



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Espectro de infrarrojo en el análisis de *biofilms*
bacterianos para tratamiento de aguas residuales.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A :

Flor Tania Escárcega Olivares



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Oscar González Barceló
2014**



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.

DEDICATORIA.

A mis padres por apoyarme en el camino que elegí para emprender mi vida, gracias a esa ciega confianza he logrado alcanzar esta meta; a mis hermanos por su compañía, consejo y tolerancia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las personas que me recibieron y me introdujeron en este campo: al Doctor Oscar González Barceló (mi tutor) por su paciencia y enseñanza durante el desarrollo de mi tesis; a Alejandro Cocolletzi por su amistad y apoyo desde mi llegada al Instituto de Ingeniería, a las Doctoras Lucero Cobos Becerra y Rosalinda Campuzano por sus asesorías dentro y fuera del laboratorio y mi introducción al análisis de aguas; a la Maestra Leonor Araoz por recibirme y enseñarme lo básico en análisis de aguas; al Ingeniero Roberto Briones por su amabilidad, así como a la Maestra Diana Aguirre por su gentileza y asesoría en el uso del espectroscopio.

Estoy muy contenta por las amistades que gané durante mi estancia en el Instituto, y por aquellas a las que reencontré y me hicieron disfrutar durante ésta época de trabajo y aprendizaje. A Isaac por hablarme y darme esa pauta de confianza, a Mayra por ser tan cálida, a Claudia y Reina por ser muy risueñas, a Anyuli, con quien compartí algunos días de horas extras en el laboratorio y el Maestro José Luis, que siempre fue muy amable.



RESUMEN

El agua es un recurso actualmente limitado, su mayor demanda implica una menor disponibilidad, por lo cual su tratamiento para ser reutilizada es de trascendental importancia. El desarrollo de reactores para el tratamiento de aguas residuales y la forma de analizar los parámetros de remoción de nutrientes implica el desarrollo de métodos y tecnologías para optimizar la medición de parámetros de operación. En la presente tesis se plantea una metodología de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier y reflectancia totalmente atenuada (ATR-FTIR) para el análisis del comportamiento y desarrollo de *biofilms* microbianos que crecen en un medio de soporte para el tratamiento de aguas residuales.

Se logró la remoción de nutrientes en un agua residual modelo con el crecimiento de biomasa en dos reactores a escala laboratorio. Dicha biomasa creció formando *biofilms* microbianos, los cuales fueron analizados por espectroscopia ATR-FTIR durante el tiempo de operación de los reactores. Estos análisis mostraron la presencia de grupos funcionales asociados a estructuras de proteínas, lípidos y ácidos grasos, entre otros compuestos que forman parte de la matriz extracelular de *biofilms* microbianos, así como compuestos formadores de la pared celular en bacterias.

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	ix
Lista de ecuaciones	ix
1. Introducción	1
1.1. Crecimiento de <i>biofilms</i> microbianos sobre estructuras de soporte	3
1.1.1. Definición de <i>biofilm</i>	3
1.1.2. Composición de <i>biofilms</i> -microbianos.....	4
1.1.3. Estructura del <i>biofilm</i>	6
1.1.4. Importancia de proteínas en un <i>biofilm</i>	8
1.1.5. Técnicas para el análisis de <i>biofilms</i>	9
1.2. Espectroscopia infrarrojo.	10
1.2.1. Espectroscopia FT-IR en el análisis de estructuras celulares.....	11
1.2.2. Espectroscopia por reflectancia totalmente atenuada (ATR).....	13
1.3. Reactores aerobios en el tratamiento de aguas residuales	14
1.3.1. Tipos de reactores biológicos.....	14
1.3.2. Reactores aerobios de lecho empacado	15
1.3.3. Características del medio filtrante.....	16
1.3.4. Carga orgánica en el reactor.....	16
1.4. Hipótesis	18
1.5. Objetivos generales	18
1.5.1. Objetivos particulares.....	18
1.6. Justificación	19
1.7. Alcances	19
2. Materiales y métodos	20
2.1.- Medio de soporte para crecimiento de <i>biofilms</i>	20
2.2. Configuración de reactores.....	20
2.3. Porosidad del medio filtrante.....	22
2.4. Carga orgánica y caudal.	23
2.5. Composición del agua residual	24
2.6. Retrolavado	25
2.7. Análisis de <i>biofilms</i> bacterianos por espectroscopia ATR-FTIR	26
2.8. Preparación de muestras	27
2.9. Colecta de muestras	27
2.10. Procesamiento de las muestras	27
2.10.1. Muestras blanco	28
2.10.2. Muestras tratadas por desecación.....	28
2.10.3. Muestras tratadas con (NH ₄) ₂ SO ₄	29
3. Resultados y discusión.....	30
3.1. Comportamiento de la biomasa en los reactores	30
3.1.1. Tiempo de retención celular (TRC)	30
3.1.2. Determinación de SST	31

3.1.3. DQO en los reactores.....	<u>33</u>
3.2. Remoción de nutrientes	<u>34</u>
3.2.1. Remoción de DQO en los reactores A y B.....	<u>34</u>
3.2.2. Determinación de nitrógeno orgánico.	<u>36</u>
3.2.3. Determinación de ortofosfatos.	<u>37</u>
3.3. Espectros de referencia.....	<u>40</u>
3.3.1. Acetato de sodio	<u>40</u>
3.3.2. Sulfato de amonio.....	<u>41</u>
3.3.3. Bacterias liofilizadas	<u>42</u>
3.2.4. Albúmina sérica.....	<u>44</u>
3.4. Espectros del <i>biofilm</i>	<u>46</u>
3.4.1. Reactor A	<u>46</u>
3.4.1.1. Muestras secas.....	<u>46</u>
3.4.1.2. Muestras tratadas con (NH ₄) ₂ SO ₄	<u>51</u>
3.4.2 Reactor B	<u>55</u>
3.4.2.1. Muestras secas.....	<u>55</u>
3.4.2.2. Muestras tratadas con (NH ₄) ₂ SO ₄	<u>58</u>
3.5. Grupos funcionales encontrados en el <i>biofilm</i>	<u>61</u>
4. Conclusiones	<u>63</u>
5. - Bibliografía	<u>65</u>
6. Anexos.....	<u>71</u>
Capítulo 1 Parámetros de medición en aguas residuales	<u>71</u>
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	<u>71</u>
Demanda química de oxígeno (DQO)	<u>71</u>
Determinación de Sólidos suspendidos (SS).....	<u>71</u>
Sólidos suspendidos Totales (SST).....	<u>72</u>
Sólidos totales (ST)	<u>72</u>
Sólidos Totales (SVT).....	<u>72</u>
Determinación de ortofosfatos	<u>72</u>
Comparación de técnicas para analizar biofilms microbianos.....	<u>73</u>
Capítulo 2	<u>67</u>
2.1. Polietileno de baja densidad como material de empaque	<u>75</u>
2.2. Caracterización del material de empaque.....	<u>75</u>
2.3. Configuración de reactores.	<u>79</u>
2.4. Porosidad del medio filtrante.	<u>79</u>
2.5. Carga orgánica y caudal	<u>81</u>
2.6. Llenado del lecho filtrante.....	<u>82</u>
2.5. Crecimiento de biomasa en los reactores	<u>83</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Imagen de microscopia electrónica de barrido de un <i>biofilm</i> microbiano	4
Figura 1.2. Esquema representativo de la estructura de un <i>biofilm</i> microbiano	8
Figura 1.3. Esquema representativo de funcionamiento del accesorio ATR.....	13
Figura 1.4. Esquema de reacción a través de diferentes tipos de reactores. .	15
Figura 2.1. Diseño de reactores a escala laboratorio de lecho sumergido con flujo ascendente.....	21
Figura 2.2. Esquema de la disposición del material de empaque en el diseño de reactor.	21
Figura 2.3. Esquema representativo de la configuración operativa de reactores A y B.	26
Figura 3.1. TRC obtenidos a lo largo del proceso en los reactores A y B. ..	31
Figura 3.2. Comparación de Sólidos suspendidos totales durante el proceso de operación de los reactores A y B.....	32
Figura 3.3. Comportamiento de los Sólidos Suspendidos Totales en los reactores A y B durante el proceso de operación.....	32
Figura 3.4. SST dentro de los reactores A y B.....	33
Figura 3.5. Comportamiento de la DQO en el efluente y el contenido de los reactores A y B durante el proceso.....	34
Figura 3.6. DQO en el efluente de reactores A y B durante el proceso de filtración.	35
Figura 3.7. DQO en el efluente y contenido de reactores A y B.....	35
Figura 3.8. DQO en el canal de exceso de biomasa respecto al efluente.....	36
Figura 3.9. Comparación del Nitrógeno orgánico presente en el sistema de lecho empacado con respecto al efluente en los reactores A y B a lo largo del proceso.	37

Figura 3.10. Ortofosfatos en contenido y efluente de reactores A y B.	38
Figura 3.11. Comparación de ortofosfatos presentes dentro del sistema de filtración con respecto al efluente en los reactores A y B.	39
Figura 3.12. Espectro obtenido de la muestra de acetato de sodio en polvo.....	40
Figura 3.13. Espectros de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a diferentes concentraciones, comparados con espectro de amonio en transición de fase sólida.....	41
Figura 3.14. Espectros de bacterias liofilizadas en diferentes concentraciones y tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 100% comparadas con muestra blanco de sulfato de amonio Al 100%.	43
Figura 3.15. Acercamiento a los espectros de bacterias liofilizadas a diferentes concentraciones.....	44
Figura 3.16. Espectros de albúmina sérica a diferentes concentraciones y comparación con muestra blanco de sulfato de amonio.	45
Figura 3.17. Espectro obtenido del <i>biofilm</i> en el reactor A.....	47
Figura 3.18. Comparación de los espectros del RA del día 31 al 59 del proceso.	49
Figura 3.19. Espectros obtenidos por tratamiento con sulfato de amonio al 70% comparados con espectros de muestras blanco.	52
Figura 3.20. Comparación de los espectros obtenidos con el tratamiento de sulfato de amonio al 100% y muestras blanco.....	54
Figura 3.21. Comparación de los espectros de <i>biofilm</i> obtenidos del reactor B en los días de proceso 34 a 59 y muestras blanco.....	56
Figura 3.22. Comparación de los espectros obtenidos del biofilm del reactor B durante el proceso.	58
Figura 3.23. Comparación de los espectros de <i>biofilm</i> obtenidos del reactor B y tratados con la sal de sulfato de amonio al 70% comparados con muestras blanco.	59
Figura A.1. Imágenes de piezas con microscopio estereoscópico y representación geométrica de una unidad de polietileno de baja densidad..	69

Figura A.2.	72
Figura A.2.1. Configuración y funcionamiento de los reactores.....	72
Figura A.3. Medio de soporte colmatado de biomasa.....	83

LISTA DE TABLAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
Tabla 1.1. Componentes de biofilm microbiano	5
Tabla 2.1. Composición de agua residual municipal sintética	24
Tabla 3.5. Grupos funcionales encontrados en el biofilm.....	62
Tabla A1.2. Comparación de técnicas para caracterizar compuestos de <i>biofilms</i> microbianos.....	73
Tabla A.1. Área superficial calculada en unidades de polietileno de baja densidad.....	78
Tabla A.2. Peso promedio de pellets de polietileno de baja densidad	77

LISTA DE ECUACIONES

<i>Número</i>	<i>Página</i>
Ecuación 2.1.....	23
Ecuación 3.1.....	30
Ecuación 3.2.....	30
Ecuación 3.3.....	34
Ecuación A.1.....	69
Ecuación A.2.....	69
Ecuación A.3.....	69
Ecuación A.4.....	69
Ecuación A.5.....	72
Ecuación A.6	73
Ecuación A.7	73
Ecuación A.8	73
Ecuación A.9	73
Ecuación A.10	73
Ecuación A.11	74
Ecuación A.12	74
Ecuación A.13	74
Ecuación A.14	74
Ecuación A.15	74

Ecuación A.16.....74
Ecuación A.17.....75
Ecuación A.18.....75

Ecuación A.1975
Ecuación A.2075

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso renovable que se encuentra limitado. El crecimiento poblacional implica una mayor demanda de este recurso, y por lo tanto una menor disponibilidad. Por esta razón el tratamiento de aguas residuales es prioritario a nivel mundial (Romero *et al.*, 2009).

La Ley de Aguas Nacionales de México (2013) define a las aguas residuales como “aguas de composición variada que provienen de las descargas de uso público urbano, doméstico, industrial, comercial, de servicios, agrícola, pecuario, de las plantas de tratamiento, y en general de cualquier uso así como la mezcla de ellas”.

El principal objetivo del tratamiento de agua residual consiste en remover contaminantes que están presentes de forma orgánica e inorgánica, como partículas suspendidas o disueltas; con el fin de alcanzar una calidad para su descarga o reutilización. Esto se logra mediante operaciones físicas y procesos químicos y biológicos (Noyola *et al.*, 2013).

Los reactores biológicos para el tratamiento de aguas residuales se pueden clasificar en dos de acuerdo a las características de crecimiento microbiano (Metcalf, y Eddy, 2003):

- a) Reactores de crecimiento fijo, en los cuales la biomasa constituida por bacterias forma una película sobre un material de soporte.
- b) De crecimiento suspendido, en los cuales las bacterias forman gránulos o flóculos al crecer en suspensión. Estas estructuras deben permanecer en el reactor y no ser lavadas en el efluente, de esta manera, el proceso depende en gran medida de la capacidad del inóculo para formar estas estructuras.

Debido a la enorme complejidad de los procesos que se llevan a cabo en plantas de tratamiento de aguas residuales, es necesario implementar herramientas, que permitan describir el comportamiento biológico de forma cualitativa y cuantitativa. Estos procesos consisten en transformaciones bioquímicas realizadas por los microorganismos formadores del sistema durante su crecimiento (Serrano, 2004).

Cada una de las especies presentes en estos sistemas forma parte de una dinámica compleja, en donde el papel que desempeña cada una depende de factores como tiempo de retención celular (TRC), así como de las interacciones bioquímicas y físicas presentes, que intervienen en la formación de estructuras como *biofilms* o

biopelículas y su grado de adherencia o elasticidad, incluyendo la facilidad de adhesión a membranas y capacidad de crecimiento (Humbert y Quilès, 2011).

La formación de *biofilms* microbianos es un fenómeno común en algunos materiales cuando estos están en contacto con fluidos orgánicos o que les sirven como sustrato; la formación de *biofilms* se da comúnmente alrededor de una matriz de exo-polisacáridos (Mendoza Hernández *et al.*, 2008). En muchos trabajos se ha descrito de manera general la forma en la que se compone un *biofilm*; describiendo una parte elástica en estas estructuras constituida por una matriz, en la cual se encuentran diversos tipos de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

Durante el proceso de lisis celular, se produce materia orgánica particulada, de la cual una fracción es inerte; y materia orgánica de lenta biodegradación. Los residuos de esta materia forman también parte de la estructura de un *biofilm*.

Para medir la cantidad de sustrato degradado o el crecimiento de microorganismos en reactores, se han utilizado toda una serie de técnicas, que van desde métodos respirométricos, identificación bioquímica y molecular de los compuestos y organismos presentes, hasta el uso de la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).

El análisis por espectroscopia, actualmente cuenta con dispositivos como el de Reflectancia totalmente atenuada que permite el análisis de muestras sin la necesidad de procesarlas previamente (Stuart, 2004).

1.1. CRECIMIENTO DE *BIOFILMS* MICROBIANOS SOBRE ESTRUCTURAS DE SOPORTE

En la naturaleza crecen muchos microorganismos sobre interfaces húmedas formando *biofilms*; la formación de estas fenómeno común en algunos materiales cuando estos están en contacto fluidos naturales; la formación de *biofilms* se da comúnmente matriz de exo-polisacáridos (Mendoza-Hernández *et al.*, 2008)

1.1.1. Definición de *biofilm*

Un *biofilm* es definido como poblaciones de microorganismos adheridos entre sí a una matriz extracelular que crece sobre alguna superficie o interface (Garip, 2005)

La formación de *biofilms* microbianos ocurre porque la mayoría de las especies de microorganismos, especialmente bacterias, bajo determinadas condiciones de cultivo secretan sustancias mucoides de alto peso molecular (Lembre *et al.*, 2012) (Figura 1.1)

Cuando estas sustancias permanecen asociadas con las células muchas veces forman estructuras llamadas cápsulas, vainas o capas delgadas. Las cápsulas y vainas son capas externas bien definidas de la pared celular, se acomodan en gran cantidad fuera de la pared celular y se difunden en el medio (Naumann, 2000).

Los *biofilms* que tienen una mayor tensión (fuerzas tangenciales o de corte) tienden a adherirse con una mayor fuerza y tener una matriz más resistente formada de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que aquellos que crecen con una menor tensión. Esto debido a que los polisacáridos brindan una mayor flexibilidad (Lembre *et al.*, 2012). Podemos decir que la flexibilidad de la matriz varía en respuesta a la fuerza aplicada en ella.

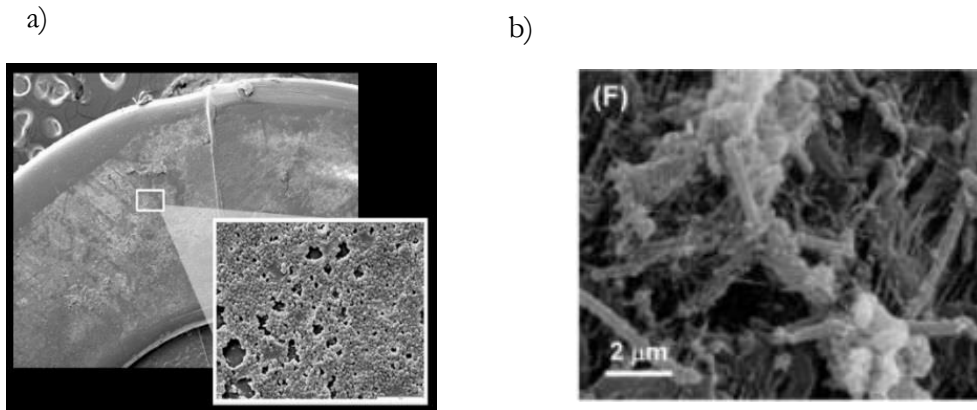


Figura 1.1. Imagen de microscopia electrónica de barrido de un *biofilm* microbiano formado durante el tratamiento de agua residual a) (izquierda); y b) detalle de la matriz extracelular de los exopolisacáridos en un *biofilm*. Tomado de Miura, Watanabe, y Okabe, 2007 y Direct RSS.

1.1.2. Composición de *biofilms* microbianos

En muchos trabajos se ha descrito de manera general la forma en la que se compone un *biofilm*; describiendo una parte elástica en estas estructuras constituida por una matriz, en la cual se encuentran diversos tipos de EPS (Lembre *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2007; Parikh y Chorover, 2005; Rivera-Chavira *et al.*, 2005). Las sustancias poliméricas extracelulares pueden definirse como sustancia de origen biológico que participan en la formación de agregados celulares y otras partículas (J. Wingender, T.R. Neu, 1999).

La complejidad estructural que adquieren estos polisacáridos depende de la presencia de grupos acilo presentes en la estructura principal (S., Delgadillo, y Silva, 2004)g

Un *biofilm* está conformado en parte de carbohidratos, que varían de acuerdo a la presión en el sistema; es decir, en ausencia de presión, los carbohidratos que más comúnmente encontraremos son glucosa y en menor proporción fucosa (11%); mientras que cuando se tiene una mayor presión debido a corrientes fuertes de agua, los niveles de fucosa incrementan de un 11 a un 30% (Lembre *et al.*, 2012).

Existen una gran cantidad de productos del metabolismo celular de bacterias, entre ellos se encuentran los biopolímeros, de los cuales existen dos tipos: los polisacáridos y los poliésteres (Orozco, 1999).

Dentro de los polisacáridos existen una gran cantidad de compuestos orgánicos a base de carbono, como la celulosa y la hemicelulosa; mientras que los poliésteres son mucho menos abundantes como el agar y la carragenina. Los procariontes y hongos producen una gran diversidad de polisacáridos, los cuales pueden llegar a

encontrarse en ellos en cantidades que rebasan el 50% de su peso celular (Glazer, 2007).

Las cadenas de polímeros pueden ser lineales o ramificadas, y muchos de ellos pueden ser homopolisacáridos como celulosa, curdlano o dextrano; dentro de los heteropolímeros podemos encontrar alginato, emulsano, xantano (Lembre *et al.*, 2012). La mayoría de los exopolisacáridos existentes en *biofilms* son relativamente grandes, con pesos moleculares que van de los 500 a los 2000 kDa (tabla 1.1).

Algunos autores como Wozniak *et al.* (2003) reportan que la presencia de otras estructuras como ácidos nucleicos, entre ellos ADN; también son fundamentales para la configuración que adquieren los *biofilms*. En *biofilms* bacterianos se pueden ver componentes acomodados de manera ordenada o desordenada.

Algunos polisacáridos se encuentran unidos a otras estructuras dificultando la caracterización de las funciones que llevan a cabo éstos; sin embargo, algunos pueden ser aislados. Es necesario saber las propiedades de un cierto número de componentes para entender el papel que juegan los diferentes polisacáridos en la estructura de *biofilms* bacterianos formados durante el tratamiento de aguas residuales (Jiménez, 2010).

Latasa *et al.* (2006) reporta que diferentes especies de microorganismos pueden producir los mismos exopolisacáridos como son celulosa y β -1,6-N-acetilglucosamina en la formación de la matriz extracelular.

Tabla 1.1. Componentes encontrados en *biofilms* microbianos.

Polisacárido	Organismo	Estructura química	Referencia
Xanthan	<i>Xantomonas campestris</i> , <i>Xantomonas Citri</i> <i>Sub.sp</i>	Unidad repetida de pentasacárido compuesto de glucosa, manosa, ácido glucorónico y sustituyentes acetil y piruvato.	(Glazer A.N, 2007; Guo, Sagaram, Kim, & Wang, 2010)
Alginato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bloques de residuos β -1,4-D-manuroico unidos; bloques de residuos de ácido α -1,4-L-glucorónico, y bloques de ambos ácidos unidos en cualquiera o en orden alternado con β -1-glucano	(Donati y Paoletti, 2009; Glazer A.N, 2007; P.A.J.Groin, 1965; Sabra, Zeng, y Deckwer, 2001)

Dextrano α - 1,6-glucano 1,3-glucano	<i>Acetobacter</i> sp, <i>Lauconostoc mesenteroides</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Poli-glucosa en uniones glucosídicas α -1,6- con uniones 1,6; 1,3; o 1,4 que también se presentan en algunos dextranos.	(Côté y Leathers, 2009; Glazer A.N, 2007)
Curdano Curdano tipo β -1,3	<i>Agrobacterium</i> sp. ATTCC 31749 <i>Cellulomonas flavigena</i> , <i>Cellulomonas</i> sp	Glucano β -1,3 lineal. Tras el calentamiento en solución acuosa forma estructuras gelatinosas. Se han identificado 4 genes en la producción de curdlano para <i>Agrobacterium</i> .	(Kenyon, Esch, y Buller, 2005; Lucena, Lasobras, Mcintosh, Forcadell, y Jofre, 1994; Ruffing y Chen, 2012; Young y Reguera, 2012).
Galactano piruvato	<i>Methylbacterium</i> sp	Unidades repetidas de disacáridos que consisten en D-galactopiranososa y [4-6-0(1-carboximetileno)-D galactopiranososa.	(Verhoef, Waard, Schols, Siika-aho, y Voragen, 2003)
Gellan	<i>Pseudomonas elodea</i>	Polímero de glucosa parcialmente O-acetilado, ramnosa y ácido glucorónico	(Lembre <i>et al.</i> , 2012)
Celulosa	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	Polímero de D-glucopiranososa con uniones β -1,4.	(Glazer A.N, 2007).

