficult chemical transformations: microbial dehalogenation of chlorinated aromatic compounds. *Chemistry and Biology*. 4, 169-174.
- Daphne L.S. (1994). Hazardous organic waste amenable to biological treatment. *En Biotechnology for the Treatment of Hazardous Waste*, 1-26. D.L: Stoner, Ed. Chelsea, MI. Lewis Publishers.
- Davi LM., Gnudi F. (1999). Phenolic compounds in surface water. *Water Research*. 33 (14), 3213-3219.

- de Kreuk M.K, McSwain B.S, Bathe S, Tay S.T.L., Schwarzenbeck T., Wilderer P.A. (2005). Discussion outcomes, Aerobic Granular Sludge. Water and Environmental Management Series. IWA Publishing. 165-169.
- de Kreuk M.K., van Loosdrecht M.C.M. (2004) Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. Water Science and Technology. 49 (11-12), 9-17.
- de Weert J., Viñas M., Grotenhuis T., Rijnaarts H., Langenhoff A. (2010). Aerobic nonylphenol degradation and nitro-nonylphenol formation by microbial cultures from sediments. Applied Microbiology and Biotechnology. 86, 761–771.
- Erijman L., Figueroa E.L., Guerrero M., Leandro D., Ayarza Y., Joaquín M. (2011). Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes. Revista Argentina de Microbiología. 43, 127-135 .
- Estrada-Vázquez, C. (2003) Remoción biológica de compuestos tóxicos por tratamiento en reactores de lecho fluidizado de ambiente híbrido (REL FAMHI). Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN xxii, 264.
- Etchebere C., Errazquin M.I., Dabert P., Moletta R., Mixí L. (2001). Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. FEMS Microbiology Ecology. 35, 259-267.
- Farrell A., Quilty B. (2002) The enhancement of 2-chlorophenol degradation by a mixed microbial community when augmented with *Pseudomonas putida* CP1. Water Research. 36 (10), 2443-2450.
- Figuerola E.L, Erijman L. (2007) Bacterial taxa abundance pattern in an industrial wastewater treatment system determined by the full rRNA cycle approach. Environmental Microbiology. 9, 1780-1789.
- Garibay-Orijel C. Rios-Leal E. García-Mena J., Poggi-Varaldo H.M (2005). 2,4,6-Trichlorophenol and phenol removal in methanogenic and partial-aerated methanogenic conditions in a fluidized bed bioreactor. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 80 (10), 1180-1187.

- Ghangrekar M.M., Asolekar R.S., Ranganthan R. K., Joshi G. (1996). Experience with UASB reactor start-up under different operating conditions. *Water Science and Technology*. 34(5), 421-428.
- Grady C.P.L. Jr., Daigger G.T., Henry L.C. (1999) *Biological Wastewater Treatment*. 2<sup>nd</sup>, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Henze M., Harremoës P., la Cour Jansen J., Arvin E. (2002). *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*. Third, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Jang A., Yoon Y-H., Kim I.S., Kim K-S., Bishop P.L. (2003). Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor. *Journal of Biotechnology*. 105, 71-82.
- Jiang H.L., Tay J.H., Tay S.T.L. (2002) Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. *Letters in Applied Microbiology*. 35, 439–445.
- Jiang H-L., Tay J-H., Maszenan.A. M., Tay S. T-L. (2004). Bacterial Diversity and Function of Aerobic Granules Engineered in a Sequencing Batch Reactor for Phenol Degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 6767–6775.
- Juang Y-C., Adav S.S., Lee D.J., Lai J.Y. (2009). Biodiversity in aerobic granule membrane bioreactor at high organic loading rates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85, 383–388.
- Kapley A., Purohit H.J. (2009). Diagnosis of treatment efficiency in industrial wastewater treatment plants: a case study at a refinery ETP. *Environmental Science & Technology*. 43, 3789-3795.
- Leahy J.G., Colwell R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 54, 305-315.
- Lemaire R., Webb R.I., Yuan Z. (2008). The Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater *ISME Journal* 2, 528–541.