1.1.3. Estructura del *biofilm*

Los diferentes polisacáridos intervienen en la arquitectura de los *biofilms* microbianos, siendo influidos éstos a su vez por otros factores físicos como son la temperatura y químicos como las dinámicas de interacción que ocurren por fuerzas iónicas de atracción y repulsión, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals para evitar un colapso del *biofilm* (Lembre *et al.*, 2012). La manera en la cual se conglomeran estos compuestos al formar un *biofilm* también tiene mucho que ver en su estructura debido a las interacciones de los polisacáridos y las proteínas.

Una parte integral del *biofilm* la constituyen los intersticios y canales de agua a través de los cuales viajan los micronutrientes a las diferentes zonas de éstas estructuras, promoviendo no solo la distribución de nutrientes a todo el *biofilm*, sino también el intercambio de productos de metabolismo producidos en éste y sustancias de desecho (J. Wingender, T.R. Neu, 1999).

Como ya se mencionó anteriormente, el grado de adhesión de los *biofilms* bacterianos a una superficie está dado por las características físico-químicas del sustrato, las especies presentes en *biofilms*, y el estado físico de los organismos involucrados; así como la procedencia o fuente de las moléculas en ella (Fernández *et al.*, 2004).

Podemos dividir un *biofilm* en cuatro zonas distintas de acuerdo a las funciones que se llevan a cabo en cada uno de estos sitios (Lembre *et al.*, 2012) (Figura 1.3):

- a) **Áreas de desapego:** es la parte más lejana a la base del *biofilm*, es la parte más externa; aquí existe una mayor cantidad de exo-polisacáridos, enzimas, DNA externo y bacterias móviles.
- b) **Núcleo del *biofilm*:** en este hay gel de alginato, proteínas, celulosa, canales de agua, células bacterianas, todas las fuerzas de interacción se encuentran aquí (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, fuerzas de atracción y repulsión iónica).
- c) **Áreas de adhesión:** se encuentran más próximas a la superficie de crecimiento y presentan todas las fuerzas de interacción antes mencionadas. En estas regiones se pueden distinguir citoplasma de bacterias Gram (+) y Gram (-), así como la bicapa de lípidos, peptidoglicano, proteínas y polisacáridos capsulares, flagelos y pillis.
- d) **Base del *biofilm*:** es la zona en la cual se adhieren las comunidades microbianas. En esta zona se pueden encontrar células bacterianas, canales de agua, y bacterias filamentosas.

Las estructuras de *biofilm* pueden desarrollarse de dos maneras: la primera es a partir de bacterias de libre flotación y la segunda es por medio de otro *biofilm* ya existente.

Cuando un *biofilm* se forma por bacterias planctónicas, éstas se adhieren a una superficie o interface formando primero microcolonias. Al existir estos conglomerados de bacterias que secretan moléculas de alto peso molecular, se forman cápsulas o vainas, que al madurar darán origen a una estructura madura de *biofilm* (Lembre *et al.*, 2012).

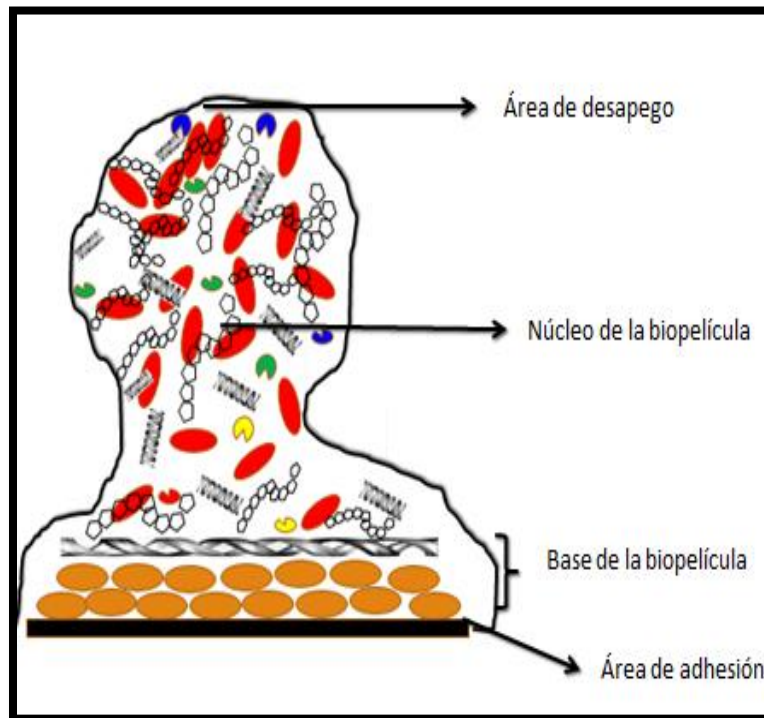


Figura 1.2. Esquema representativo de la estructura de un *biofilm* microbiano (Modificado de Lembre *et al.*, 2012).

En las estructuras formadas a partir de otro *biofilm*, las células correspondientes a las áreas de desapego mantienen todas las propiedades del *biofilm* del que proceden. Es importante hacer mención de la regulación genética en la segregación de ciertos compuestos como son las EPS, ya que dependiendo de estas sustancias, será la colonización de nuevas zonas. Estas bacterias se establecen modificando el medio donde comenzarán a colonizar, tornándose en un punto con condiciones favorables para que comiencen a colonizar bacterias anaerobias (Negróni, 2009).

1.1.4. Importancia de proteínas en un *biofilm* microbiano

Las interacciones polisacáridos-proteínas están dadas en función de sus propiedades estructurales y funcionales, las cuales se inducen en la matriz; pero las estructuras que forman los *biofilms* dependen en gran medida de las condiciones de presión, o las llamadas fuerzas cortantes, que intervienen en el grado de elasticidad de la matriz de la biopelícula y la facilidad con que ésta puede reestructurarse o adherirse a las superficies (Mendoza-Hernández *et al.*, 2008).

Vasudevan (2014) reporta que del 50 al 90% del carbón orgánico en *biofilms* corresponde a células y EPS; sin embargo la presencia de carbón de manera excesiva y disminución en la disponibilidad de nitrógeno, potasio y fosfato inhibe el crecimiento de estas estructuras, mientras que al haber un menor crecimiento celular, se mejora la formación de *biofilms*.

A nivel celular, las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes, representando más del 50% del peso seco de la célula (J. Wingender, T.R. Neu, 1999). Las proteínas pueden adquirir cualquier conformación de acuerdo al acomodo de los 20 diferentes aminoácidos para conformar polipéptidos de cientos de aminoácidos.

En la bibliografía se menciona el papel que juega el DNA extracelular en el establecimiento de la estructura de los *biofilms*; e incluso, las nucleasas, que pueden ser reguladoras de la formación de *biofilms* bacterianos. Existen huecos intersticiales y canales que separan a las micro-colonias que contienen una fase líquida compuesta en mayor parte por agua. La cantidad de proteínas presentes en un *biofilm* bacteriano puede ser indicador de crecimiento de biomasa. (J. Wingender, T.R. Neu, 1999), En la matriz de un *biofilm* bacteriano las proteínas pueden desempeñar una dinámica fundamental al servir como estructuras de anclaje de otros compuestos.

1.1.5. Técnicas para el análisis de *biofilms* microbianos

Existen varias técnicas para hacer el análisis de estructuras de *biofilms* microbianos en aguas residuales, recurriendo desde el cultivo y aislamiento de cepas puras para la identificación de compuestos y especies responsables en su producción, hasta el uso de técnicas metagenómicas para la caracterización genética de poblaciones que presentan metabolismos característicos durante el desarrollo de estas estructuras. Uno de los problemas que presenta el aislamiento de colonias, es que algunas células no crecen en otro tipo de sustrato y mueren inmediatamente al salir de su nicho micro-ecológico (Flemming, 2007).

La cuantificación de compuestos presentes en un *biofilm* puede hacerse mediante análisis de número máximo por cuantificación de manchas de ácidos nucleicos (técnicas colorimétricas con naranja de acridina y DAPI), o por análisis de la actividad de organismos mediante cultivos enriquecidos y puros, determinación de la actividad enzimática, así como potencial redox y turbidez en el agua (Glazer A.N, 2007; Guo, Sagaram, Kim, y Wang, 2010). Sin embargo estas técnicas representan inconvenientes ya que en el caso de coloración de ácidos nucleicos, éstos no diferencian los productos entre células muertas y vivas; y los cultivos

celulares no reflejan la diversidad microbiológica real que existe en un *biofilm* microbiano (anexo 1.2).

Dentro de los métodos indirectos de análisis de *biofilms* se encuentran la determinación del consumo de oxígeno, el potencial de conductividad y producción de CO₂ y otros metabolitos como son el nitrito y el sulfato (Flemming, 2007).

Existen métodos no invasivos que permiten llevar a cabo el análisis de este tipo de estructuras basado en la absorción de luz y momentos vibracionales de los grupos funcionales de compuestos. Uno de ellos es mediante el uso de espectroscopia electromagnética como es el caso de la espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), que ha adaptado dispositivos como el de Reflectancia Totalmente Atenuada (ATR), el cual permite hacer la detección de grupos funcionales por el registro de una onda evanescente en el momento vibracional de grupos funcionales en particular (Serrano Martínez, 2009).

1.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJO

Una de las primeras formas de espectroscopia que encontró un uso extendido fue la espectroscopia vibracional, en especial la espectroscopia de absorción infrarroja (IR). Esta espectroscopia debe su nombre a la región del espectro electromagnético implicada, que se encuentra entre los 12,800-10 cm⁻¹ (Serrano Martínez, 2009).

Al pasar una radiación a través de una fracción homogenizada de *biofilm* y determinar que fracción de esta radiación incidente en las moléculas que la conforman ha sido absorbida se obtiene un espectro IR. La frecuencia de vibración de una parte de la molécula tiene relación con la energía particular a la que aparece cada pico en un espectro. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y la interacción de la radiación infrarroja provoca en ésta alguna alteración.

La espectroscopia IR puede ser utilizada en la identificación de muestras desconocidas a partir de comparaciones con espectros de referencia (Serrano, 2009; Wenning y Scherer, 2013).

En el espectro no necesariamente aparecen todos los modos normales de una molécula como pico de absorción; esto es más bien determinado por la simetría de la molécula. Algunos aspectos a cumplir para considerar a una banda como parte de un grupo funcional son de acuerdo con Stuart (2004):

- Que la vibración debe producir un cambio en el momento dipolar de la molécula para absorber la radiación infrarroja. Esto es un requerimiento general.
- Los modos de vibración degenerados son aquellos casos en los cuales las moléculas son altamente simétricas y se obtienen modos de pares o triadas idénticos; los cuales se expresan como una sola banda.
- Si una molécula tiene centro de inversión, ninguno de sus modos puede ser activo en el espectro IR, es una regla de exclusión.
- Suelen aparecer como una sola banda aquellas vibraciones con frecuencias muy cercanas.
- Pueden no ser observadas las vibraciones de poca intensidad.

El espectro IR se divide en tres zonas de acuerdo a sus aplicaciones en:

- a) IR cercano, el cual se encuentra de los 12,800 a los 4,000 cm^{-1} .
- b) IR medio, se encuentra entre los 4,000 y los 400 cm^{-1} .
- c) IR lejano, que se encuentra de los 400 a los 10 cm^{-1} .

1.2.1. Espectroscopia FT-IR en el análisis de estructuras celulares

Se han realizado muchos análisis FT-IR para espectros de muestras celulares bacterianas, en los cuales se encuentran caracterizadas cinco regiones principales que ofrecen información acerca de la composición celular característica (Álvarez Ordoñez y Prieto, 2012(Lembre *et al.*, 2012).

- La región 1 se encuentra entre los 3,000 y 2,800 cm^{-1} . En ella predominan uniones C-H, las cuales pertenecen a vibraciones de grupos funcionales CH_3 y $>\text{CH}_2$, que abundan en membranas de ácidos grasos y cadenas laterales de aminoácidos.
- La región 2 se encuentra entre los 1,800 y los 1,500 cm^{-1} y es característica de vibraciones producidas por grupos de amidas I y II en proteínas y péptidos; en esta región se puede obtener información acerca de la estructura de proteínas. Las bandas cercanas a la región de los 1740 cm^{-1} son asociadas a uniones C=O de grupos funcionales éster en lípidos.

- La región 3 se localiza de los 1,500 a los 1,200 cm^{-1} , es una región mixta donde se encuentran flexiones de grupos funcionales $>\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_3$ en ácidos grasos, proteínas y compuestos con uniones fosfatos.
- La región 4 es característica de los 1,200 y 900 cm^{-1} , predominan las uniones simétricas de vibraciones de grupos funcionales PO_2^- en ácidos nucleicos y uniones C-O-C y C-O-P de carbohidratos y polisacáridos de la pared celular y ácidos grasos.
- La región 5, se considera la zona de huella dactilar por ser la zona predominante en donde se pueden identificar ácidos nucleicos. Se encuentra entre los 900 y 600 cm^{-1} y contiene patrones de picos muy específicos pertenecientes a vibraciones de anillos de aminoácidos aromáticos y nucleótidos.

El análisis de muestras orgánicas se realiza generalmente en el espectro medio, sin embargo, el IR cercano ha comenzado a ser utilizado actualmente ya que requiere poca o nula preparación de las muestras a ser analizadas. El mayor uso de la espectroscopia infrarroja de dio al utilizar la transformada de Fourier, que reduce el tiempo requerido en la obtención de datos y mejora la resolución de los espectros (Glazer A.N, 2007). En el presente trabajo se realizará el análisis de muestras orgánicas obtenidas de *biofilms* microbianos que crecieron en dos reactores de tratamiento de agua residual.

El IR lejano es utilizado en el análisis de muestras orgánicas, inorgánicas u organometálicas que contienen átomos pesados con masas atómicas superiores a 19 KDa (Alvarez-Ordóñez y Prieto, 2012).

La espectroscopia IR se puede usar en el análisis de materiales en múltiples estados, como líquidos, pastas, polvos, diluciones, superficies, gases, películas y fibras.

La presencia de bandas anchas en muestras sólidas y líquidas se debe a transiciones en niveles rotacionales cercanos por la mínima diferencia entre una rotación vibracional y una rotacional (Serrano Martínez, 2004).

En un análisis cuantitativo es común observar la absorbancia contra el número de ondas por unidad de longitud, mientras que en un espectro típico se presenta como la transmitancia en porcentaje (% de T) que es la fracción de la radiación que incide sobre un cuerpo y que es transmitida a una longitud de onda determinada. A su vez, la absorbancia se define como el negativo del logaritmo de la transmitancia (Alvarez-Ordóñez y Prieto, 2012).

1.2.2. Espectroscopia por reflectancia totalmente atenuada (ATR)

Por medio del dispositivo de reflectancia totalmente atenuada o ATR, un haz de luz incide en la muestra a analizar, la cual se pone sobre una placa de diamante que tiene cortes para generar la reflexión. No hay suma de señales, el aparato es de una sola detección. La energía atenuada de cada onda evanescente es pasada nuevamente al haz de luz infrarroja, el cual después sale por el extremo opuesto del cristal y pasa al detector del espectrómetro IR (Figura 1.5).

Por espectroscopia ATR se pueden analizar membranas, polvos, líquidos o semisólidos, siempre y cuando los compuestos se encuentren por arriba del 1% de su concentración en la muestra. Si éstos se encuentran por debajo de esta concentración, se recomienda utilizar la técnica de transmisión por medio de pastillas de KBr (Thermo scientific Register).

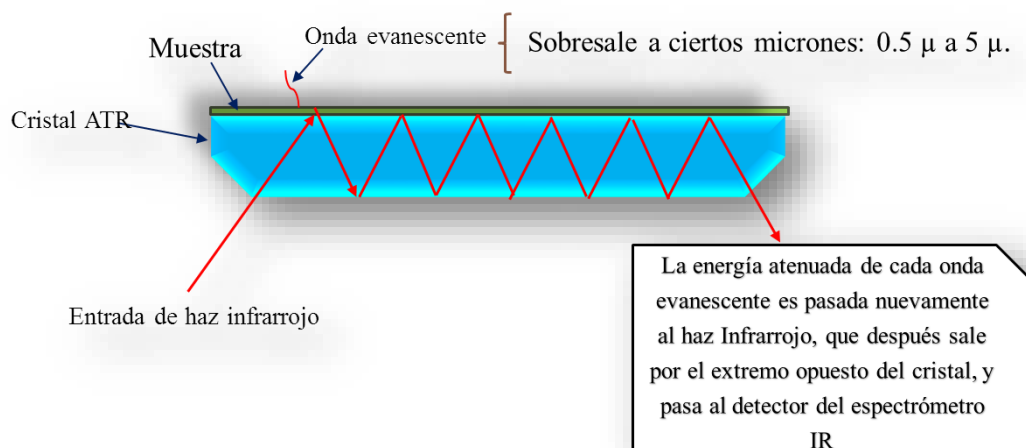


Figura 1.3. Esquema representativo de funcionamiento del accesorio ATR. En la figura se muestra por pasos la captación del haz de infrarrojo a través de un cristal de diamante (1) se sobresale a través de la muestra hasta 5μ (2), y cuya onda evanescente es reflejada nuevamente hacia el espectro (3), el cual registra la longitud de esta onda, que es característica de un grupo funcional específico.

En Reactores biológicos para tratamiento de agua residual pueden crecer *biofilms* microbianos adheridos superficies de empaque para la filtración de sólidos en suspensión. Al haber un crecimiento microbiano se logra la remoción de nutrientes y contaminantes porque las complejas estructuras formadas a partir de polímeros extracelulares sirven como un filtro biológico en el cual se forman canales especializados para el recambio de nutrientes y desechos de metabolismo, además de oxígeno. De acuerdo al modelo de reactor y tipo de crecimiento microbiano en él, será la conglomeración celular que formará estructuras floculares (lodos) o *biofilms* (Rivera-chavira *et al.*, 2005).

1.3. REACTORES AEROBIOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Un reactor puede ser definido como un contenedor en el cual se llevan a cabo reacciones catalíticas, y que propicia un ambiente adecuado para el crecimiento celular en el caso de biorreactores, asegurando el control de distintos parámetros como son la presión y temperatura entre otros (Menzella, 2014).

Los reactores biológicos para el tratamiento de aguas residuales se clasifican en dos grupos de acuerdo al tipo de crecimiento microbiano, como reactores con biomasa fija y reactores con crecimiento suspendido (Jiménez, 2010).

Los reactores también se clasifican de acuerdo a su diseño; en el tratamiento de aguas residuales, los más utilizados son los reactores de mezcla completa y de flujo de pistón (Metcalf y Eddy, 2003).

1.3.1. Tipos de reactores biológicos

Dentro de los reactores clasificados, de acuerdo a su diseño, se encuentran los reactores de mezcla completa. Frecuentemente este diseño es utilizado como modelo para estimar variables clave de operación del sistema para alcanzar una calidad específica en el efluente; estos reactores asumen una mezcla completa de manera uniforme e instantánea a través del reactor (Nivens et al., 1993)

Este tipo de reactores son muy relacionados a reactores ideales de tanque agitado en continuo, en los cuales todos los cálculos realizados se hacen para una mezcla perfecta, y la composición de salida del afluente es idéntica a la composición de la mezcla dentro del reactor (Nivens et al., 1993). Si se da un pulso de agua limpia a una razón de flujo fija, la tasa de acumulación dentro del sistema será igual a la razón de flujo dentro del sistema menos la razón de agua que sale de éste (Metcalf y Eddy, 2003).

Otro tipo de reactores utilizados en el tratamiento de agua residual son los reactores ideales de flujo pistón. En estos, las partículas fluidas se mueven con una pequeña, o ninguna mezcla longitudinal; y salen del reactor con la misma secuencia en la cual entraron. Consiste en un gran tanque abierto, en el cual la dispersión longitudinal es mínima o ausente, o en reactores tubulares cerrados. El tiempo de retención teórico es igual al tiempo en el cual las partículas permanecen en el reactor manteniendo su identidad (Metcalf y Eddy, 2003).

En la figura 1.4 se muestran los tipos de mezcla a través de distintos tipos de reactores mediante un esquema de reacción inicial y final en ellos. En el esquema se grafica la evaluación hidráulica mediante la variación de la concentración del trazador en función del tiempo en reactores con predominio de flujo pistón o de flujo mezclado, cuando la aplicación del trazador se realiza de manera instantánea.

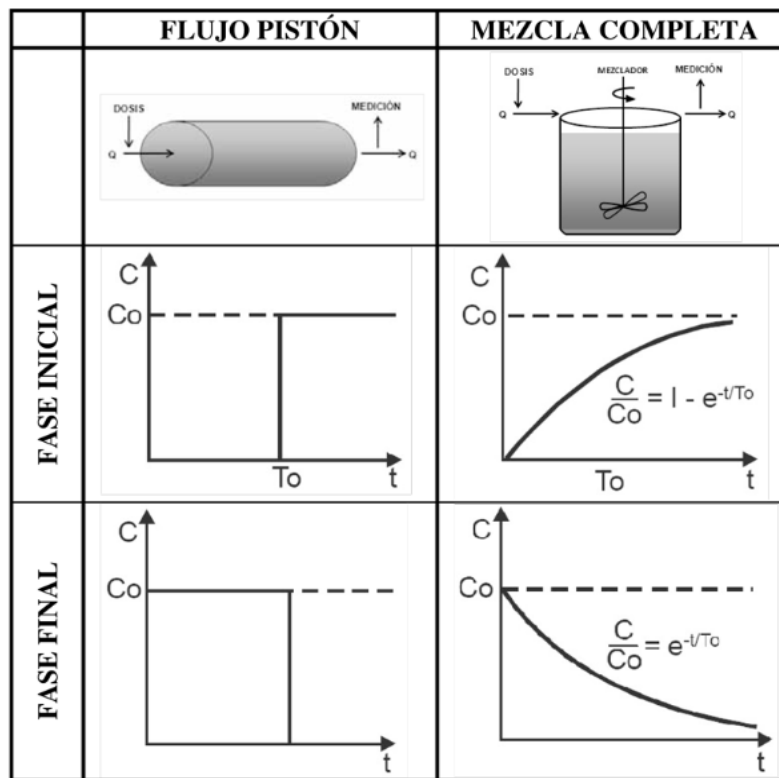


Figura 1.4. Esquema de reacción a través de diferentes tipos de reactores. Tomado de Wills *et al.*, 2010.

1.3.2. Reactores aerobios de lecho empacado

Este tipo de reactores permiten el crecimiento de microorganismos sobre medios de soporte que absorben y metabolizan los contaminantes. A este tipo de sistemas también se les conoce como filtros sumergidos aerobios (SAF por sus siglas en inglés Submerged Aerated Filters) (Noyola *et al.*, 2013). La filtración aireada tiene dos funciones, la primera es buscar la filtración de sólidos suspendidos y la segunda es la degradación de materia orgánica biodegradable. Este tipo de sistemas funciona por filtración biológica aireada.

De acuerdo a Foster (1985), en este tipo de reactores la configuración consta de un lecho empacado sumergido de plástico, piedra o cerámica, en el cual el flujo de agua se encuentra a contra corriente del flujo de aire. En este tipo de reactores el tanque esta empacado con elementos de tamaño inferior a dos cm, pudiendo tratar cargas orgánica altas por la retención de sólidos en un sistema con menor porosidad.

1.3.3. Características del medio filtrante

Para que un soporte de filtración sea eficiente debe cubrir totalmente o en su mayoría con las siguientes características (Cobos Becerra, 2013)

- El grado de adherencia de microorganismos al soporte debe ser elevado.
- Un área superficial específica grande.
- Un medio de soporte altamente poroso.
- Una baja resistencia al flujo de agua.
- Contar con una estabilidad química y biológica.
- Alta capacidad de retención de sólidos suspendidos.
- Durabilidad asociada a resistencia mecánica por fricción y presión.
- Relación del peso específico del material y el agua baja para evitar una carga excesiva sobre la estructura.
- Facilidad de transporte y fabricación.
- Bajo costo.

Los medios de soporte no suelen cumplir con todos los requerimientos, pero del tipo de tratamiento que se busque dependerán también las características cumplidas por el medio de soporte.

1.3.4. Carga orgánica en el reactor

Las aguas residuales municipales tienen una mejor tratabilidad por el grado de homogeneidad que tienen al mezclarse con aguas provenientes de uso comercial y urbano, además del agua de lluvia.

La carga orgánica se define como el producto de la concentración de un contaminante por el caudal en un sitio determinado; dividido entre el volumen del reactor o entre el área superficial expuesta para crecimiento de *biofilm* esto se puede medir como kg DBO/día o kg DQO/día, dependiendo de si estamos hablando de cargas orgánicas superficiales o volumétricas, respectivamente (Cobos Becerra, 2013)

1.4. HIPÓTESIS

Los espectros obtenidos por espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier y reflectancia totalmente atenuada (ATR-FTIR) de muestras de *biofilms* microbianos pueden ser utilizados para describir el cambio en su estructura asociados a su desarrollo y crecimiento. Estos análisis pueden ser comparados mediante pruebas analíticas de la remoción de nutrientes alcanzado durante el desarrollo del *biofilm*. En estas estructuras se pueden caracterizar grupos funcionales de exopolisacáridos de la matriz extracelular y células que integran el *biofilm* microbiano.

1.5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar cualitativamente la composición de la matriz extracelular de *biofilms* en tratamiento de aguas residuales, mediante su exposición al espectro infrarrojo.

1.5.1. Objetivos particulares

Dentro de los objetivos particulares se encuentran:

- Determinar la eficiencia de remoción de nutrientes en filtros aireados sumergidos (SAF, por sus siglas en inglés, Submerged Aerated Filters).
- Determinar el tiempo de retención celular medio del *biofilm* en el reactor.
- Identificar por espectroscopía ATR-FTIR los grupos funcionales de compuestos presentes en la matriz de los *biofilms* microbianos desarrollados en los reactores.

1.6. JUSTIFICACIÓN.

Se propone una nueva herramienta para evaluar de manera rápida la estabilidad de *biofilms* para tratamiento de aguas residuales que consiste en dar seguimiento al espectro ATR-FTIR, con base en los grupos funcionales resultantes.

Los modelos tienen como objeto simular los procesos de remoción de materia orgánica en reactores, donde generalmente se mide la remoción de materia orgánica mediante ecuaciones cinéticas por medio de dos variables: concentración de sustrato carbonáceo para crecimiento, y biomasa en el sistema, las cuales se plantea en esta tesis pueden ser determinadas con espectroscopia ATR-FTIR.

1.7. ALCANCES

Se construyeron dos reactores a escala laboratorio de filtración biológica para abastecerlos con un agua modelo con las propiedades químicas de un residual sintética.

El uso de espectroscopia de infrarrojo para determinar la composición del *biofilm* se complementó con pruebas analíticas de caracterización del agua residual sintética y del efluente a la salida de los reactores.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se abordan las características consideradas en el desarrollo de dos reactores a escala laboratorio, operados de acuerdo a parámetros de diseño como son la carga orgánica, y el tiempo de residencia hidráulica.

La fase experimental se desarrolló en el laboratorio experimental 3 del edificio 5, en el Instituto de Ingeniería de la UNAM.

En la primera etapa se realizaron los cálculos de caracterización del material de empaque y diseño de reactores, así como la delimitación de los parámetros de operación bajo los cuales se llevó a cabo la filtración de un agua residual sintética.

Durante la segunda etapa se llevó a cabo el planteamiento para la colecta de muestras del *biofilm* crecido en ambos reactores bajo las mismas condiciones de operación.

Se hizo una búsqueda bibliográfica y se adaptó una técnica para el análisis de estructuras de *biofilm* por espectroscopia infrarrojo.

2.1. MEDIO DE SOPORTE PARA CRECIMIENTO DE *BIOFILMS*

Se propuso el diseño de dos reactores a escala laboratorio con las mismas características y parámetros de operación para llevar el seguimiento de ambos de manera simultánea. El objetivo fue cuantificar las variaciones que pudieran presentar al aplicar las condiciones de tratamiento.

Se utilizó como medio de soporte polietileno de baja densidad (anexo 2.1) con una forma tridimensional elipsoidal cuya área superficial promedio fue de 66.83 mm² (anexo 2.2) y para el cual se calculó el volumen y peso por unidad de empaque.

2.2. CONFIGURACIÓN DE REACTORES

Se diseñaron dos reactores para el crecimiento de *biofilms* microbianos sobre el lecho empacado con polietileno de baja densidad. El reactor consistió en

un tubo de acrílico de 5.7 cm de diámetro interno y 6 mm de grosor. La altura fue de 12.5 cm con una capacidad para un volumen de 211.220 ml (Figura 2.1).

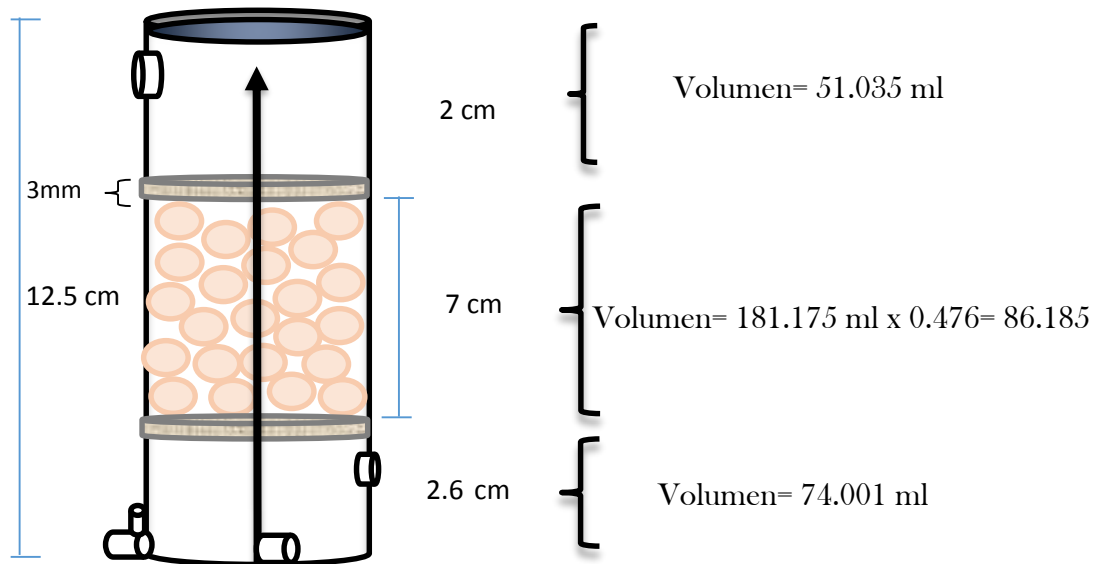


Figura 2.1. Diseño de reactores a escala laboratorio de lecho sumergido con flujo ascendente.

Para este reactor se fijó un volumen filtrante de acuerdo a una altura de 7 cm limitada por dos placas de acrílico con perforaciones para el paso de influente, el aire, y el efluente (Figura 2.2).

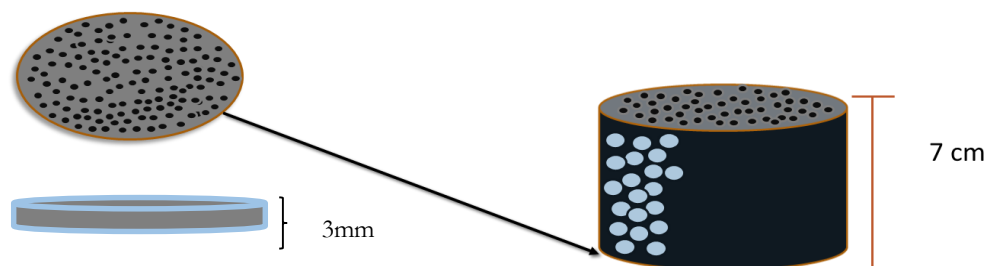


Figura 2.2. Esquema de la disposición del material de empaque en el diseño de reactor. Las unidades de polietileno de baja densidad se confinaron con dos placas de acrílico perforadas de 3 mm de grosor, con una capacidad volumétrica de 178.62ml.

Los reactores fueron puestos en operación por medio de tres bombas peristálticas (desplazamiento positivo) y un temporizador (reloj programable) en el cual se programaron las horas de entrada y salida de influente y efluente, así como los tiempos de vaciado de los reactores en la parte inferior del reactor.

Las mangueras utilizadas tanto para la entrada del influente como para la salida del efluente fueron de calibre 16, y de la marca Masterflex dentro de las bombas peristálticas. Este calibre se determinó por la calibración de ambas bombas. Las bombas presentaban una mayor precisión al incrementar su velocidad de funcionamiento; por lo cual tanto para la entrada de influente como para la salida de efluente (con salida de excesos de biomasa) las bombas se operaron a un potencia de 70 y 80 %.

2.3. POROSIDAD DEL MEDIO FILTRANTE

Para evaluar el comportamiento hidráulico de un reactor utilizando materiales de soporte se determinaron los parámetros de tiempo medio de retención celular (TRC), caudal y retrolavado asociados a un desempeño adecuado.

La porosidad se calculó con base en el sistema de filtrado por el acomodo de los pellets de polietileno en un volumen conocido, que es el volumen asignado al sistema de filtración por flujo ascendente (178.62 ml).

La porosidad determinada para el sistema de filtrado fue de 43.74% y un porcentaje de espacio de material filtrante de 56.26% (anexo 2.4). El volumen ocupado por las piedras de polietileno de baja densidad fue de 100.49 ml (anexo 2.2)

2.4. CARGA ORGÁNICA Y CAUDAL

Si las variables de concentración del sustrato y área total expuesta para crecimiento de *biofilm* se conocen y se propone una carga orgánica de acuerdo a tesis previas donde la carga orgánica ($C.O$) se calcula en base al área superficial del material de soporte (pellets de polietileno de baja densidad), S_o es la DQO en el influente, (J. Wingender, T.R. Neu, 1999), se despeja entonces el caudal:

$$Q = \frac{C.O \times A.Sup.de.pellets}{S_o} = m^3/d \quad (2.1)$$

Teniendo el área de los pellets, se procedió a determinar el caudal para una carga orgánica superficial de 12 g de DQO/m²·día, que de acuerdo con Young *et al.*, (2012) es una carga superficial alta en que no se estimula el desarrollo de bacterias nitrificantes y predominan bacterias heterótrofas responsables de la degradación de materia orgánica carbonosa que se buscan en este trabajo.

Para esta carga orgánica se determinó el caudal correspondiente, como se muestra en el anexo 2.5. En este anexo también se explica cómo se llevó a cabo el llenado de lecho filtrante. El tiempo de retención hidráulico (TRH) para operar los reactores fue de 1.056 horas (anexo 2.5).

Después de llenar los lechos filtrantes de cada reactor (anexo 2.xmm) comenzó el proceso de seguimiento de operación denominándolos como reactor A y reactor B.

2.5. COMPOSICIÓN DEL AGUA RESIDUAL

Se utilizó un agua residual que cumpliera con una DQO similar a la de un agua residual municipal, utilizando parámetros adaptados por Cobos Becerra (2009, 2013). En la tabla 2.1 se muestra la composición del agua residual sintética y su aporte en gramos de DQO a la fuente de carbono, así como la composición de una solución de micronutrientes como componentes minerales traza.

La solución de micronutrientes se agregó en proporción de 1 ml por cada litro de agua residual sintética (Cobos Becerra, 2009 y 2013)

Tabla 2.1. Composición del agua residual municipal sintética. El acetato de sodio (CH_3COONa) es la única fuente de carbono en el sustrato.

COMPUESTO	CANTIDAD (mg/l)
$\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}^+$	132.3 (90 mg/l como DQO)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	140 (30 como N)
KH_2PO_4	44 (10 como P)
$\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25
H_3BO_3	0.5
Na_2HCO_3	66 (60 como CaCO_3)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20
ZnCl	0.5
CuCl	0.5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5
$(\text{NH}_4)\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.5
AlCl_3	0.5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5
NiCl_2	0.5

2.6. RETROLAVADO

Durante los primeros 22 días los reactores operaron de manera discontinua a 23 ciclos de 58 minutos mediante dos bombas peristálticas. Esta operación se mantuvo con la finalidad de bombear el caudal de agua calculada para una carga orgánica superficial del 12 gDQO/m²·d.

El agua del influente se mantenía en el reactor entre cada ciclo hasta su salida. Durante los primeros días los retrolavados se llevaron a cabo cada 5 días hasta alcanzar un crecimiento más estable del *biofilm*.

A partir del día 23 de proceso se hizo un cambio en la configuración de ambos reactores mediante un sistema de recambio de agua por ciclo. Se agregó una “T” a la salida del efluente tratado junto con exceso de biomasa (sólidos deprendidos durante la operación del sistema biológico) para acondicionar una recirculación al reactor (Figura 5.4). A partir del cambio en la configuración de ambos reactores, los retrolavados se llevaron a cabo cada 24 horas.

Debido a la rápida saturación con biomasa dentro de los espacios de filtración, los retrolavados se complementaron utilizando un Vórtex Maxi mix II Typo, modelo 37600, para desprender el *biofilm* que crecía sobre los pellets.

Durante cada retrolavado se colocaba el reactor completo en el vórtex a 300 mezclas por minuto durante 120±30 segundos. Una vez concluido el tiempo de agitación, se activaba la bomba para extracción de biomasa desprendida del material filtrante (biomasa en el reactor), colectando por separado los contenidos de ambos reactores en vasos de precipitados de un litro. Con estos retrolavados (utilizando vórtex) se obligaba al desprendimiento de la biomasa en el reactor.

Se colectó la biomasa desprendida a lo largo del proceso y la presente dentro de los reactores durante los retrolavados; para esto se utilizó la manguera de salida de exceso de biomasa.

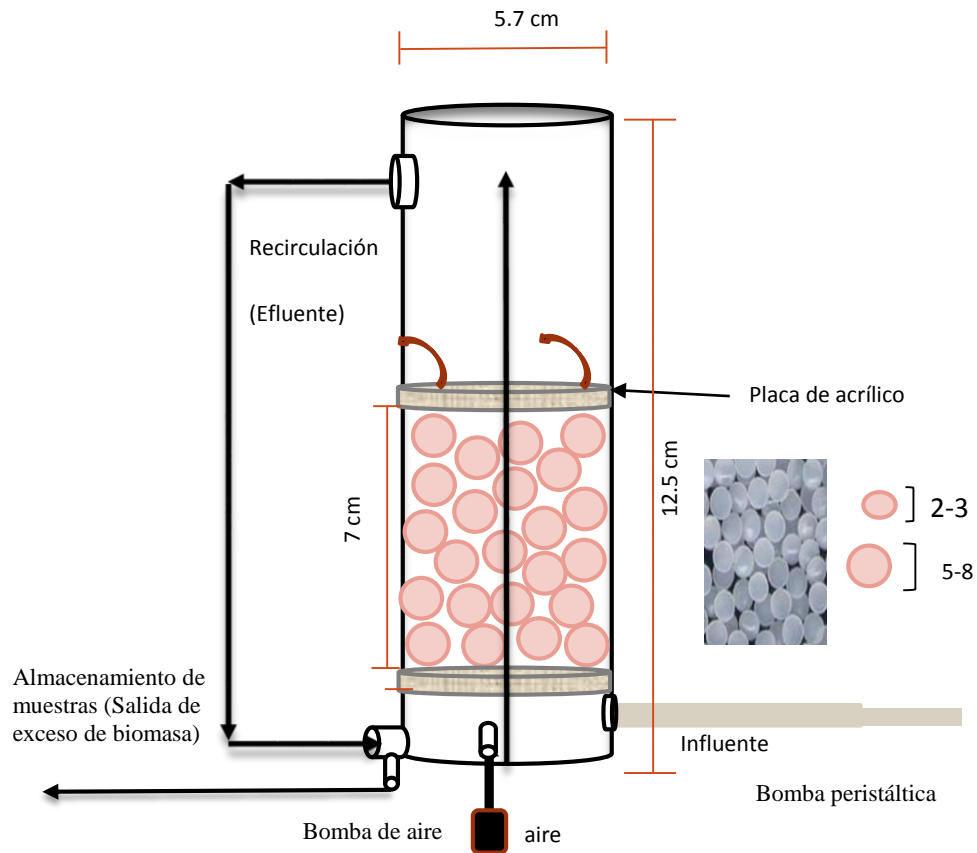


Figura 2.3. Esquema representativo de la configuración operativa de reactores A y B. Influyente y salida se encuentran en la parte inferior.

2.7. ANÁLISIS DE *BIOFILMS* BACTERIANOS POR ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR

Aunque la técnica ATR-FTIR generalmente no requiere un procesamiento de las muestras, en el caso de *biofilms* microbianos es necesario hacer una preparación previa a su análisis. Las muestras biológicas presentan agua, que puede enmascarar ciertos picos a diferentes longitudes de onda.

El análisis de muestras se puede hacer de manera cualitativa o cuantitativa; se deben tomar en cuenta las características de la muestra para su análisis e interpretación de resultados adecuados, de acuerdo a la fase en la que se encuentren al momento de ser analizadas y que tipo de información se espera obtener.

Para el análisis por espectroscopia IR se utilizó un espectrómetro FT-IR con artefacto de reflectancia totalmente atenuada (ATR) Nicolet iS 50. Los resultados obtenidos por el espectroscopio fueron analizados utilizando el software OMNIC de Thermoscientific corporation.

2.8. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La preparación de muestras se llevó a cabo por medio de dos métodos. Uno de ellos para llevar a cabo una lisis y fraccionamiento de proteínas por centrifugación con una sal saturada que permitiera la unión proteína-proteína y no proteína-agua; que requiere llevar a cabo la lisis celular por una centrifugación a 10,000-12,000 rpm (Fiona Lyng, Ehsan Gazi, 2012, Segal y Ortega, 2005). El otro involucra únicamente el secado de la muestra para su análisis al espectroscopio IR. En la sección 2.2.2 se explica paso a paso como se realizó el procesamiento de las muestras desde su colecta.

2.9. COLECTA DE MUESTRAS

En dos vasos de precipitados de 1 litro se dejó sedimentar el contenido de los reactores obtenido durante 30 a 40 minutos. Una vez sedimentado el *biofilm*, se procedió a quitar el exceso de agua con ayuda de una pipeta de 20 ml procurando no agitar para dejar lo más íntegra posible las muestras.

Se tomaron pequeños fragmentos a partir del *biofilm* húmedo. En un principio la toma de muestras para el análisis infrarrojo se hizo de manera directa del *biofilm* húmedo para buscar picos que pudieran presentar patrones, y cuyas interacciones fueran evidentes en agua.

2.10. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para llevar a cabo ambos tratamientos, se quitó el exceso de humedad de las muestras de *biofilm*; tomando dos muestras para cada tratamiento de cada reactor.

2.10.1. Muestras blanco

Antes de llevar a cabo el análisis de muestras de *biofilm*, se procesaron algunas muestras *blanco* para identificar los picos que podían deberse a las soluciones utilizadas durante el procesamiento de las muestras ((NH₄)₂SO₄), o que formaban parte de la composición del agua residual sintética como fuente de carbono como el acetato de sodio (NaCH₃COO).

Se preparó una solución de sulfato de amonio equivalente a 760 g de (NH₄)₂SO₄/1000ml, la cual se tomó como solución madre para hacer otras dos soluciones diluidas al 70 % y 30%.

De igual forma se hicieron análisis de otros compuestos de referencia como son la albúmina sérica que se utilizó como blanco de proteína pura y bacterias liofilizadas para inoculación de agua residual sintética como indicadores de presencia de biomasa. Para ambos blancos se realizaron diluciones sucesivas al 50% a partir de concentraciones iniciales de 10,000 ppm en el caso de la albúmina, y de 8,000 ppm en el caso de los liofilizados.

Los liofilizados fueron activados con agua de micronutrientes diluida al 50% con agua potable y triturados en el mortero manteniendo temperaturas menores a 4°C al hacer la preparación en una cama de hielo para evitar la desnaturalización de proteínas por proteasas.

A partir de las diluciones hechas, las muestras blanco fueron tratadas con sulfato de amonio saturado. Para todas las muestras de referencia se hizo centrifugación durante 15 a 20 minutos a 6,000 rpm en una microcentrífuga Sprout.

A excepción del acetato de sodio (que se analizó como muestra en polvo), las muestras fueron analizadas directamente de los tubos eppendorf después de su centrifugación. Para estas muestras se colocaba sobre el dispositivo ATR una cantidad de 2 µl por muestra.

2.10.2. Muestras tratadas por desecación

Este método consistió en extender en un vidrio de reloj la mayor cantidad de *biofilm* posible para evaporar el exceso de humedad por calor metiendo la muestra a una estufa *Felisa* por dos minutos a 80°C-102°C; procurando que el *biofilm* no se secase por completo o se quemara y que no hubiera ebullición por exceso de agua en la muestra. Una vez que las muestras se sacaron de la estufa, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para que se formaran costras o láminas de

biofilm que serían puestas al ATR-FTIR como polvo o láminas secas, o en su caso, como muestras en pasta.