- Li A.-J., Yang S.-F., Li X.-Y., Gu J.-D. (2008). Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. *Water Research*. 42 (13), 3552-3560.
- Liu Y, Xu H.L, Show K. Y, and Tay J. H, (2002). Anaerobic granulation technology for wastewater treatment, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18, 99–113.
- Liu Y., Tay J. H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge, *Water Research*. 36, 1653–1665.
- Liu Q.S., Tay J.H., Liu Y. (2003). Substrate concentration-independent aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *Environmental Technology*. 24, 1235–1242.
- Liu Y., Tay J.H. (2004). State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*. 22, 533-63.
- Liu Y. y Tay J.H. (2008). Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*. 99, 980–985.
- Lin Y.M., Liu Y., Tay J.H. (2003). Development and characteristics of phosphorus-accumulating microbial granules in sequencing batch reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62, 430–435.
- Loffhagen, N., Härtig C., Babel W. (2004). *Pseudomonas putida* NCTC 10936 balances membrane fluidity in response to physical and chemical stress by changing the saturation degree and the trans/cis ratio of fatty acids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 68 (2), 322-328.
- Lozada M., Itria R., Figuerola E., Tullio L., Erijman L. (2004). Dinámica, Selección y Estabilidad de Poblaciones Bacterianas en Barros Activados. <http://www.ingenieroambiental.com/4014/lozada.pdf>,
- Madsen, T. and Licht, D. (1992). Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2874-2878.

- Martins A.M.P., Pagillac K, Heijnen J. J., van Loosdrecht M.C.M. (2004). Filamentous bulking sludge-a critical review. *Water Research*. 38, 793–817.
- McSwain B. S., Irvine R. L., Wilderer P. A. (2004). The effect of intermittent feeding on aerobic granule structure. *Water Science and Technology*. 49, 19-25.
- Merck (2005) Chemdat v2.13.2.
- Morgenroth E., Sherden T., Van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J.J., Wilderer P. A. (1997). Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Research*. 31, 3191-4.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2004). Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology*. 50 (10), 251-258.
- Movahedian, H. Assadi, A., Amin M.M. (2008) Effects Of 4-Chlorophenol Loadings On Acclimation Of Biomass With Optimized Fixed Time Sequencing Batch Reactor. *Iran Journal of the Environmental and Health Science. Eng.* 5 (4), 225-234.
- Bruland N., Bathe S., Willemsand A., Steinbüchel A.(2009). *Pseudorhodofera* *soli* *gen. nov., sp. nov.* and *Pseudorhodofera caeni* *sp. nov.*, two members of the class *Betaproteobacteria* belonging to the family *Comamonadaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 2702-2707.
- Ng H.Y., Hermanowicz S.W. (2005). Membrane Bioreactor Operation at Short Solids Retention Times: Performance and Biomass Characteristics. *Water Research*. 39 (6), 981-992.
- NOM-ECOL-001-1996 (Norma Oficial Mexicana 1997), que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Publicado en el diario oficial de la federación: 23 de abril de 2003.
- Noyola A. (2004) una experiencia en el desarrollo de tecnología biológica para el tratamiento de aguas residuales. En: Bolívar, Z.F. (Ed) *Fundamentos y casos*



- exitosos de la biotecnología moderna. El Colegio Nacional México. DF pp.599-621.
- OMS. (1996). Chlorophenols in Drinking-water in: Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol.2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1996.
- Pavan P., Cavinato C., Bolzonella D., Cecchi F. (2007). Biomass dewaterability, filterability and settleability in a membrane bioreactor operated with different sludge ages. *Water Practice & Technology* 2 (1),
- Peng D., Bernet N., Delgenes J.P., Moletta R. (1999) Aerobic granular sludge-a case report. *Water Research*. 33, 890–893.
- Pritchard, P.H., O'Neill, E.J., Spain, C.M., Ahern, D.J. (1987). Physical and biological parameters that determine the fate of p-chlorophenol in laboratory test systems. Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Atlanta, Georgia.
- Qin L., Liu Y., Tay J.H. (2004b). Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochemical Engineering Journal*. 21, 47–52.
- Qin L., Tay J.H., Liu Y. (2004a). Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Process Biochemistry*. 39, 579–584.
- Quiroz H., Rodríguez A., Solís C. (2006). Contaminación del agua en: Quiroz, H. Rodríguez A. Bioindicadores de contaminación en sistemas acuáticos (Insectos acuáticos). UANL, pp.18-25.
- Ramalho R.S. (1991). Tratamiento de Aguas Residuales. Editorial reverté. Canadá.
- Sanin S.L., Sanin F.D., Bryers J.D. (2003). Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry* 38, 909–914.
- Sawer C.N., McCarty P.L. and Parking G.F (2001). Química para ingeniería ambiental, 4 edición. Mc Graw Hill, Mexico, p 248.
- Schulze R., Spring S., Amann R., Huber I., Ludwig W., Schleifer K.-H., Kampfer P. (1999) Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated

- sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology. 22 (2), 205-214.
- Scott J.P., Ollis, D.F. (1995). Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: review and recommendation. Environmental Progress. 14, 88-103.
- Schwarzenberck N., Erley R., McSwain B.S., Wilderer P.A., Irvine R.L. (2004). Treatment of malting wastewater in a granular sludge sequencing batch reactor (SBR). Acta Hydrochimica et Hydrobiologica. 32, 16-24.
- Schwarzenbeck N., Borges J.M., Wilderer P.A. (2005). Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. Applied Microbiology and Biotechnology. 66, 711–718.
- Su K.Z., Yu H.Q. (2005). Formation and characterization of aerobic granules in a sequencing batch reactor treating soybean-processing wastewater. Environmental Science and Technology. 39, 2818-2827.
- Tay J.-H., Ivanov V., Pan S., Tay S.T.-L. (2002). Specific layers in aerobically grown microbial granules Letters in Applied Microbiology. 34, 254–257.
- Tay JH, Q. S. Liu, and Y. Liu, (2001). Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. Journal of Applied Microbiology. 91, 168–175.
- Tay S.T.L., Benjamin Y.P.M., Jiang H.L., Tay J.H. (2005). Rapid cultivation of stable aerobic phenol-degrading granules using acetate-fed granules as microbial seed. Journal of Biotechnology. 115, 387–395.
- Ten L.N., Jung H.M., Im W.T., Yoo S.A., Oh H.M., Lee S.T. (2009). *Lysobacter panaciterrae* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 59, 958-963.
- Teuber M., Brodish K.E.V. (1977). Enzymatic activities of activated sludge. Applied Microbiology and Biotechnology 4, 185–194.
- Thierry S., Macarie H., Iizuka T., Geißdörfer W., Assih E.A., Spanevello T., Verhe, Pierre F., Fudou R., Monroy O., Labat M., Ouattara A.S. (2004). *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis*

- sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas Finkmann* et al. 2000 and of its type species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 2245–2255.
- Tsuneda S., Ogiwara M., Ejiri Y. and Hirata A. (2006). High-rate nitrification using aerobic granular sludge. *Water Science and Technology*. 53 (3), 147-154.
- Val del Río A., Figueroa M., Arrojo B., Mosquera-Corral A., Campos J.L., García-Torriello G., Méndez R.J. (2012.) Aerobic granular SBR systems applied to the treatment of industrial effluents. *Journal of Environmental Management*. 95, S88- S92.
- Valera D.V. (2006). Obtención de un consorcio microbiano granular para la biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuencial. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo, 2006.
- Wang F., Liu Y.-H., Yang F.L. Zhang X.W. y Zhang H. M (2005). Study on the stability of aerobic granules in a SBR-effect on the superficial upflow air velocity and carbon source. *Water and Environmental Management Series*. IWA Publishing. Munich, pp 35-42.
- Wang Q., Du G., Chen J. (2004). Aerobic granular sludge cultivated under the selective pressure as a driving force. *Process Biochemistry*. 39, 557–563.
- Weber S.D., Ludwig W., Schleifer K.H., Fried J. (2007). Microbial composition and structure of aerobic granular municipal wastewater biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6233–6240.
- Whiteley A.S., Bailey M.J. (2000). Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2400–2407.
- Yang S.F., Liu Y., Tay J.H. (2003). A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater. *Journal of Biotechnology*. 106, 77–86.

Young L.Y., Cerniglia C. (1995). Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. New-york, NY: Wiley-Liss, pp 389-434.