2.10.3. Muestras tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Debido a que la microcentrífuga con la que se cuenta solo funciona a 6,000 rpm, únicamente se buscó someter a estrés las muestras y producir la separación de compuestos extracelulares y ayudar a inducir la lisis mediante una sal saturada de sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$.

Las muestras obtenidas después de quitar el exceso de humedad fueron puestas en tubos eppendorf procurando que tuvieran la misma cantidad de muestra (2 μg). Las muestras eran pesadas dentro de los tubos eppendorf en una balanza analítica.

De cada reactor se colectaron seis muestras, a las cuales se les puso inicialmente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 100, 70 y 30%; cada concentración se puso por duplicado; es decir que por cada dos muestras se agregaba una de las concentraciones de sulfato de amonio. En la bibliografía se utilizan 500 μl de sulfato de amonio por cada 100 μl de muestra; sin embargo, debido a que el volumen se aforó a 0.1 μl del tubo eppendorf y éste representaba en peso 2 μg de muestra; solamente se agregaron 400 μl de sulfato de amonio de las tres diferentes concentraciones a las muestras.

Las muestras fueron centrifugadas de 15 a 20 minutos a 6,000 rpm a una temperatura de 21-24°C. Inicialmente se hizo un análisis IR de los grupos funcionales presentes en el sobrenadante producto de la centrifugación y el sedimento de *biofilm* obtenido.

El sobrenadante solo arrojó resultados referentes a la composición de la sal de sulfato de amonio, por lo cual el sobrenadante se eliminó y solo se hizo el análisis al pellet obtenido de la centrifugación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos tanto para las pruebas analíticas de caracterización de los reactores, como para el análisis de las estructuras de *biofilm* obtenidas de los mismos durante un proceso de 59 días. Las condiciones de operación que permitieron el crecimiento del *biofilm* en los reactores A y B se presentan a continuación.

Se logró la formación y crecimiento de *biofilms* en dos reactores a escala laboratorio de lecho empacado con flujo ascendente.

3.1. COMPORTAMIENTO DE BIOMASA EN LOS REACTORES

3.1.1. Tiempo de Retención Celular (TRC)

Para tener un parámetro de referencia acerca de la velocidad de recambio en los sistemas de filtración se calculó el Tiempo de Retención Celular (TRC), que estima el tiempo promedio que los microorganismos permanecen en el proceso de tratamiento, también es conocido como edad de los lodos.

Generalmente se puede hacer la determinación del TRC por medio de la determinación de SST; aunque también puede calcularse haciendo un balance de nitrógeno orgánico en el sistema. Para calcular el TRC por la masa de nitrógeno presente en el sistema se utiliza el nitrógeno Kjeldahl utilizando la fórmula que se presenta a continuación:

$$TRC(d) = \frac{NKen.pellets}{NKRetr./d + NKEfl./d} \quad (3.1)$$

Debido a que los retrolavados se llevaban a cabo cada 24 horas, y estos se hacían con intención de obtener la mayor cantidad de biomasa para su análisis en el espectroscopio IR como muestras del contenido del reactor, se tomó a la biomasa obtenida en la salida de exceso de biomasa como el producto de un retrolavado; puesto que ésta biomasa es producto del desprendimiento diario de *biofilm* en los sistemas. De esta manera el ajuste de la ecuación queda como a continuación se presenta:

$$TRC(d) = \frac{NKCont.Reactor}{NKExc.Biomasa/d + NKEfl./d} \quad (3.2)$$

En la Figura 3.1 se muestran los TRC obtenidos a lo largo del proceso para los reactores A y B. A pesar de que ambos reactores operaron bajo los mismos parámetros, el TRC fue distinto en ambos. El reactor A operó a un TRC promedio de 0.81 días (es decir, aproximadamente 19 horas como tiempo de retención celular), mientras que el reactor B operó a un TRC promedio de 0.57 días, que representa un tiempo de retención celular casi un 75% con respecto al reactor A. Esto explica porque en el reactor B había un mayor desprendimiento de *biofilm* durante los primeros 35 días; pero a pesar de la diferencia en el TRC promedio para ambos reactores, a partir del día 43 de proceso, estos tiempos se fueron normalizando, lo cual implica una estabilización del sistema.

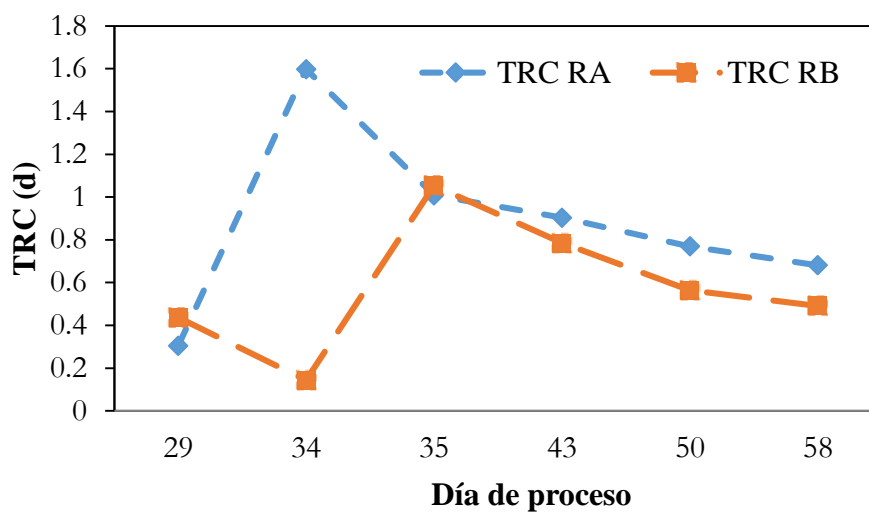


Figura 3.1. TRC obtenidos a lo largo del proceso en los reactores A y B.

3.1.2. Determinación de SST

El comportamiento de la biomasa en los reactores A y B se determinó mediante la comparación de los resultados analíticos obtenidos tanto para el efluente como para la salida de excesos de biomasa de éstos.

El efluente es un indicador de la remoción de nutrientes en los reactores a lo largo del tiempo; mientras que la salida de exceso de biomasa es un indicador de la estabilidad del *biofilm* asociada al grado de remoción alcanzado con un menor desprendimiento de éste.

Si comparamos la cantidad de SST efluente y la salida de excesos de biomasa, podemos notar que a partir del día de operación 48, la cantidad de sólidos en el lecho de filtrado y en el efluente son semejantes, al igual que para la salida de excesos de biomasa.

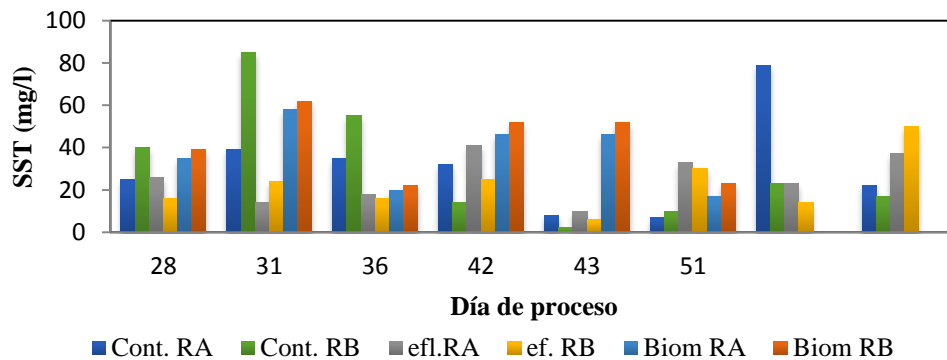


Figura 3.2. Comparación de Sólidos suspendidos totales durante el proceso de operación de los reactores A y B.

Durante los últimos días de operación de los reactores, la concentración de sólidos suspendidos totales incrementó en el efluente de los reactores A y B, mientras que en la salida de exceso de biomasa se vio disminuida (Figura 3.3).

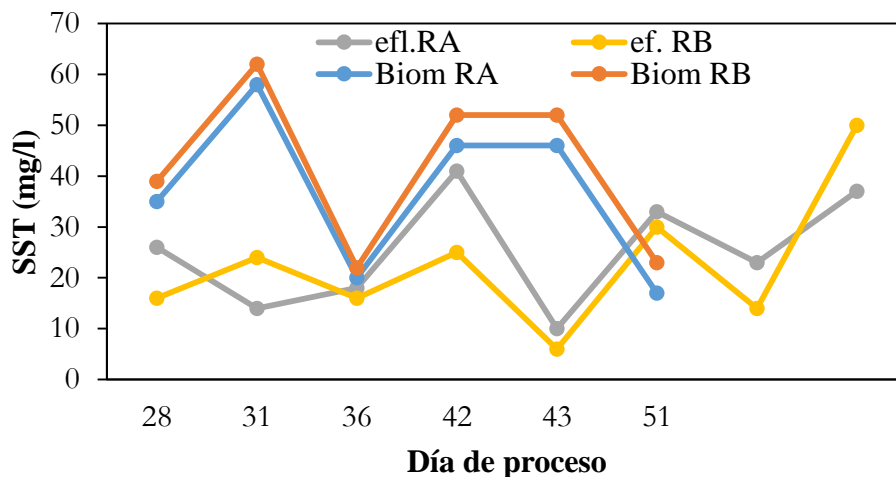


Figura 3.3. Comportamiento de los Sólidos Suspendidos Totales en los reactores A y B durante el proceso de operación.

Esto puede estar relacionado con el decremento de la concentración de SST dentro del sistema de filtrado, y por lo tanto de un menor desprendimiento de *biofilm* del sistema. Es importante mencionar que a pesar del decremento en la concentración de SST, ambos reactores se encontraban colmatados de biomasa en el medio de soporte (anexo 2.7). Es muy probable que el decremento se deba a una madurez de la matriz extracelular en el *biofilm*; pero también de un probable desplazamiento de especies, predominando mayormente microcolonias con características de metabolismo anaerobio facultativo que permitiera llevar a cabo de manera eficiente la degradación de nitratos a nitrógeno gas; el cual no fue cuantificado en el reactor.

Hasta el día 15 de proceso comenzó a verse un gran incremento en la cantidad de sólidos como SST en los sistemas de filtrado, hasta alcanzar los 994 mg/L en el reactor A y 528 mg/L en el reactor B para el día 28 de operación.

Es importante mencionar que el cambio de configuración se llevó a cabo el día 23 de proceso; disparándose el incremento de SST en los contenidos de ambos reactores, y después decreciendo a partir del día 31 de proceso (Figura 3.4). Se puede apreciar en la figura que a pesar de una tendencia a la estabilización a valores entre 70 y 50 mg/L, todavía hay una inestabilidad en el reactor A hacia el día 49 de operación.

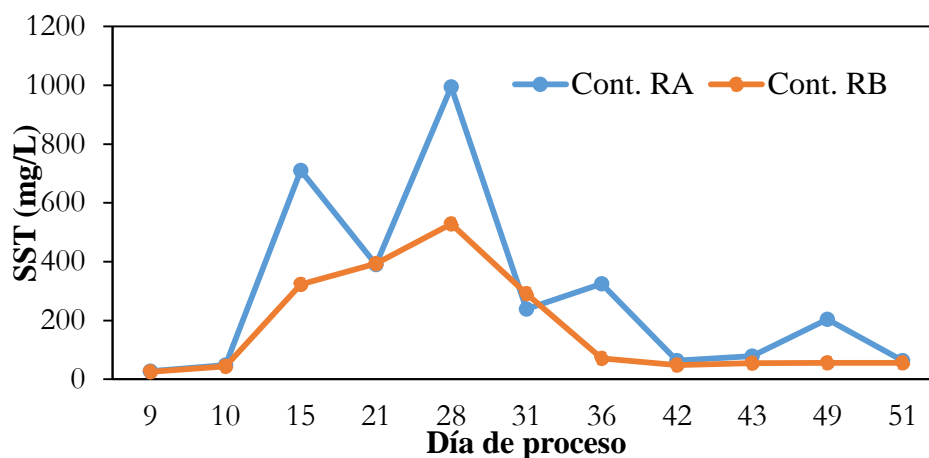


Figura 3.4. Sólidos como SST dentro de los reactores A y B. En la gráfica se muestra el incremento de los SST entre los días 15 y 30 de operación de ambos reactores.

Este comportamiento se debe a que durante el proceso de filtrado, las estructuras de *biofilm* en los sistemas de filtración fueron más estables, y a pesar de haber un desprendimiento constante de *biofilm* en los reactores, cada vez era menor, aunque también lo era el crecimiento de bacterias en los reactores.

3.1.3. DQO en los reactores

En la figura 3.4 se puede apreciar que la DQO en el contenido de ambos reactores es alta durante los primeros días de proceso hasta el día 35. El cambio de configuración se llevó a cabo a partir del día 23 de proceso; sin embargo es hasta el día 38 que se puede apreciar un cambio notable en el decremento de la DQO. Esto indica que existe una menor cantidad de sustancias susceptibles a ser oxidadas en el sistema a lo largo del tiempo de operación; esta homogenización en las cantidades de materia orgánica susceptible a ser oxidadada se encuentra relacionada con el cambio de configuración de los reactores a sistemas de recirculación del efluente entre cada ciclo de recambio de agua.

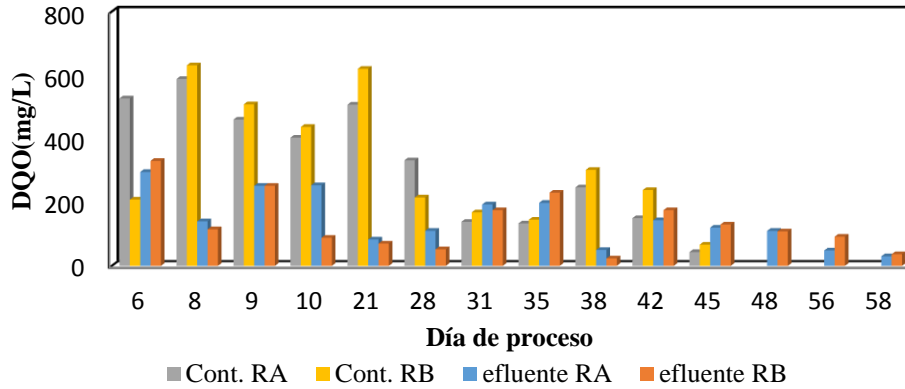


Figura 3.5. Comportamiento de la DQO en el efluente y el contenido de los reactores A y B durante el proceso.

3.2. REMOCIÓN DE NUTRIENTES

La carga orgánica manejada para ambos sistemas fue de 12g DQO/m²·d, y una DQO de 450 g/m³, que corresponde a la DQO en aguas residuales municipales.

Sin embargo, en el contenido del reactor la DQO se mantuvo en 320 mg/L, lo cual representa una carga orgánica de 8.6 gDQO/m²·d; de acuerdo a la fórmula:

$$CO_s = \frac{Q \cdot So}{A \cdot Superficia} = \frac{5.00 \text{ m}^3 / d \times 0.321 \text{ gDQO} / \text{m}^3}{0.187552 \text{ m}^2} = 8.6 \text{ gDQO} \text{ m}^2 \cdot d \quad (3.3)$$

Esto significa que durante el tiempo de proceso, el reactor funcionó a una carga orgánica media.

3.2.1. Remoción de DQO en los reactores A y B

La DQO en el efluente; es inestable a lo largo del proceso (Figura 3.5), pero hay una tendencia a disminuir a partir del día 38 de proceso.

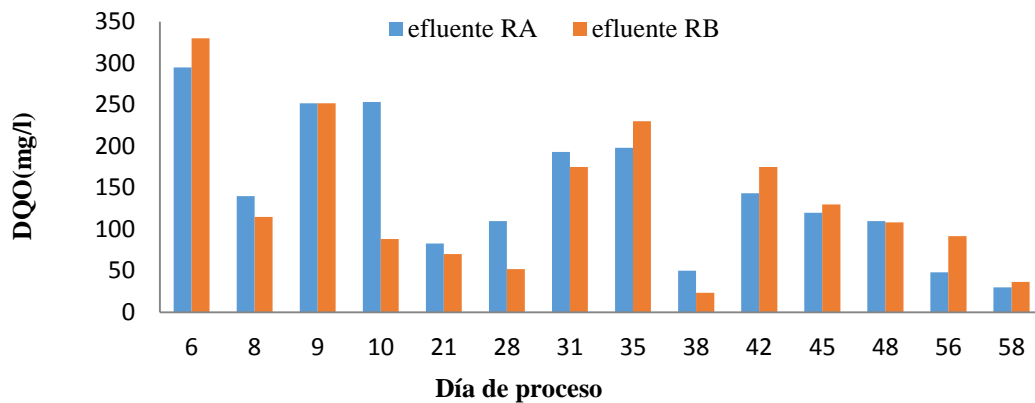


Figura 3.6. DQO en el efluente de reactores A y B durante el proceso de filtración.

Si comparamos los resultados obtenidos de la DQO en el efluente con respecto a la DQO dentro de ambos reactores se podrá ver que la DQO decrece hasta en un 44%; pero en los últimos días de proceso tanto en el efluente como en el contenido de los reactores, las DQO se van aproximando (Figura 6.6).

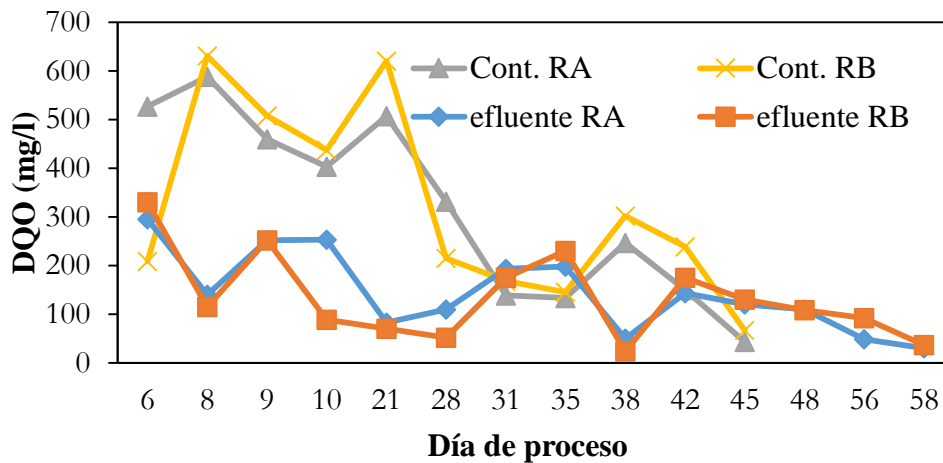


Figura 3.7. DQO en el efluente y contenido de reactores A y B.

La DQO obtenida en la salida de excesos de biomasa es un 45% más baja que la DQO en el sistema de filtrado, pero sigue siendo más elevada que la del efluente por el contenido de estructuras de *biofilm* (Figura 6.4). En el efluente se puede notar un incremento en la DQO en los días 48 y 56, en general se mantiene entre 120 y 150 mg/L.

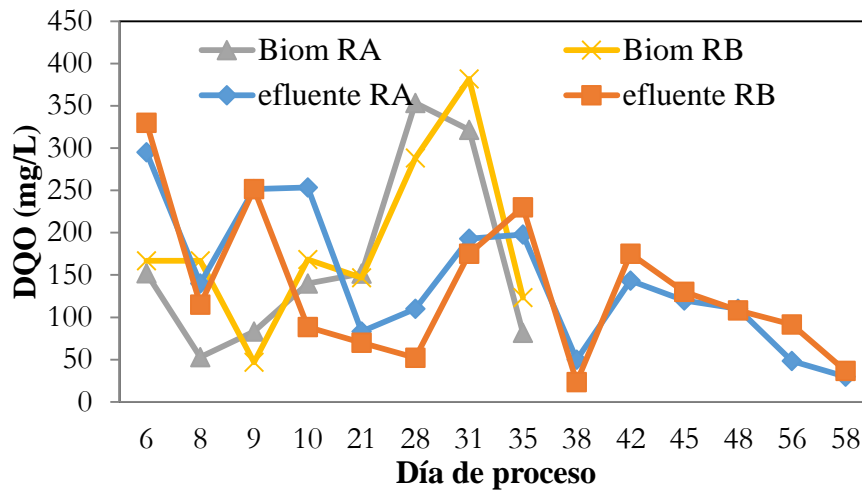


Figura 3.8. DQO en el canal de exceso de biomasa respecto al efluente.

3.2.2. Determinación de nitrógeno orgánico

En la figura 3.9 se observa que durante los primeros 43 días de proceso existe una tendencia a tener un mayor contenido de nitrógeno orgánico en el sistema de lecho filtrado con respecto al efluente. Durante los primeros días de proceso, la cantidad de nitrógeno orgánico en el sistema alcanza los 70 mg/l; sin embargo, y a pesar de que dentro del reactor la cantidad de nitrógeno orgánico es mayor que en el efluente, esta cantidad disminuye hasta menos de 9 mg/l.

El nitrógeno orgánico representa una fracción del peso de las proteínas que corresponde al 16%; a partir de esta determinación se puede saber qué cantidad corresponde a materia celular por medio de un factor de conversión (6.25).

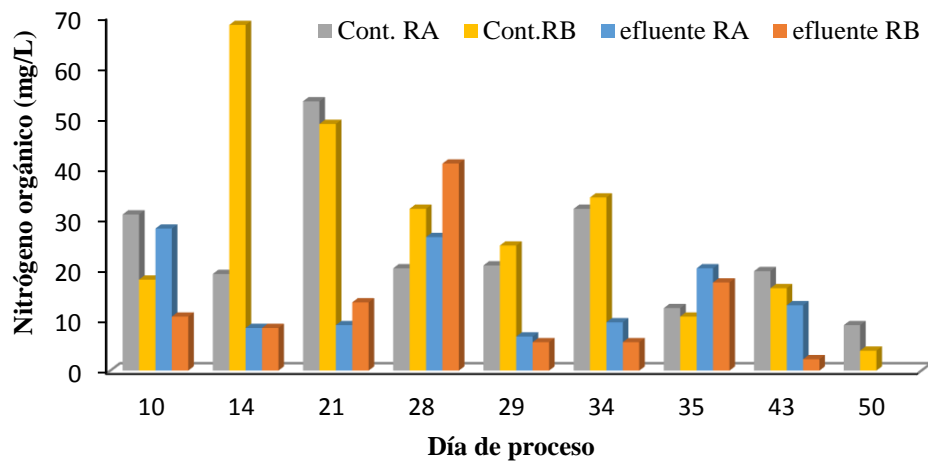


Figura 3.9. Comparación del Nitrógeno orgánico presente en el sistema de lecho empacado con respecto al efluente en los reactores A y B a lo largo del proceso.

La cantidad de nitrógeno orgánico en ambos reactores se vio disminuida al hacer el cambio de configuración a una recirculación. La gráfica muestra una eficiencia en la remoción de este nutriente comparado con los primeros días; sin embargo, a lo largo del proceso, la cantidad de nitrógeno orgánico es similar tanto en el contenido de los reactores como en el efluente; lo cual muestra una menor remoción a lo largo del tiempo.

3.2.3. Determinación de ortofosfatos

Los resultados obtenidos tanto para el contenido como para el efluente de los reactores A y B muestra un incremento en la cantidad de ortofosfatos hacia el día 28 de proceso en el contenido de ambos reactores; y una remoción del 50% en el efluente para este periodo (Figura 3.10).

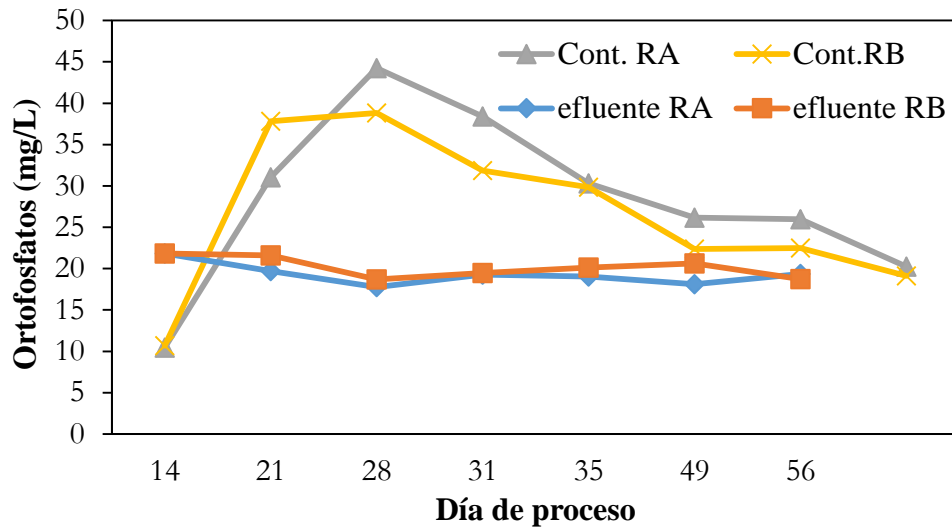


Figura 3.10. Ortofosfatos en contenido y efluente de reactores A y B.

Durante el proceso, la cantidad promedio de ortofosfatos para ambos reactores es de 30 mg/L en el lecho de filtrado; y de 20 mg/L en el efluente, que representa una remoción de fósforo del 33%. A pesar de haber poca remoción de ortofosfatos al final de cada ciclo de filtración, se puede observar que en el contenido de los reactores hay un decremento en la cantidad de fosfatos presentes como ortofosfatos; lo cual nos habla de una menor remoción, pero también de una estabilización en la velocidad de crecimiento de las poblaciones de microorganismos; o un posible aprovechamiento de fósforo a nivel celular. Si hacemos una comparación de la cantidad de ortofosfatos obtenidos dentro de los sistemas de filtración con respecto a los obtenidos del efluente podemos notar que a partir del cambio de configuración hubo un decremento de la cantidad de ortofosfatos dentro de los reactores; sin embargo en el efluente se mantienen (Figura 3.11).

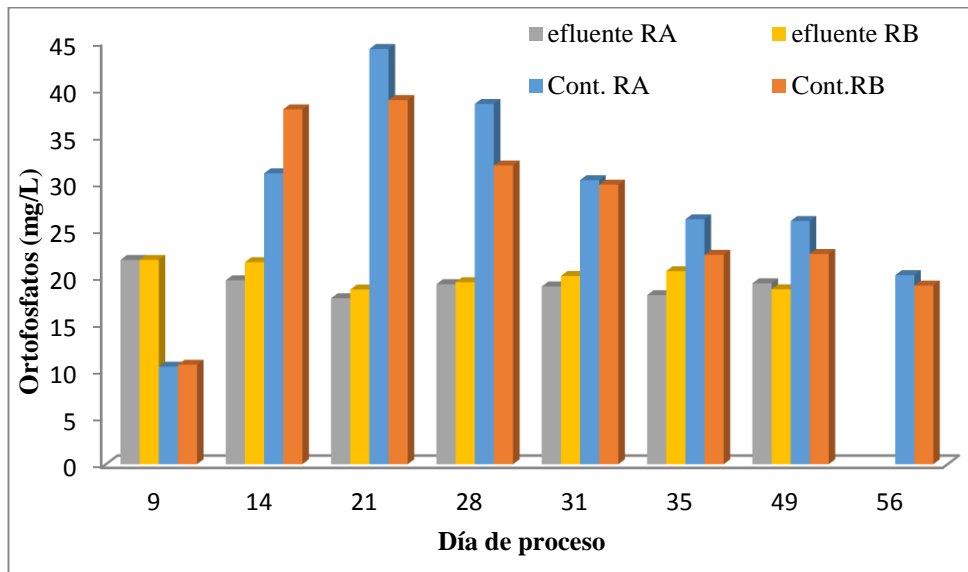


Figura 3.11. Comparación de ortofosfatos presentes dentro del sistema de filtración con respecto al efluente en los reactores A y B.

De acuerdo a la NOM-001-SEMARNAT-1996; los límites máximos permisibles para descargas de aguas residuales a ríos para uso agrícola son de 20mg/l, y de 30mg/l para su descarga en embalses naturales o artificiales como fósforo total.

Para considerar que un agua es de buena calidad, los límites permisibles de fósforo total y ortofosfatos son de 0.02 a 0.002 mg/l. Tomando en cuenta el tamaño de ambos reactores y el tiempo de retención celular (0.8 a 0.57 días) se puede explicar que exista un alto desprendimiento de *biofilm* durante los periodos de recirculación y por lo tanto un rápido crecimiento de bacterias en el sistema durante los primeros días de operación.

Los resultados obtenidos de la determinación de ortofosfatos revelan que la cantidad de éste nutriente basta para tener un crecimiento acelerado de las microcolonias presentes en ambos reactores durante los primeros días de proceso, pero al haber una recirculación continua del efluente al influente durante cada ciclo se promovió el desprendimiento de *biofilm* por el recambio constante de las estructuras que iban estableciéndose; de tal forma que a lo largo del tiempo de proceso, las características dentro de los reactores iban pareciéndose a las del efluente para este parámetro. Muchas estructuras a pesar de ser desprendidas se fijaban en los medios de soporte del lecho empacado, o sedimentaban en la parte inferior del reactor; así como en las diferentes estructuras fijas para el recambio de agua a tratar.

3.3. ESPECTROS DE REFERENCIA

Se tomaron espectros de compuestos de referencia para comparar con las muestras de *biofilms* obtenidas en los reactores A y B a partir del día de operación 31. La formación de biofilm tomó aproximadamente 28 días como una estructura estable y en proporción suficiente para adherirse al medio de soporte.

3.3.1. Acetato de sodio

El acetato de sodio, fuente de carbono en la preparación de agua residual sintética, fue analizado en seco obteniendo el espectro que se muestra en la figura 3.12.

La interpretación obtenida por el software muestra grupos funcionales correspondientes a sales de ácidos carboxílicos alifáticos. Generalmente el análisis por reflectancia totalmente atenuada (ATR) se lleva a cabo por transmitancia.

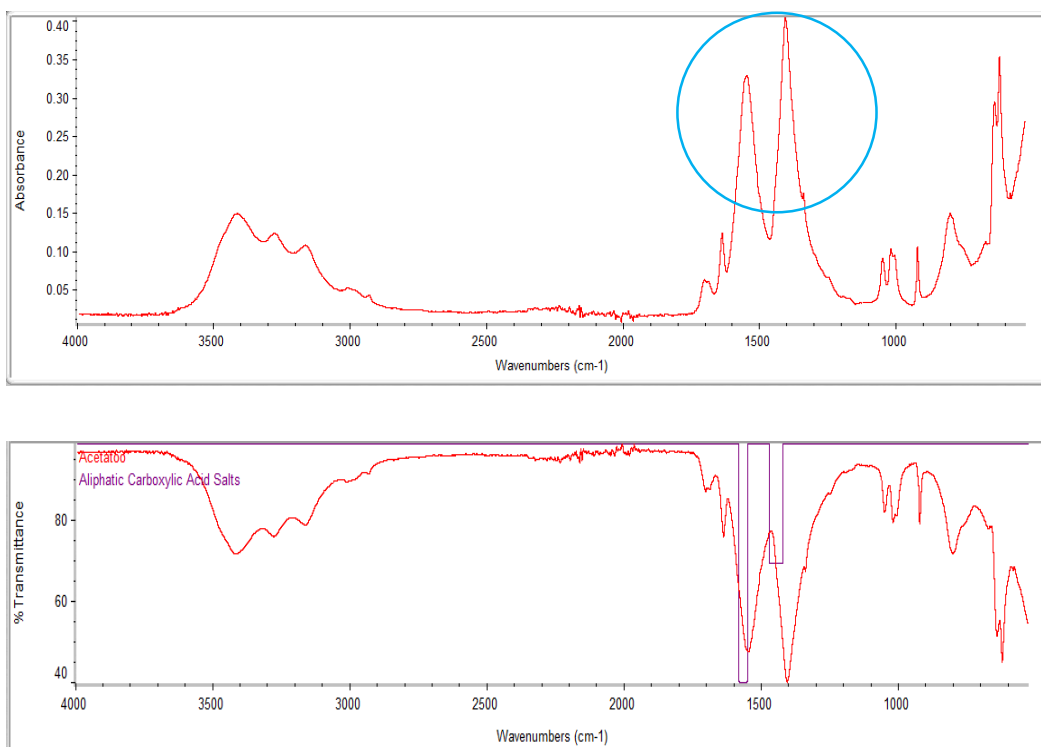


Figura 3.12. Espectro obtenido de la muestra de acetato de sodio en polvo. Análisis realizado a una resolución de 4 cm^{-1} , y ocho barridos. Apertura del haz: 80.

3.3.2. Sulfato de amonio

Las diluciones de la sal fueron colocadas directamente en el dispositivo ATR para la obtención del espectro de una muestra líquida (figura 3.13). En todos los espectros se mantienen las regiones cercanas a los 1066 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} ; estas bandas coinciden con grupos alifáticos P=O de acuerdo con Davis y Mauer (2010). Los enlaces P=O pueden ser caracterizados en las regiones del espectro ubicadas a los 1085 cm^{-1} y 1240 cm^{-1} (Flemming, 2007). La naturaleza de la muestra no presenta enlaces P=O; sin embargo estos espectros coinciden con muestras de amonio registradas en bibliografía como espectros de amonio (Zhou *et al.*, 2014).

Lo mismo ocurre en la región cercana a los 1637 cm^{-1} . Esta banda ha sido caracterizada para espectros de amonio puro.

En la región próxima a los 3200 cm^{-1} se encuentra otro perfil de bandas conservada en los espectros. Esta región es asociada a uniones N-H, por estiramiento de amidas primarias (Davis y Mauer, 2010; Naumann, 2000; Sigma Aldrich corporation). En las muestras más diluidas esta región se acerca a los 3500 cm^{-1} , que es característica de grupos OH y se relaciona con la presencia de agua en la muestra.

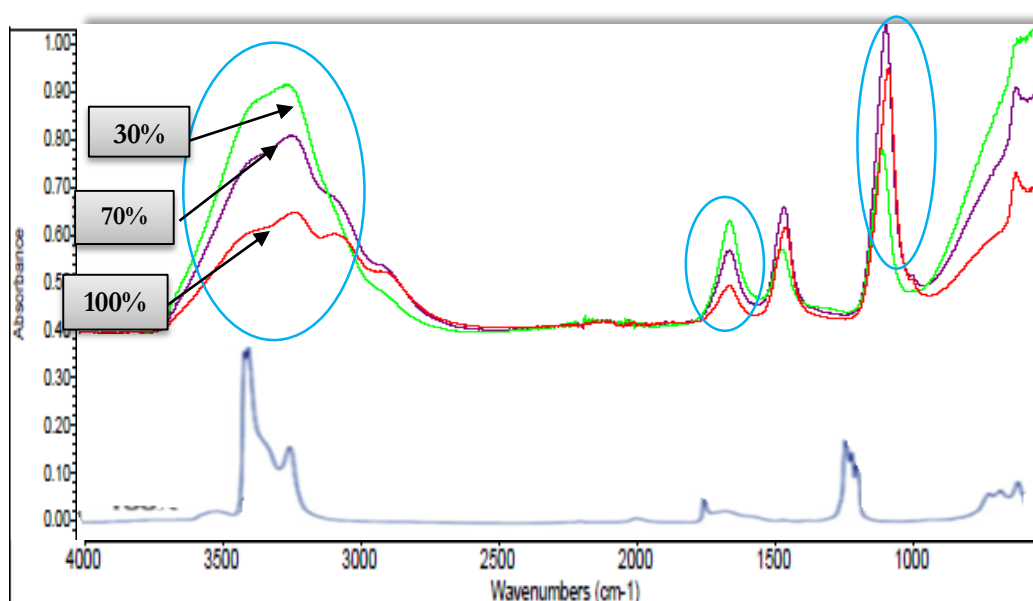


Figura 3.13. Espectros de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a diferentes concentraciones, comparados con espectro de amonio en transición de fase sólida (tomado de Weijun Zheng et al 2010.) Las muestras de sulfato de amonio fueron analizadas a una resolución de 4 cm^{-1} y ocho barridos.

De acuerdo con la interpretación del software, las regiones entre los 1050 y 1200 cm^{-1} , 950 cm^{-1} y entre los 600 y 650 cm^{-1} son características de grupos funcionales sulfato, que es parte de la composición de la sal. De acuerdo a Stuart

(2004), la banda característica de la sal de sulfato se encuentra en las regiones del espectro 1130, 1080, 680 y 610 cm^{-1} . Es común que las bandas se encuentren desfasadas en el espectro por la presencia de agua en las muestras.

Se puede concluir que las bandas obtenidas en los tres espectros son características del sulfato de amonio. Para caracterizar un compuesto desconocido, se puede hacer la comparación de muestras de compuestos desconocidos con espectros de compuestos caracterizados. Para ello no siempre es necesario hacer la interpretación de cada banda como un grupo funcional, sino observar los perfiles de bandas obtenidos en compuestos puros.

3.3.3. Bacterias liofilizadas

Las muestras de liofilizados fueron analizadas en solución con sulfato de amonio al 100% obteniendo los espectros mostrados en la figura 3.14

En la región que va de los 1035 a los 1038 cm^{-1} el espectro de la muestra de bacterias liofilizadas a 2000 ppm tiene una menor intensidad que los espectros de liofilizados a 4000ppm; en cambio estos últimos resultaron con intensidad similar a los de 8000 ppm. Stuart (2004), identifica las regiones entre 1040 y 930 cm^{-1} como características de uniones P-OH de grupos funcionales éster.

Un perfil que se mantiene en todos los espectros es el de la región que corresponde a los 1160 cm^{-1} ; de acuerdo a Stuart (2004), la región comprendida entre los 1100 y 1300 cm^{-1} corresponde a espectros de ésteres alifáticos con estiramientos C-O. Puede clasificarse como un éster con estiramiento de los enlaces C-O siempre y cuando exista otra banda en la región cercana a los 1300 cm^{-1} con una intensidad mayor que la banda cercana a la región entre los 1100 cm^{-1} .

Al hacer el análisis con ayuda del software para ubicar los picos de grupos funcionales, se encuentra que efectivamente existe una banda para la región muy próxima a los 1300 cm^{-1} . Las bandas para esta región se notan con mayor intensidad en las muestras más concentradas; por lo que se puede concluir que estas bandas se encuentran asociadas a grupos funcionales éster.

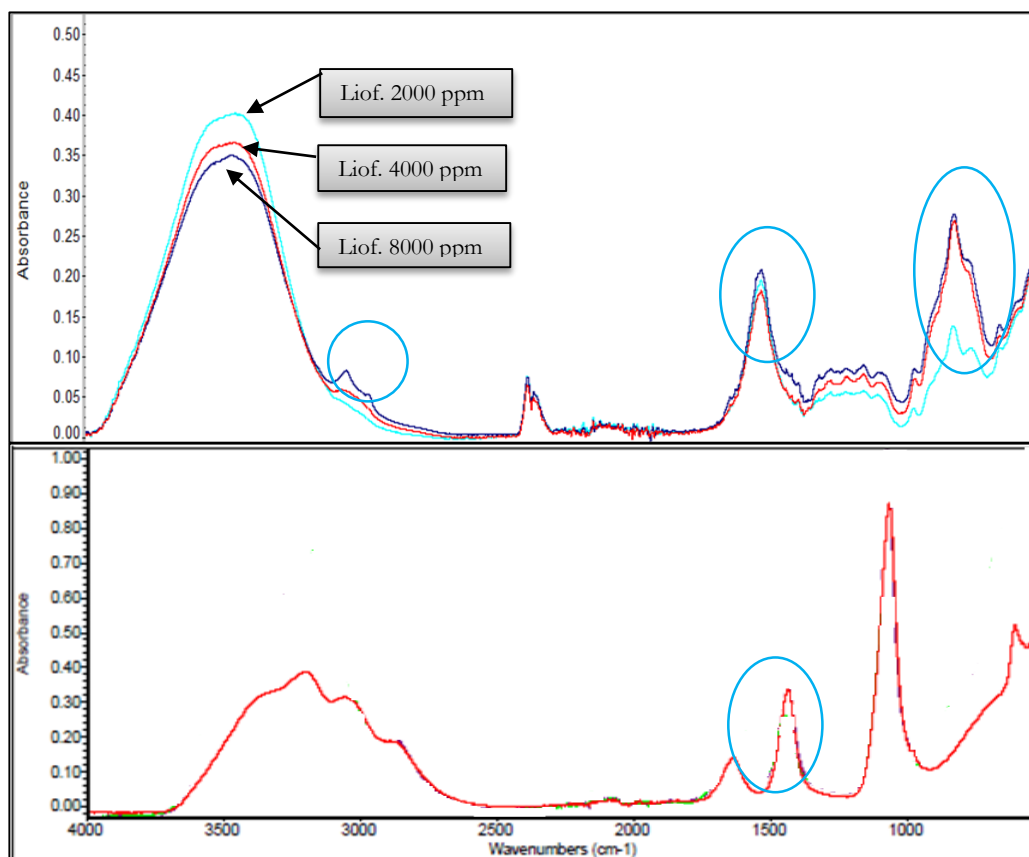


Figura 3.14. Espectros de bacterias liofilizadas en diferentes concentraciones y tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 100% comparadas con muestra blanco de sulfato de amonio al 100%

En todos los espectros, independientemente de la concentración se mantienen dos bandas entre las regiones de los 2300 y 2400 cm^{-1} ; estas regiones están asociadas a combinaciones de grupos funcionales C-H en compuestos orgánicos en intervalos de los 2200 a 2400 cm^{-1} (Stuart 2004).

Esta región no es muy bien caracterizada en la bibliografía. Sin embargo la presencia de estas regiones para todos los espectros nos habla de posibles interacciones entre compuestos orgánicos en la mezcla de bacterias liofilizadas. Esta banda está enmascarada junto con otras bandas, pero la absorbancia que presenta es mayor a la absorbancia presentada por las bandas cercanas a los 1160 cm^{-1} . Los ésteres son producto de la reacción entre ácidos grasos y alcoholes.

En los tres espectros se mantiene la banda de la región de los 1635 cm^{-1} ; de acuerdo con Davis y Mauer (2010), la región cercana a los 1637 cm^{-1} es característica de amidas tipo I de estructuras β en proteínas; por la mayor cercanía a la región bien caracterizada como aminas tipo I, se puede concluir la presencia de estructuras de proteínas en las muestras que representan una fracción de biomasa en inóculo (figura 3.15).

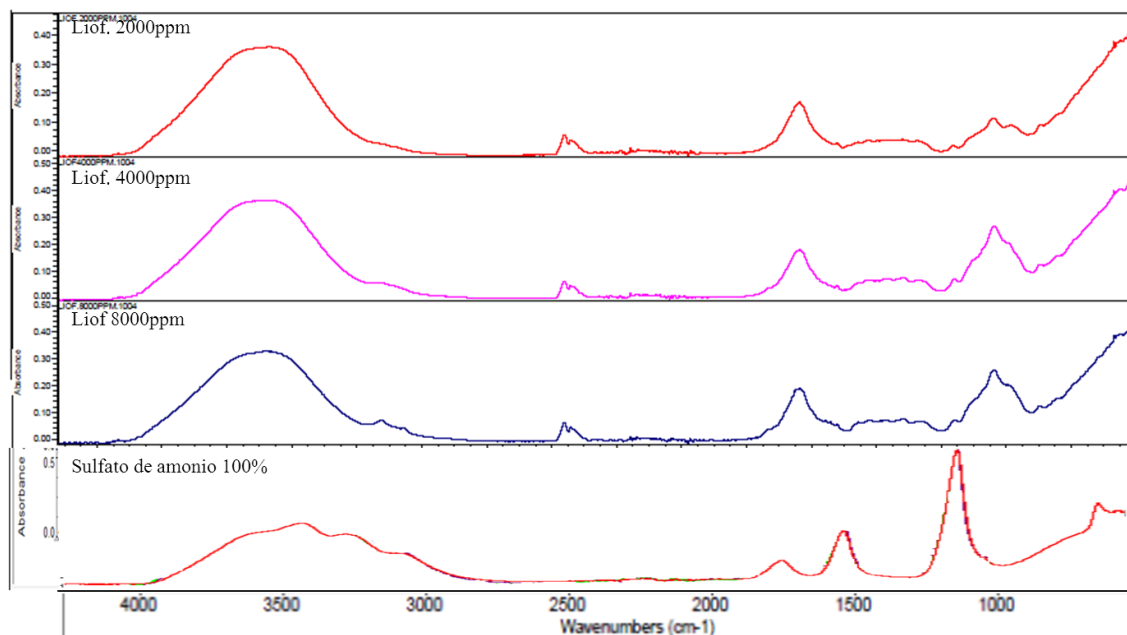


Figura 3.15. Acercamiento a los espectros de bacterias liofilizadas a diferentes concentraciones. Gráfica inferior: comparación con muestra de sulfato de amonio al 100%. Se observa que la región cercana a los 1637 cm^{-1} se mantiene para todas las muestras.

En la región del espectro entre los 2850 y 3000 cm^{-1} se encuentra graficada una banda que es más evidente en la muestra de liofilizados de 8000 ppm , y se va perdiendo al encontrarse más diluida la muestra. (Figura 6.16). Esta banda se encuentra graficada en los 2922 cm^{-1} para la muestra de liofilizados a 8000 ppm .

De acuerdo a Davis (2010) y Naumann (2000), las bandas cercanas a 2930 cm^{-1} son bandas características de uniones asimétricas de cadenas CH_2 en ácidos grasos; y específicamente en los 2927 cm^{-1} de algunos lípidos con un poco de contribución de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.

Finalmente, para todos los espectros se encuentran las bandas correspondientes a la región de los 3200 cm^{-1} , que en la bibliografía se asocia con grupos funcionales N-H (Naumann 2000, Davis y Mauer, 2010, SIGMA Aldrich corporation).

3.3.4. Albumina sérica

El *blanco* de albúmina como espectro de referencia de proteína pura no produjo un espectro diferencial para cada concentración; en el análisis del software se señalan algunos picos en regiones que se muestran planas en el espectro (Figura 3.3.16).

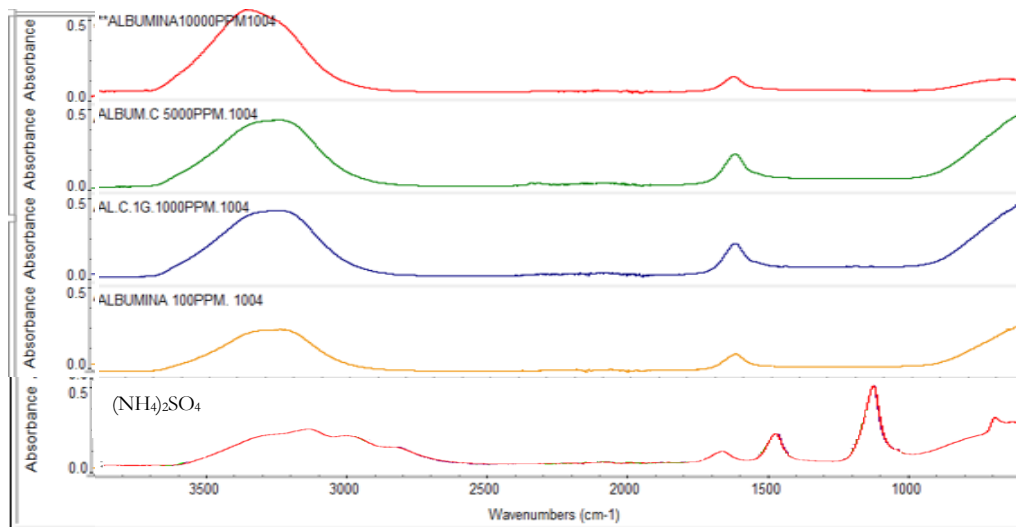


Figura 3.16. Espectros de albúmina sérica a diferentes concentraciones y comparación con muestra blanco de sulfato de amonio. Tratamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 100%.

Solo en dos regiones la absorbancia incrementa; una de ellas está entre los 1636 y 1635 cm^{-1} , que de acuerdo con Davis y Mauer (2010) y Naumann (2000) corresponden a grupos funcionales de amidas tipo I, de estructuras laminares β de proteínas. A pesar de que estas bandas se encuentran próximas a las bandas caracterizadas para el sulfato de amonio, en el espectro de albúmina se encuentran más desfasadas a los 3200 cm^{-1} , y se muestran con una mayor intensidad y grosor en las concentraciones más saturadas. Esta región corresponde a los grupos funcionales N-H de amidas primarias (Flemming, 2007).

Pese a que no existen diferencias apreciables entre los espectros de muestras a 10,000 ppm y los de muestras a 100 ppm; al estar más diluida la muestra, los picos de bandas próximas a los 1637 cm^{-1} se van alejando por la presencia de agua que interfiere en las interacciones proteína-proteína, incrementando su intensidad y proximidad hacia la región de los 3500 cm^{-1} que es la región característica de grupos funcionales OH (Davis y Mauer, 2010; Naumann, 2000).

Los espectros obtenidos son espectros referencia de proteínas puras, los cuales nos permiten observar un perfil de bandas en el espectro que las caracterizan.

3.4. ESPECTROS DEL *BIOFILM*

Se analizaron las muestras de *biofilm* a partir del día 28 de proceso en el reactor.

El crecimiento de *biofilm* bacteriano fue muy tardado porque no había adherencia al material de empaque.

Los primeros espectros obtenidos no fueron bien definidos al meter directamente la muestra de *biofilm* al espectroscopio ATR-FTIR, porque las muestras contenían demasiada agua, lo cual enmascaraba muchas bandas en el espectro.

Los espectros de las muestras obtenidas a lo largo del proceso fueron comparados primero por el tipo de tratamiento que se les dio, y después por los patrones de bandas conservados en función del tipo de tratamiento.

3.4.1 REACTOR A

3.4.1.1. Muestras secas

Durante las primeras pruebas solo se tomaron muestras del reactor A, que presentaba un mayor crecimiento de *biofilm*. En el día 31 de proceso se obtuvo un primer espectro con bandas mejor definidas.

La muestra obtenida fue analizada como muestra seca obteniendo el espectro de la figura 3.17. En el espectro obtenido las bandas cercanas a los 670 cm^{-1} se ven desfasadas.

La indefinición de las bandas no permite asegurar que se trate de productos de metabolismo y lisis celular que se encuentran dispersos en la matriz extracelular ella y que dan estructura al *biofilm*.

Se observa un patrón de bandas definidas en la región próxima a los 3300 cm^{-1} . Esta región puede considerarse como una región crítica, ya que hacia los 3307 cm^{-1} se puede encontrar la banda de grupos funcionales N-H relacionada a amidas primarias (Naumann 2000, Davis y Mauer, 2010, SIGMA Aldrich corporation).

Es posible que por la naturaleza de la muestra a la hora de ser analizada los restos de grupos funcionales N-H hayan sufrido deformaciones en la manera en la cual interactúan con otras moléculas (R-NH).

Aún con ello es posible la presencia de proteínas porque en el espectro se muestran otras bandas correspondientes a grupos funcionales de estructuras proteicas ya sea por estiramiento o deformación molecular al momento de la excitación magnética.

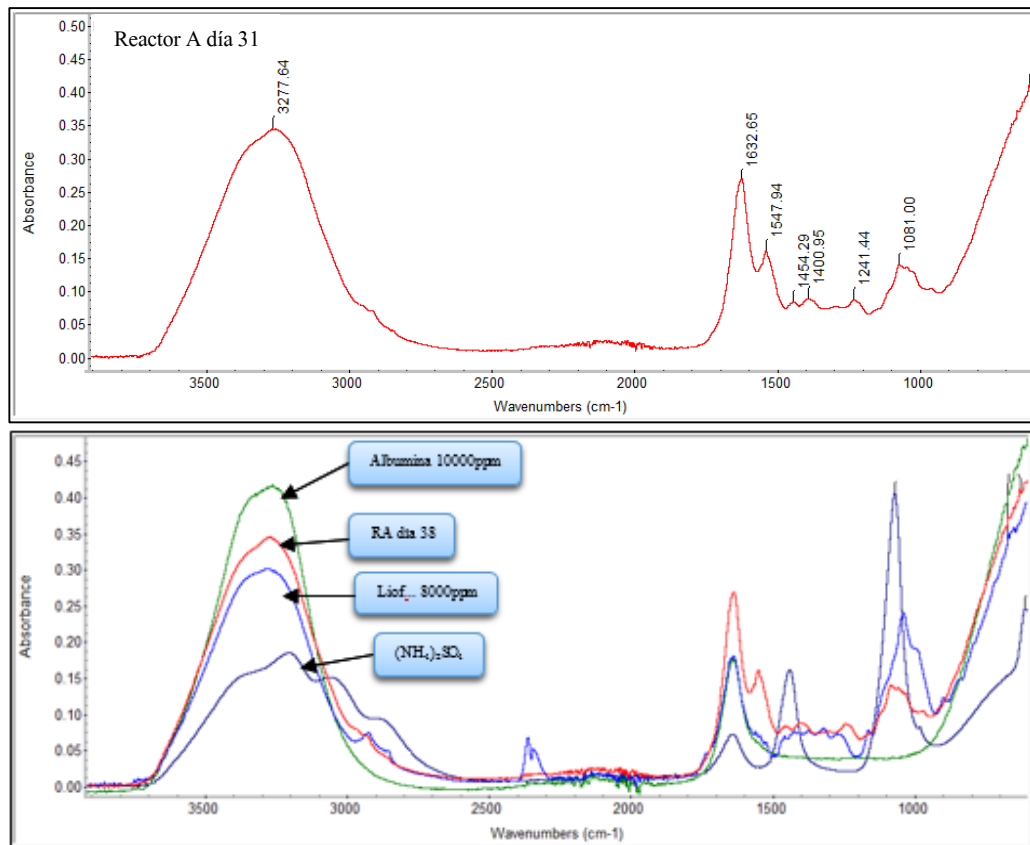


Figura 3.17. Espectro obtenido del *biofilm* en el reactor A. Muestra tratada por desecación; día de proceso 31, comparación de espectros blancos en las concentraciones más altas.

Los picos que se encuentran a 1081 cm^{-1} , son cercanos a la región característica de enlaces P=O simétricos de fosfolípidos y ácidos nucleicos (DNA y RNA) en los a 1085 cm^{-1} , de acuerdo con Mauer (2010) y Garip (2005)

A los 1241 cm^{-1} se encuentra otra banda muy cercana a los 1240 cm^{-1} que también corresponde a enlaces asimétricos P=O de enlaces fosfodiéster en fosfolípidos (Davis y Mauer, 2010). Este espectro muestra indicios de la presencia de fosfolípidos en la muestra de *biofilm*, que a su vez son parte de estructuras celulares que han sufrido lisis y que podrían ser parte ahora de la matriz del *biofilm*.

Estructuralmente la mayor parte de los fosfolípidos derivan de ácido fosfátidico, en el cual los fosfátidos son el grupo fosfato funcional que se une a otros compuestos nitrogenados (Solomons 1992, Madigan *et al.*, 2005). Debido a la

presencia de moléculas polares y no polares, los fosfátidos son solubles en agua y forman parte estructural de interfaces entre medios acuosos y orgánicos. Estos grupos funcionales se pueden encontrar en membranas y paredes celulares asociados con proteínas (Solomons, 1992).

A los 1400 cm^{-1} hay otra banda que de acuerdo con Mauer (2010), Naumann (2000) y Szymanska *et al* (2013) caracteriza a grupos funcionales de aminoácidos y ácidos grasos. Los ácidos grasos son los principales constituyentes de lípidos en bacterias y animales y solo una pequeña parte del total de la fracción de lípidos está formada por ácidos carboxílicos libres.

Los aminoácidos por otra parte forman parte estructural de proteínas y son moléculas orgánicas con un grupo amino y un grupo carboxilo y presentan dos características estructurales en proteínas; una de ellas es que todos se presentan como α -aminoácidos y a excepción de la glicina, tienen una configuración L en el carbono α (Solomons 1992, Madigan *et al.*, 2006).

A los 1454 cm^{-1} se presenta otra banda cercana a la región de uniones CH_2 de lípidos a los 1452 cm^{-1} , de acuerdo con Garip (2005).

A los 1547 cm^{-1} se encuentra la banda que corresponde a amidas tipo II de proteínas en un intervalo de los 1541 a los 1548 cm^{-1} (Garip, 2005; Naumann, 2000).

La banda ubicada a los 1632 cm^{-1} se encuentra cerca de la banda que caracteriza a grupos funcionales de amidas tipo I de estructuras laminares β en proteínas en los 1637 cm^{-1} (Naumann, 2000; Szymanska-Chargot y Zdunek, 2013).

Para los espectros obtenidos a partir del día 31 de proceso, el tratamiento por desecación no implicó el secado total de todas las muestras; esto dependía principalmente de la estructura del *biofilm* en el momento de ser colectado (Figura 3.18).

Si comparamos los patrones de bandas que se muestran en los espectros del *biofilm* colectado del Reactor A el día de proceso 31 con respecto a las muestras blanco (Figura 3.18); se puede observar que se mantienen cercanos algunos picos de bandas en las regiones entre los 1030 y 1081 cm^{-1} para todas las muestras excepto para el blanco de albúmina.

La muestra del Reactor A muestra una intensidad más baja que el blanco de sulfato de amonio y de liofilizados; sin embargo la región cercana a los 1080 - 1085 cm^{-1} de uniones simétricas $\text{P}=\text{O}$ de ácidos nucleicos y fosfolípidos en la muestra de *biofilm* del reactor A se encuentra mejor definida (Davis y Mauer, 2010; Garip, 2005; Naumann, 2000).

Entre los 1630 y 1640 cm^{-1} se conserva otra banda en todos los espectros, en esta región se encuentran caracterizadas aminas tipo I de estructuras laminares β de proteínas (Davis y Mauer, 2010; Naumann, 2000). En la muestra de albúmina y bacterias liofilizadas se ve más próxima los 1637 cm^{-1} , mientras que en el *biofilm* tiene mayor intensidad. La presencia de más de una banda característica de grupos funcionales amida es un indicador de grupos funcionales en proteínas.

La región entre 3203 y 3280 cm^{-1} también se conserva para todos los espectros. En la región próxima a los 3200 cm^{-1} se encuentra la región caracterizada de grupos funcionales de estiramientos N-H de amidas tipo I en proteínas (Davis y Mauer, 2010; Naumann, 2000, Silverstein *et al.*, 1981; SIGMA Aldrich corporation).

En el espectro del día del proceso 31 se muestra una banda cercana a la región característica de tirosina, uno de los 20 aminoácidos que forman proteínas y cuya banda se encuentra en los 1515 cm^{-1} (Davis y Mauer, 2010).

Para los espectros obtenidos a partir del día 31 de proceso, el tratamiento por desecación no implicó el secado total de todas las muestras; esto dependía principalmente de la estructura del *biofilm* en el momento de ser colectado (Figura 3.19).

Todas las muestras, a excepción de las que corresponden a los dos últimos días de operación, fueron analizadas a una resolución de 4 cm^{-1} y ocho barridos. Para los últimos dos espectros, las muestras se analizaron incrementando la resolución a 32 cm^{-1} con 32 barridos. Se puede apreciar que al incrementar la resolución, bandas que aparecen más definidas hacia el día de proceso 36, se muestran enmascaradas en los espectros con mayor resolución. (Figura 3.18).

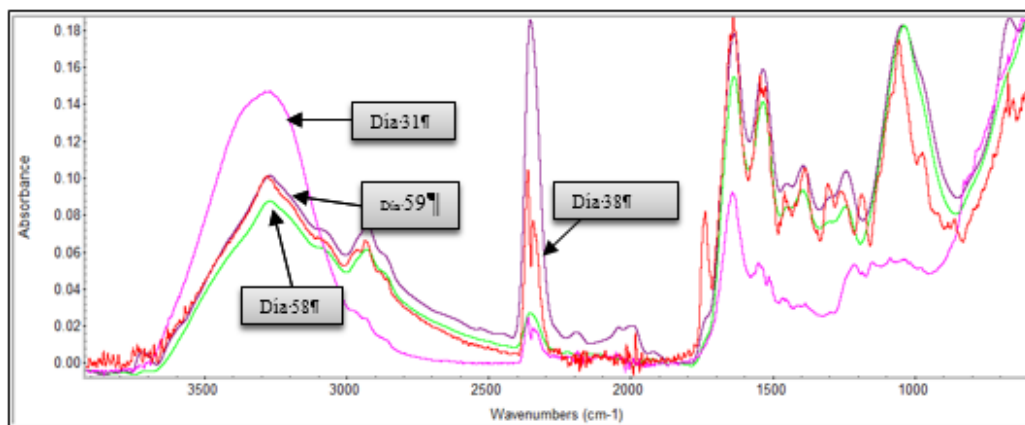


Figura 3.18. Comparación de los espectros del RA del día 31 al 59 del proceso.

A pesar de que es un rango mucho más amplio, para los espectros obtenidos la interpretación están más próximos hacia compuestos formadores de amidas; como las bandas ubicadas en la región entre los 1220 y 1020 cm^{-1} de estiramientos de uniones C-N en aminas alifáticas (Stuart 2004).

El grado de desecación de las muestras influye en la definición y desplazamiento de las bandas en los espectros (Rivera-chavira et al., 2005); esto se ve reflejado en las bandas características de P=O en fosfolípidos y ácidos nucleicos (Menzella, 2014), donde en hay disminución de la intensidad de bandas de grupos funcionales, y desplazamiento de éstas en las gráficas del espectro.

En los espectros de los días 58 y 59 el grado de resolución afecta la definición de las bandas. Los patrones de bandeado disminuyen con respecto a otros espectros, que a pesar de ser de días anteriores, van mostrando cada vez más bandas al transcurrir el tiempo. Es muy probable que esas bandas se encuentren enmascaradas por curvas que se muestran más anchas en el espectro.

Los espectros de los días de proceso 58 y 59 son similares en la región entre los 1000 y 1085 cm^{-1} , se puede observar que en el espectro correspondiente al día 38 de proceso la banda alcanza su mayor intensidad cerca de los 1050 cm^{-1} , lo cual implica que podría no tratarse de un grupo P=O, sino de otro grupo funcional formado de aminas (Jiménez, 2010).

Para estos días, se observa una superposición con las bandas de la región próxima a los 1630 y 1655 cm^{-1} . Ambas bandas corresponden a estructuras de α -hélices; sin embargo, la banda próxima a los 1541 cm^{-1} corresponde a amidas tipo II por uniones a proteínas N-H; mientras la región próxima a los 1655-1657 cm^{-1} es característica de amidas tipo I que corresponde a estiramientos C=O de proteínas en hélices α . (Cobos Becerra, 2013). Por la presencia de estas bandas, podemos concluir que en la muestra existen estructuras secundarias de proteínas más complejas que pudieron haberse descompuesto en otros fragmentos por efecto del tratamiento de secado.

Para las bandas cercanas a los 1236 y 1240 cm^{-1} , los patrones de picos van siendo cada vez más cercanos a esta región al pasar tiempo de proceso con formación de biomasa en el reactor. Esta región también es característica de grupos funcionales P=O de enlaces fosfodiéster en fosfolípidos (Fiona Lyng, Ehsan Gazi, 2012).

Hacia la región próxima a los 1391-1400 cm^{-1} (uniones C-C de grupos COO^- en cadenas de aminoácidos y ácidos grasos), las bandas de los últimos espectros se observan más cercanas y con mayor intensidad con respecto a los espectros de los primeros días (Davis y Mauer, 2010; Naumann, 2000; Szymanska-Chargot y Zdunek, 2013). Esto implica la existenggia de estructuras más complejas en la matriz del biofilm. No se descarta que gran parte de la muestra analizada contenga

también fragmentos celulares productos de una lisis inducida por el proceso de desecamiento.

De acuerdo con Garip (2005) y Naumann (2000), la región del espectro que se encuentra entre los 1541 y 1548 cm^{-1} es característica de amidas tipo II de hélices α en proteínas. En el espectro se observa que las bandas son más cercanas a ésta región en los días 31 y 36 del proceso que en los días 58 y 59, pero se van haciendo más intensas al estar en un día de proceso más avanzado. La banda más intensa para esta región corresponde al día de proceso 36.

En los espectros se observa un patrón característico de bandas cercanas a la región de los 2350 cm^{-1} . De acuerdo con Stuart (2004), la región ubicada en los 2349 cm^{-1} corresponde a CO_2 .

La presencia de CO_2 en la muestra podría significar un producto de alguna ruta metabólica; sin embargo, por el tipo de tratamiento también se podría inferir que podría ser algún producto del calentamiento (Figura 3.19).

En la región próxima a los 3270 cm^{-1} , las bandas para todos los espectros se mantienen cercanas. La región más próxima a esta zona corresponde a 3307 cm^{-1} , que es característica de vibraciones de estiramientos O-H y N-H en polisacáridos y proteínas. Esta región se aprecia con una menor intensidad en los días de proceso finales que en los primeros 30 días.

No se puede asegurar qué fracción de todas estas proteínas corresponde a estructuras de lisis celular inducida, y qué fracción a estructuras de soporte en la matriz del *biofilm* microbiano. Lo que se puede apreciar es que pese a que el sistema de reactor muestra muchos cambios a lo largo del tiempo, hay un crecimiento de biomasa en el medio de soporte por un incremento en las poblaciones de bacterias; el cual se ve reflejado en la aparición de bandas más definidas características de estructuras de proteínas.

Estos perfiles se mantienen desde los primeros días del proceso, pero se van definiendo más al transcurrir el tiempo.

3.4.1.2. Muestras tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Los espectros obtenidos se muestran de manera comparativa en la figura 3.19, para concentraciones de sulfato de amonio al 70%. Al igual que en los espectros de muestras secas, al transcurrir el tiempo de proceso aparecen nuevas bandas.

Por el corto tiempo que hay entre la colecta de un espectro y otro, no se pueden asociar éstos al día de proceso, pero si como espectros comparativos al tratamiento de desecamiento de muestras para encontrar patrones en común.

Se descartaron las muestras tratadas con la sal al 30% por la interferencia de agua en las muestras.

Se puede observar que las muestras tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% coinciden con los espectros tratados por desecación en los picos cercanos a las región de los 1085 cm^{-1}

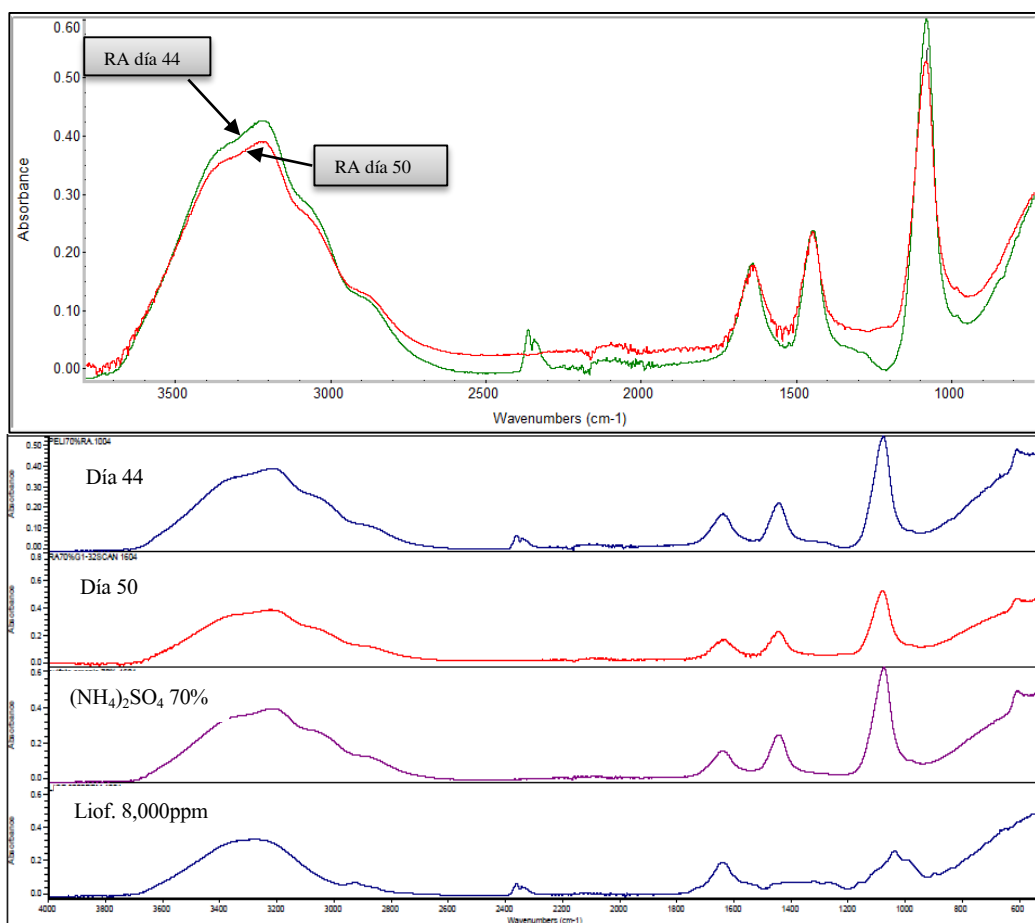


Figura 3.19. Espectros obtenidos por tratamiento con sulfato de amonio al 70% comparados con espectros de muestras blanco.

En la región próxima a los 1637 cm^{-1} se conservan las bandas de los espectros tanto para las muestras secas como para las tratadas con sulfato de amonio al 70%. Esta banda corresponde a amidas tipo I de estructuras laminares β (Naumann, 2000). La región cercana a los 3200 cm^{-1} también permanece para todos los espectros, pero

se acerca mucho más a 3200 cm^{-1} en las muestras tratadas con sulfato de amonio al 70%.

Pese al tratamiento con sulfato de amonio, todas las muestras conservaban humedad por la solución de la sal; por lo cual se les consideró como muestras húmedas. Es importante mencionar esto porque a pesar de la presencia de agua en las muestras, se puede notar que efectivamente la sal si interfiere en las uniones nitrógeno-agua dejando libres más uniones proteína-proteína.

Utilizando la sal de sulfato de amonio se puede observar que también se presenta la banda correspondiente a CO_2 en el espectro correspondiente al día 44 del proceso (Stuart, 2004). El CO_2 puede estar siempre presente en las muestras aunque no en todos los espectros se observe. Esto es porque el CO_2 es el principal producto ácido del metabolismo celular.

Otra parte de las muestras fueron tratadas con sulfato de amonio al 100% antes de su análisis en el espectroscopio IR. (Figura 3.20) Al transcurrir el tiempo de proceso aparecen patrones de bandas similares a los patrones obtenidos en los espectros de muestras tratadas por desecación.

Las muestras tratadas con sulfato de amonio al 70%, muestran una mayor intensidad en la frecuencia de sus picos con respecto a las muestras tratadas con el 100% de la sal.

En general para los espectros obtenidos, todas las bandas presentan cercanía a la región que corresponde a uniones $\text{P}=\text{O}$ de ácidos nucleicos y fosfolípidos (1085 cm^{-1}) (Garip, 2005). En los últimos dos espectros se mantienen las regiones cercanas a los $1236\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$, de uniones $\text{P}=\text{O}$ en ácidos nucleicos con pequeñas contribuciones de fosfolípidos; así como las regiones cercanas a los 1541 cm^{-1} , donde hay uniones N-H de amidas tipo II en proteínas (Davis y Mauer, 2010; Naumann, 2000). En todos los espectros se encuentra la banda cercana a los 1637 cm^{-1} de amidas tipo I. La región después de los 3200 cm^{-1} varía en los tres espectros, pero coincide con la zona de grupos funcionales de amidas tipo I (Naumann, 2000; Szymanska-Chargot y Zdunek, 2013).

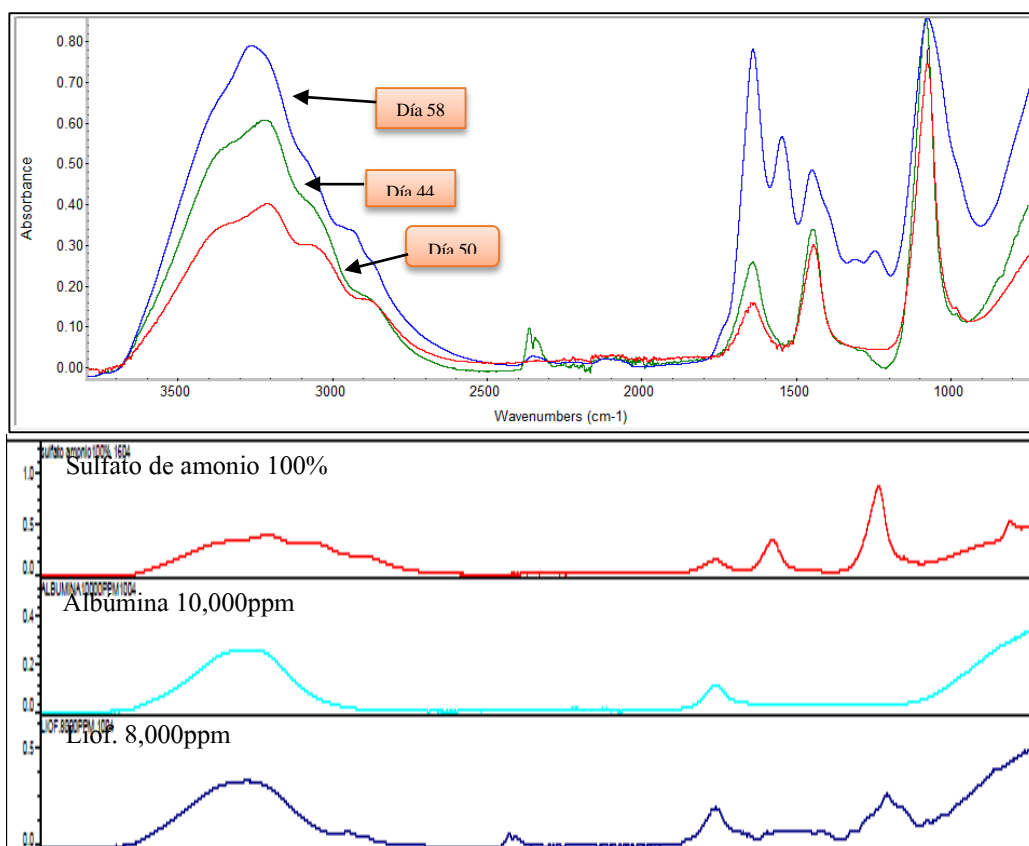


Figura 3.20. Comparación de los espectros obtenidos con el tratamiento de sulfato de amonio al 100% y muestras blanco.

Este parámetro de comparación por el tipo de tratamiento muestra que las bandas correspondientes a proteínas se mantienen para todos los espectros, pero en las muestras tratadas con sulfato de amonio se pueden apreciar otros espectros de compuestos que no fueron degradados o alterados por acción de la temperatura y pérdida de humedad.

En las muestras tratadas por desecación, al incrementar la resolución y número de barridos, los espectros parecen enmascarar bandas que en una menor resolución se hacen presentes en la gráfica del espectro; mientras que en las muestras tratadas con sulfato de amonio al 100%, estas bandas parecen hacerse más evidentes al aumentar la resolución y número de barridos. Esto podría representar un parámetro a considerar al momento de analizar las muestras; ya que dependiendo del tratamiento que se le dé a la muestra podría ser conveniente o no incrementar la resolución y número de barridos.

Como se puede ver en las muestras secas, hay un grado de desnaturalización de proteínas, pero las bandas de grupos funcionales que las caracterizan se mantienen.

Es muy probable que se aprecien más bandas por la presencia de muchas fracciones de proteínas de estructura más compleja que permitan ver espectros con más momentos vibracionales. Para estas muestras no es necesario tener una resolución alta. Recordemos que al aumentar la resolución disminuye el intervalo en el cual el espectro colecta los datos de vibración molecular, y al no existir interferencia de agua por exceso de humedad, los momentos vibracionales pueden ser detectados de manera más específica sin necesidad de tomar muestras espectrales con intervalos cortos de medición (Serrano, 2004).

En una muestra seca hay muchas moléculas libres que han roto sus uniones por diferentes impedimentos estéricos consecuencia de la desecación.

Por el contrario, en las muestras tratadas con sulfato de amonio al 100% y con una resolución y número de barridos mayores, las bandas se hacen más evidentes.

Esto puede deberse a que al haber un grado alto de humedad en las muestras, una alta resolución y menor intervalo en la toma de datos permite captar a los grupos funcionales en diferentes momentos vibracionales que los diferencian como grupos característicos de ciertos compuestos, pero que podrían estar interactuando con otras moléculas por uniones covalentes como puentes de hidrógeno

3.4.2. REACTOR B.

3.4.2.1. Muestras secas

Las muestras de *biofilm* del reactor B fueron colectadas a partir del día 34 de proceso.

Los espectros correspondientes a los días de proceso 34, 36 y 38 fueron analizados en una resolución de 4 cm^{-1} y ocho barridos; mientras que los últimos dos espectros correspondientes a los días 58 y 59 de proceso fueron analizados a una resolución de 32 cm^{-1} y 32 barridos (Figura 3.21).

A partir del día de proceso 38 se nota un incremento en el número de bandas en la región entre los 1000 y 1800 cm^{-1} , en los espectros de días posteriores estas bandas no se aprecian claramente. El incremento en la resolución y número de barridos interfirió al tomar más muestras en diferentes momentos vibracionales y sobreponer bandas en el espectro de la misma manera que para las muestras de *biofilm* desecadas en el reactor A.

La región cercana a los 1085 cm^{-1} (uniones P=O en ácidos nucleicos y fosfolípidos) se encuentra muy variable en todos los espectros (Davis y Mauer, 2010; Naumann, 2000). El espectro correspondiente al día de proceso 36 es el más cercano a ésta región; sin embargo es la banda con menor intensidad respecto a los demás espectros.

Los patrones de bandas corresponden a sitios cercanos a regiones caracterizadas de estructuras β laminares y α -hélices, no se puede interpretar a esta región como una región con grupos sulfóxidos a pesar de ser reconocida como tal por Stuart (2004). (Stuart 2004, Solomons 1992; Lenhinger 1988). Por la intensidad de las bandas se puede interpretar que estos espectros corresponden a grupos funcionales de amidas; como las bandas ubicadas en la región entre los 1220 y 1020 cm^{-1} de estiramientos de uniones C-N en aminas alifáticas (Stuart 2004).

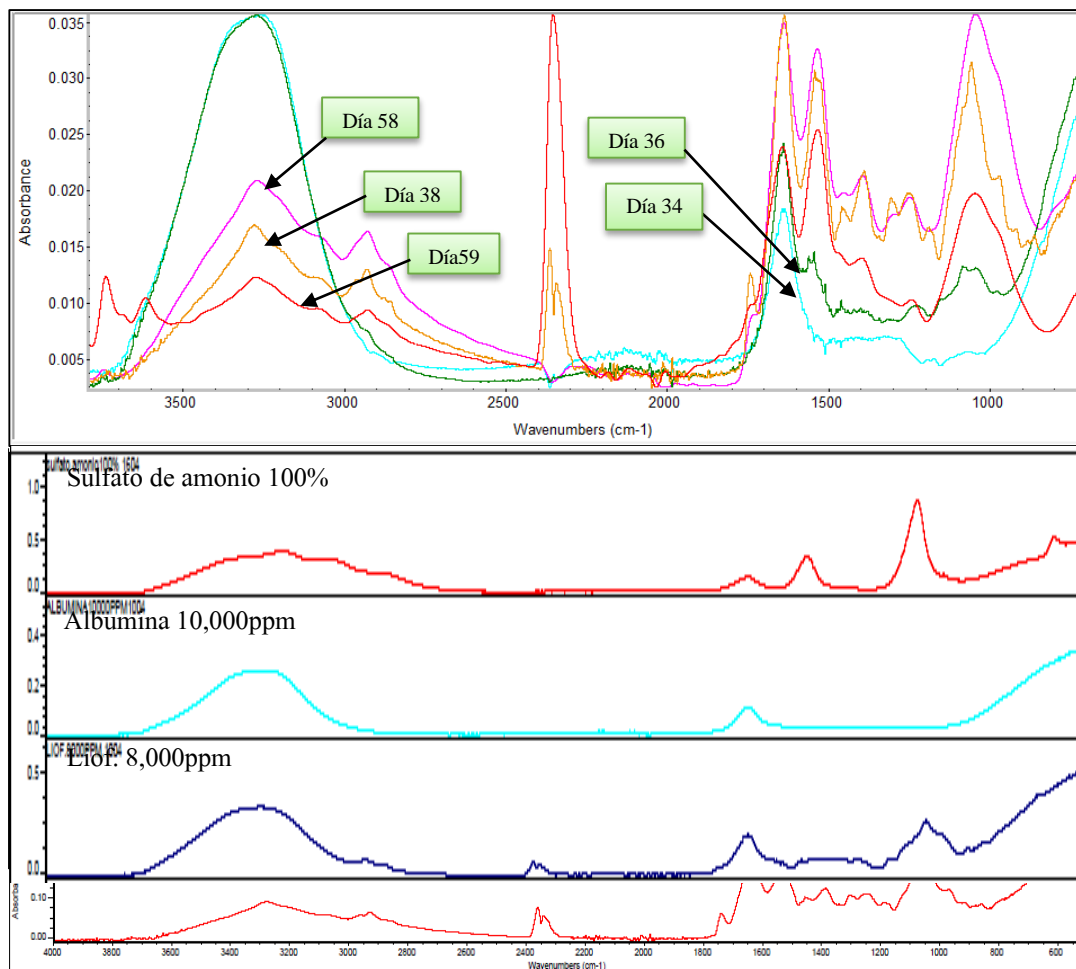


Figura 3.21. Comparación de los espectros de *biofilm* obtenidos del reactor B en los días de proceso 34 a 59 y muestras blanco.

Los perfiles de bandas que se mantienen en los diferentes momentos del proceso en el reactor B se encuentran en la región cercana a los 1240 cm^{-1} , que corresponde

a estiramientos C-O de ácidos carboxílicos (Stuart, 2004); de acuerdo a Neumann (2000), Mauer (2010) y Garip (2005), esta región es característica de estiramientos simétricos de P=O en fosfolípidos; sin embargo, los fosfolípidos están constituidos por ácidos carboxílicos.

En los espectros obtenidos a partir del día 36 de proceso coinciden en regiones cercanas a los 1390 cm^{-1} , que corresponden a uniones simétricas C=O de estiramientos de grupos COO^- en aminoácidos y ácidos grasos (Davis y Mauer, 2010; Garip, 2005; Naumann, 2000). Para todos los espectros obtenidos se mantiene la región próxima a los 1530 cm^{-1} , cuya región es cercana a la región de amidas tipo II en proteínas ($1520\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$), pero que tiene su máximo pico en los 1541 cm^{-1} para uniones N-H en proteínas (Fiona Lyng, Ehsan Gazi, 2012).

En los días de proceso 36 y 38 se muestran espectros con bandas cercanas a los 1460 cm^{-1} ; estas bandas están cerca de la región caracterizada para deformaciones C-H de cadenas de CH_2 en proteínas y lípidos (Davis y Mauer, 2010; Naumann, 2000).

En los espectros correspondientes a los días 38, 58 y 59 de proceso se mantienen bandas de regiones cercanas a los 2930 cm^{-1} , esta región coincide con el espectro de grupos funcionales C-H por estiramiento de cadenas de CH_2 en ácidos grasos (Naumann, 2000); pero también coincide con algunos lípidos y a pequeñas contribuciones de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Garip 2005). En los espectros se puede observar que este pico va incrementando en intensidad y ancho de banda al pasar más días de proceso.

Recordemos que en el espectro se muestran las frecuencias de grupos funcionales contra la absorbancia que estos presentan. Al incrementarse la intensidad de las bandas en esta región significa que hay una mayor frecuencia de estos grupos funcionales; lo cual está directamente relacionado con un incremento en la biomasa dentro de los reactores a lo largo del tiempo (figura 3.22).

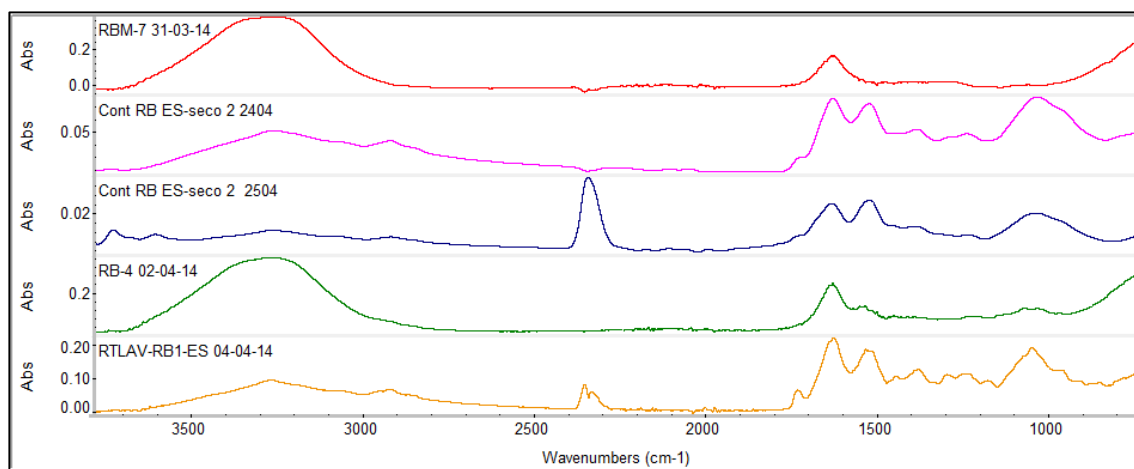


Figura 3.22. Comparación de los espectros obtenidos del biofilm del reactor B durante el proceso.

A pesar de incrementar la resolución y verse un efecto de enmascaramiento de bandas, los espectros que corresponden a grupos funcionales bien definidos se mantienen, pero el grosor de sus bandas incrementa.

En todos los espectros, excepto en el que corresponde al día de proceso 34, podemos encontrar bandas en las regiones que abarcan entre los 1630 y 1640 cm^{-1} . Esta región está muy próxima a los 1637 cm^{-1} , característica de amidas tipo I de estructuras laminares β en proteínas (Davis y Mauer, 2010; Garip, 2005; Naumann, 2000).

Las bandas que se encuentran próximas a los 3260 cm^{-1} coinciden; de acuerdo a Naumann (2000) y Mauer (2010), las regiones próximas a los 3200 cm^{-1} son características de estiramientos N-H de amidas I en proteínas; además de esta región, hasta los 3307 cm^{-1} , Garip (2005) describe estas regiones también como vibraciones N-H y O-H no solo para proteínas sino también para polisacáridos.

3.4.2.2. Muestras tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Las muestras de *biofilm* obtenidas también fueron tratadas con una sal de sulfato de amonio al 100 y 70%.

Para las muestras tratadas con la sal al 70% los espectros se muestran en la figura 3.23. Todas las muestras fueron analizadas a una resolución de 4 cm^{-1} con ocho barridos por muestra. A pesar de que solo se obtuvieron dos espectros para estas muestras, se distinguen regiones conservadas. La mayor parte éstos grupos pertenecen a enlaces de estructuras de proteínas (amida de tipo I y II) y lípidos (Davis y Mauer, 2010; Naumann, 2000; Szymanska-Chargot y Zdunek, 2013).

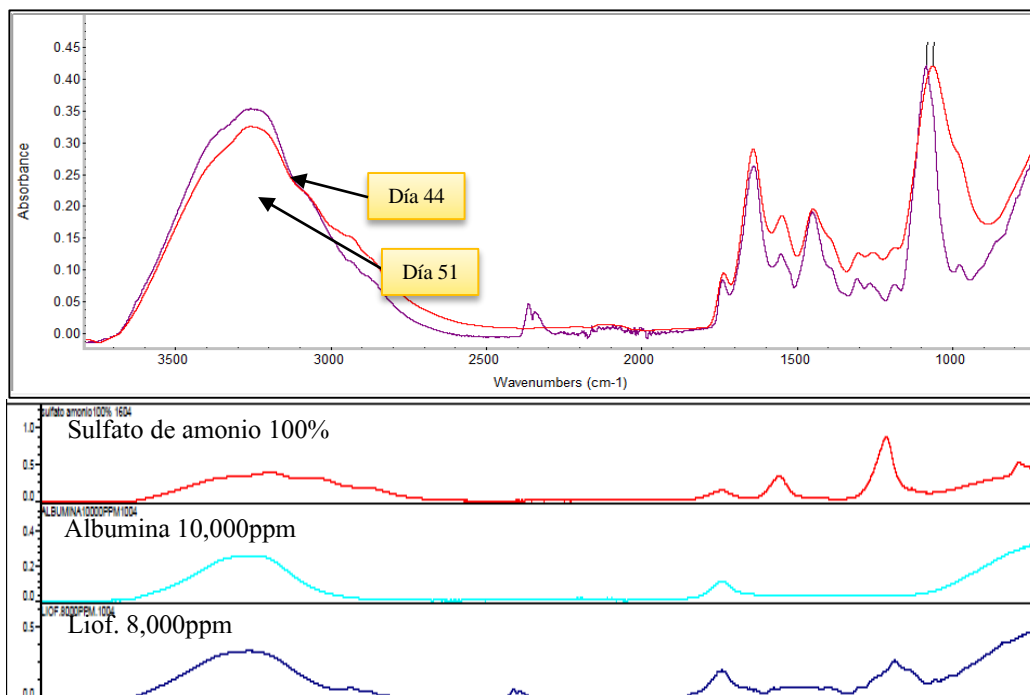


Figura 3.23. Comparación de los espectros de *biofilm* obtenidos del reactor B y tratados con la sal de sulfato de amonio al 70% comparados con muestras blanco.

En el espectro correspondiente a el día de proceso 44 aparecen más bandas que para el día 51 de proceso.

La región 1183 cm^{-1} es cercana a la región caracterizada para estiramientos asimétricos CO-O-C de glucógeno y ácidos nucleicos de acuerdo con Garip (2005) (región próxima a los 1152 cm^{-1}).

En el primer espectro la banda que se encuentra en los 1303 cm^{-1} corresponde a la región entre los 1240 y 1310 cm^{-1} de amidas tipo III componentes de proteínas (Davis y Mauer, 2010)

Las bandas cercanas a las regiones de 1640 cm^{-1} se conservan, esta región es de estructuras laminares β (Naumann, 2000), al igual que las regiones próximas a los 1200 cm^{-1} , aunque los picos se encuentran relativamente distantes uno de otro. Regiones de uniones N-H en amidas A de proteínas y vibraciones O-H en polisacáridos (Stuart, 2004).

Para el *biofilm* del día 51 de proceso se hizo con una resolución de 32 cm^{-1} y 32 barridos. Para todos los espectros obtenidos en todos los análisis, la búsqueda de picos pertenecientes a grupos funcionales se llevó a cabo con una sensibilidad del 73%.

Para este espectro, a partir de los 1100 cm^{-1} se puede encontrar la primera banda de uniones P=O en fosfolípidos y ácidos nucleicos (Garip, 2005)

La región de los 1256 cm^{-1} se encuentra muy cercana a los 1240 cm^{-1} , que también corresponde a uniones P=O de grupos fosfodiéster en fosfolípidos (Naumann, 2000; Davis y Mauer, 2010; Garip, 2005)

En el espectro del día de proceso 51 aparece la banda correspondiente a amidas tipo II de uniones en proteínas N-H y estiramientos C-N en hélices α de proteínas. De igual forma se mantiene más próximo en el espectro del día 51 la banda que corresponde a amidas I de estructuras laminares β en proteínas.

Se caracterizan también dos picos para las regiones de 2731 y 2925 cm^{-1} que no son muy evidentes en la gráfica, pero que corresponden para la primera región a estiramientos éster de grupos C=O en triacilgliceroles; mientras que la segunda corresponde a estiramientos asimétricos de CH_2 de algunos lípidos, con un poco de contribución de grupos funcionales de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Garip 2005, Naumann 2000).

Es interesante que en las muestras que no fueron tratadas por desecación, se encontraran bandas en los espectros que correspondían a grupos funcionales diferentes de proteínas; aunque estas no se encontraban en abundancia a pesar de no haber recibido un tratamiento tan abrasivo como es el de secado por calor a altas temperaturas.

3.5. GRUPOS FUNCIONALES ENCONTRADOS EN EL *BIOFILM*

Podemos clasificar a las aminas primarias y secundarias en el espectro de infrarrojo por la cantidad de bandas que presentan hacia la región próxima a los 3300 cm^{-1} . Las amidas primarias suelen presentar dos bandas en estas regiones, mientras que las amidas secundarias solo una banda (Solomons 1994).

En bacterias, así como en animales, los ácidos grasos son los principales componentes de los lípidos. Estos tienen regiones hidrofóbicas e hidrofílicas; los triacilgliceroles están compuestos a su vez de ácidos grasos unidos al alcohol glicerol que tiene tres átomos de carbono; estos son lípidos simples (Madigan *et al.*, 2005).

En los espectros obtenidos para todas las muestras independientemente del proceso se obtuvieron grupos funcionales de lípidos, pero también de fosfolípidos, que son lípidos complejos que tienen grupos funcionales fosfato, y que tienen una función estructural en la membrana celular al servir como estructuras de soporte en la membrana citoplasmática.

De acuerdo a todos los grupos funcionales encontrados para los espectros de *biofilm* de los reactores A y B, las bandas obtenidas independientemente del tipo de tratamiento que se les dio se pueden resumir en la tabla 3.5.

TABLA 3.5. Grupos funcionales encontrados en los espectros de *biofilms* bacterianos en reactores A y B.

Frecuencia (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Referencias
~3500 cm ⁻¹	O-H estiramiento de grupos hidroxilo	Naumann 2000, Davis and Mauer, 2010
~3307-3200 cm ⁻¹	N-H estiramiento de amidas primarias, en 1307 cm ⁻¹ , componentes de polisacáridos y proteínas	Naumann 2000, Davis and Mauer, 2010, Garip, 2005; SIGMA Aldrich corporation.
2934 cm ⁻¹	C-H estiramiento asimétrico de >CH ₂	Naumann 2000
2927 cm ⁻¹	CH ₂ estiramientos asimétricos; principalmente lípidos, con un poco de contribución de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.	Naumann et al, 1990, Rigas et al. 1991; Wong et al. 1997, Garip, 2005
2852 cm ⁻¹	Estiramientos simétricos de C-H de cadenas de CH ₂ en ácidos grasos	Naumann, 2000
2600-2550	Intensidad media de grupos S-H, estiramiento de thiol	Stuart, 2004.
2349 cm ⁻¹	Intensidad débil de grupos funcionales O=C=O, dióxido de carbono	Stuart, 2004
1637 cm ⁻¹	Amida I de estructuras lámina β	Naumann 2000, Davis and Mauer, 2010
1630-1600 cm ⁻¹	Estiramientos asimétricos de grupos –COO ⁻ correspondientes a	Szymanska, Zdunek. 2012
1550-1520 cm ⁻¹	Amida II. Deformación N-H de proteínas	Szymanska, Zdunek. 2012, Davis and Mauer, 2010,
1548-1541 cm ⁻¹	Amida II (proteínas con uniones N-H y estiramiento C-N) α-hélices	Naumann 2000; Garip, 2005
1400 cm ⁻¹	C=O uniones asimétricas de grupos COO ⁻ en aminoácidos y ácidos grasos	Naumann 2000, Davis and Mauer, 2010; Szymanska, Zdunek. 2012
1452 cm ⁻¹	Uniones CH ₂ : lípidos	Naumann et al, 1990, Rigas et al. 1991, Takashi et al, 1991; Wong et al. 1997
1310-1240 cm ⁻¹	Bandas Amida III, componentes de proteínas.	Naumann 2000
1240 cm ⁻¹	P=O uniones asimétricas de fosfodiéster en fosfolípidos	Davis and Mauer, 2010; Garip, 2005, Parikh, 2005
1085 cm ⁻¹	P=O uniones simétricas en DNA, RNA y fosfolípidos.	Davis and Mauer, 2010; Garip, 2005.

4. CONCLUSIONES

Se logró la remoción de nutrientes en el agua residual suministrada a ambos reactores, obteniendo la remoción de hasta 44 % de DQO, 88% de nitrógeno orgánico, 50 % en ortofosfatos y hasta 91% de SST en el efluente con respecto al contenido de ambos reactores. Se concluye la eficiencia de remoción de nutrientes de agua residual municipal para el diseño propuesto con una carga orgánica superficial de 8g de DQO/m²-día.

Tomar en cuenta la resolución a utilizar de acuerdo al tipo de muestra a analizar permitió obtener espectros de espectroscopia infrarrojo más definidos. En los días de operación 58 y 59 el análisis espectroscópico se llevó a cabo con una resolución de 32 cm⁻¹ y 32 barridos (recordemos que una resolución estándar va de los 2 a los 4 cm⁻¹); lo cual resultó en espectros más definidos para las muestras tratadas con sulfato de amonio, pero con menor definición para las muestras tratadas por desecación.

Tanto por el tratamiento de la muestra de *biofilm* con sulfato de amonio como por desecación se obtuvieron espectros de grupos funcionales que mantienen un perfil de estructuras de proteínas así como de algunos azúcares y ácidos carboxílicos, además de lípidos y estructuras de ácidos grasos.

Independientemente del tipo de tratamiento, en la mayor parte de los espectros se mantienen perfiles de bandas cercanas a los 3200 cm⁻¹ de amidas primarias, 1085 cm⁻¹ de enlaces fosfodiéster, 1541 cm⁻¹ de estiramiento en uniones N-H característicos de amidas tipo II, así como de amidas tipo I cercanas a los 1637 cm⁻¹ y lípidos con bandas cercanas a la región de los 2927 cm⁻¹. Otras bandas secundarias presentes durante el seguimiento de los espectros fueron aquellas que caracterizan a ácidos nucleicos, aminoácidos y ácidos grasos cercanos a los 1400 cm⁻¹.

Se puede concluir que ambos métodos son aplicables en el análisis de estructuras como *biofilms* bacterianos por espectroscopia infrarrojo; pero si se busca caracterizar los compuesto presentes en general es preferible tratar las muestras por desecación; se propone la liofilización como método de tratamiento de las muestras porque asegura la permanencia de estructuras más íntegras del *biofilm*; mientras que si lo que se busca es la cuantificación de proteínas como una forma de evaluar el crecimiento de biomasa, lo recomendable es hacer el tratamiento con sales saturadas de sulfato de amonio y una centrifugación diferencial

Hay una mayor intensidad y grosor de las bandas que mantienen un perfil de estructuras de proteínas en las muestras del *biofilm* comparado con la intensidad y grosor de bandas en la muestra control de albúmina.

Se concluye que la espectroscopia infrarrojo permite llevar a cabo el análisis de crecimiento de *biofilms* por seguimiento de la evolución del espectro, reflejado en la aparición y modificación de bandas a lo largo del tiempo.

La técnica de espectroscopia infrarrojo permite hacer el análisis cualitativo de grupos funcionales de compuestos presentes en *biofilms* microbianos que crecen en reactores para tratamiento de aguas residuales. Estos grupos funcionales varían de acuerdo a los parámetros físicos de operación como son la presión y temperatura, así como el tipo de reactor en el cual crecen (es decir, si son aerobios o anaerobios).

La técnica de espectroscopia ATR-FTIR es una herramienta útil para ver la presencia de proteínas que se encuentran asociadas a la presencia de biomasa cuando se comparan con otras técnicas analíticas como son la evaluación de nitrógeno orgánico junto con la evaluación de la remoción de nutrientes.

La técnica de espectroscopia ATR-FTIR es una herramienta promisoría para ver la evolución de crecimiento de *biofilms* microbianos si se hace el seguimiento de manera continua en la evolución de los espectros a través del tiempo.

También es una herramienta que puede ser utilizada para evaluar la degradación de compuestos de interés presentes en aguas residuales.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (2013). “*Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater*”. Edition 22. United States of America, Washington.
- Alvarez-Ordóñez, A., y Prieto, M. (2012). *Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Food Microbiology*. Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4614-3813-7
- Cobos Becerra, Y. L. (2013). *Filtración biológica de aguas residuales conteniendo colorantes azo*. Tesis de Doctorqdo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Becerra, Y. L. C. (2009). Eliminación de nitrógeno amoniacal y nitratos usando gránulos aerobios. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Côté, G. L., y Leathers, T. D. (2009). *Insoluble glucans from planktonic and biofilm cultures of mutants of Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 149–54. doi:10.1007/s00253-008-1767-9
- Davis, R., y Mauer, L. J. (2010). *Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria*, (1), 1582–1594.
- Delille, A., Quilès, F., y Humbert, F. (2007). *In situ monitoring of the nascent Pseudomonas fluorescens biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5782–8. doi:10.1128/AEM.00838-07
- Donati, I., y Paoletti, S. (2009). *Alginates: Biology and Applications*. (B. H. A. Rehm, Ed.) (Vol. 13). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-92679-5
- Foster C.F., (1985). *Biotechnology and wastewater treatment*. Cambridge University Press. Cambridge. P. 68-69.
- Flemming, H. (2007). *Biofilm Analysis Many Questions in Biofilm Analysis* (p. 44).

- Garip, S. (2005). *The characterization of bacteria with Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*. Middle East Technical University.
- Glazer A.N, H. N. (2007). *Microbial biotechnology. Fundamentals of applied microbiology* (First.). New York, United States: Cambridge University Press.
- Guo, Y., Sagaram, U. S., Kim, J., y Wang, N. (2010). *Requirement of the galU gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth in planta of Xanthomonas citri subsp. citri*. Applied and Environmental Microbiology, 76(7), 2234–42. doi:10.1128/AEM.02897-09
- Humbert, F., y Quilès, F. (2011). *In-situ study of early stages of biofilm formation under different environmental stresses by ATR-FTIR spectroscopy*. Microbiology Book Series, 889–895. Retrieved from <http://www.formatex.info/microbiology3/book/889-895.pdf>
- J. Wingender, T.R. Neu, H. C. F. (1999). *Microbial Extracellular Polymeric substances. Characterization, structure and function* (p. 258).
- Jiménez, 2010. (2010). *Modelación matemática del proceso de nitrificación en dos etapas. Desarrollo de metodologías de calibración del modelo para un reactor SHARON y un proceso de fangos activados*. Universidad Politécnica de Valencia Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente.
- Kalpakjian Serope, Schmid Steven. (2002). *Manufactura, ingeniería y tecnología*. Curata Edición.. Prentice Hall. Pearson educación México. P. 179-183.
- Kenyon, W. J., Esch, S. W., y Buller, C. S. (2005). *The curdlan-type exopolysaccharide produced by Cellulomonas flavigena KU forms part of an extracellular glycocalyx involved in cellulose degradation*. Antonie van Leeuwenhoek, 87(2), 143–8. doi:10.1007/s10482-004-2346-4
- Latasa, C., Sonao, C., Penadés, J. R., Lasa, I. (2006). *Biofilm-associated proteins*. C.R.Biologies. 329, 849-857.
- Lembre, P., Lorentz, C., y Martino, P. Di. (2012). *Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World*. <http://dx.doi.org/10.5772/51213>
- Li, X., Li, Y., Liu, H., Hua, Z., Du, G., y Chen, J. (2007). *Characteristics of aerobic biogranules from membrane bioreactor system*. Journal of Membrane Science, 287(2), 294–299. doi:10.1016/j.memsci.2006.11.005

- Lyng Fiona, Ehsan Gazi, P. G. (2012). Preparation of tissues and cells for Infrared and Raman Spectroscopy and imaging. *RSC Analytical Spectroscopy Monographs*, 11(Biomedical applications of synchrotron Infrared Microspectroscopy), 145–189. doi:10.1515/9783110276138.7
- Lucena, F., Lasobras, J., Mcintosh, D., Forcadell, M., y Jofre, J. (1994). *Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of Bacteroides fragilis phages and coliphages in mussels . Effect of Distance from the Polluting Focus on Relative Concentrations of Bacteroides fragilis Phages and Coliphages in Musse*. Applied and Enviromental Microbiology 60(7):2272.
- Mendoza-Hernández, J. C., Cedillo-ramírez, M. L., y Silva-andrade, A. M. F. (2008). *Efecto de las condiciones ambientales en la formación in vitro de biopelículas de Klebsiella pneumoniae*. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. 4(1), 3–16.
- Menzella, H. (2014). Procesos Biotecnológicos II *Crecimiento microbiano Representación aritmética y exponencial del crecimiento Factores que afectan a la rapidez de crecimiento*, 1–19.
- Miura, Y., Watanabe, Y., y Okabe, S. (2007). *Membrane biofouling in pilot-scale membrane bioreactors (MBRs) treating municipal wastewater: impact of biofilm formation*. Environmental Science & Technology, 41(2), 632–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310733>
- Naumann, D. (2000). *Infrared Spectroscopy in Microbiology*, Encyclopedia of Analytical Chemistry R.A. Meyers (Ed.) © John Wiley& Sons Ltd, Chichester.102–131.
- Negrón, D. (2009). I Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana.
- Nivens, D. E., Schmit, J., Sniatecki, J., Anderson, T., Chambers, J. Q., y White, D. C. (1993). *Multichannel ATR/FT-IR Spectrometer for On-Line Examination of Microbial Biofilms*. Applied Spectroscopy, 47(5), 668–671. doi:10.1366/0003702934067171.
- NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de la demanda Bioquímica de Oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO5) y residuales tratadas - método de prueba.
- NMX-AA-030-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de la demanda Química de Oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO5) y residuales tratadas - método de prueba

- NMX-AA-034-SCFI-2001. Análisis de agua - Determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales (DBO5) y residuales tratadas - método de prueba.
- Noyola Adalberto, Morgan-Sagastume J.M., Güereca Leonor P. (2013). Selección de tecnologías para el tratamiento de aguas residuales municipales. Guía de apoyo para ciudades pequeñas y medianas. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ingeniería. Ciudad Universitaria, México D.F.
- Orozco C. 1999. (1999). *Análisis de algunas características físicas y químicas de un biopolímero producido por Klebsiella pneumoniae en un proceso de fermentación simple*. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Ingeniería cerámica. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- P.A.J.Groin, J. F. T. S. (1965). *Exocellular alginic acid from azotobacter vinelandii* 1', 4(National Research Council of Canadá, Prairie Regional Laboratory, Saskatoon), 1–6.
- Parikh, S. J., y Chorover, J. (2005). *FTIR Spectroscopic Study of Biogenic Mn-Oxide Formation by Pseudomonas putida GB-1*. Geomicrobiology Journal, 22(5), 207–218. doi:10.1080/01490450590947724
- Rivera-chavira, B. E., Cuevas-rodríguez, G., De, G. V. N. F. (2005). *Formación de biopelículas sobre membranas utilizadas en el tratamiento de aguas residuales* Químicas, C., Autónoma, U., Apdo, D. C., Guanajuato, U. De., (Universidad Autónoma de hihuahua), 2005.
- Romero A. M., Colín C.A., Sánchez S. E., O. H. L. 2009. *Tratamiento de aguas residuales por un sistema piloto de humedales artificiales: Evaluación de la remoción de la Carga orgánica*. Rev.Int. de Contaminación Ambiental. (Recibido septiembre 2007, aceptado enero 2009), 25(3), 157–167.
- Ruffing, A. M., y Chen, R. R. (2012). *Transcriptome profiling of a curdland-producing Agrobacterium reveals conserved regulatory mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis*. Microbial Cell Factories, 11, 17. doi:10.1186/1475-2859-11-17
- Sabra, W., Zeng, a.-P., y Deckwer, W.-D. (2001). *Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects*. Applied Microbiology and Biotechnology, 56(3-4), 315–325. doi:10.1007/s002530100699
- Salvador, Q. I. S., Delgadillo, F., & Silva, J. M. (2004). *Acumulación "in vitro" de exopolisacáridos por una cepa nativa de Enterobacter Cloacae*. Efecto

de factores ambientales y nutricionales. tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Serrano, M. (2004). *Métodos de análisis químico tema: el espectro electromagnético. absorción visible-ultravioleta*. Posgrado en Ingeniería del agua y del terreno. Instrumentación y métodos de análisis químicos.
- Serrano Martínez, J. L. (2009a). *Espectroscopía infrarroja I-Fundamentos*. Posgrado en ingeniería del agua y del terreno. Métodos de análisis químico.
- Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy. Fundamentals and applications*. Ed. Wiley. Pp: 221
- Szymanska-Chargot, M., y Zdunek, A. (2013). *Use of FT-IR Spectra and PCA to the Bulk Characterization of Cell Wall Residues of Fruits and Vegetables Along a Fraction Process*. Food Biophysics, 8(1), 29–42. doi:10.1007/s11483-012-9279-7
- Verhoef, R., Waard, P. De, Schols, H. a., Siika-aho, M., y Voragen, A. G. J. (2003). *Methylobacterium sp. isolated from a Finnish paper machine produces highly pyruvated galactan exopolysaccharide*. Carbohydrate Research, 338(18), 1851–1859. doi:10.1016/S0008-6215(03)00261-1
- Wenning Mareike, Siegfried Scherer. (2013). *Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method*. Applied microbiology and biotechnology (Vol. 97, pp. 7111–20). doi:10.1007/s00253-013-5087-3.
- Wozniak D J, Wyckoff T J O, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O’Toole G A and Parsek M R. (2013). *Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100 (13): 7907-7912.
- Wills Amparo B, Vélez Santiago, Arboleda Andrés F.; Garcés Juan Pablo. (2010). Propuesta metodológica para la evaluación de sistemas de tratamiento de aguas residuales domesticas en el sitio de origen. Escuela de Ingeniería Antioquia. Revista EIA ISSN 1794-1237. Número 13 p. 93-105. Medellín, Colombia.
- Yu, C., y Irudayaraj, J. (2005). Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biopolymers*, 77(6), 368–77. doi:10.1002/bip.20247

Zhou, L., Zhang, Z., Xia, S., Jiang, W., Ye, B., Xu, X., Zhao, J. (2014). *Effects of suspended titanium dioxide nanoparticles on cake layer formation in submerged membrane bioreactor*. *Bioresource Technology*, 152, 101–6. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.006

5. ANEXOS.

Capítulo 1.

Anexo 1.1. Parámetros de medición en aguas residuales.

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO).

La solubilidad del Oxígeno en el agua se encuentra determinada por diversos factores. A nivel del mar (760 mm Hg) la máxima solubilidad del agua destilada es de 8.84 ppm a 20°C (100% de saturación) en equilibrio con el aire húmedo.

El método se basa en medir la cantidad de oxígeno que requieren los microorganismos para efectuar la oxidación de la materia orgánica presente en aguas naturales y residuales. La D.B.O puede ser evaluada midiendo la diferencia en el contenido de Oxígeno disuelto de una muestra de agua al comienzo y al final de la incubación de ésta en un periodo de 5 días a 20°C (NMX-AA-028-SCFI-2001).

Demanda química de oxígeno (DQO).

La demanda Química de Oxígeno es definida como la cantidad de materia orgánica e inorgánica en un cuerpo de agua susceptible a ser oxidada por un oxidante fuerte, o en laboratorio, por un oxidante específico que reacciona con la muestra bajo condiciones controladas. La cantidad de oxidante consumido es expresado en términos de equivalencia de oxígeno (NMX-AA-030-SCFI-2001). Se basa en la oxidación de oxígeno utilizando dicromato de potasio como oxidante fuerte en un medio ácido producido por sulfato de plata. La reacción se lleva a cabo a 148°C durante dos horas y el dicromato de potasio que no reacciona es determinado por espectrofotometría a 600nm (American Public Health Association, 2013).

Determinación de sólidos suspendidos.

Las aguas naturales o residuales con altos contenidos de sólidos suspendidos o sales disueltas no pueden ser utilizadas en forma directa por las industrias o por las plantas potabilizadoras (NMX-AA-034-SCFI-2001)

Sólidos suspendidos totales (SST): Sólidos constituidos por sólidos sedimentables, sólidos y materia orgánica en suspensión y/o coloidal, que son retenidas en el elemento filtrante.

Sólidos totales (ST): Suma de los sólidos suspendidos totales, sales disueltas y materia orgánica

Sólidos totales volátiles (SVT): Cantidad de materia orgánica (incluidos aquellos inorgánicos) capaz de volatilizarse por el efecto de la calcinación a $550^{\circ}\text{C} \pm 50^{\circ}\text{C}$ en un tiempo de 15 min a 20 min.

El fundamento de la determinación de sólidos consiste en que los sólidos suspendidos totales o el residuo no filtrable de una muestra de agua natural o residual pase a través de un filtro estándar de fibra de vidrio, previamente pesado, este residuo es secado a $103\text{-}105^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante. El incremento de peso del filtro representa el total de sólidos suspendidos.

Si el material suspendido taponar el filtro y prolonga la filtración, la diferencia entre los sólidos totales y los sólidos disueltos totales puede dar un estimativo de los sólidos suspendidos totales.

Este método es aplicable a aguas potables, superficiales, y salinas, aguas residuales domésticas e industriales y lluvia ácida, en un intervalo de 4 a 20 mg/l (NMX-AA-034-SCFI-2001).

Determinación de ortofosfatos.

Los microorganismos pueden asimilar de manera sencilla la forma de ortofosfato del fósforo, por lo que es un parámetro de control en los procesos biológicos de eliminación de fósforo.

A partir de un reactivo de vanadato-molibdato se hace reaccionar la solución diluida de ortofosfato en condiciones ácidas para formar un heteropoliácido (ácido molibdofosfórico); mientras que en presencia de vanadio se forma ácido vanadomolibdofosfórico, el cual es de color amarillo. La determinación se lleva a cabo por espectrofotometría a 470nm (American Public Health Association, 2013).

Nitrógeno.

El nitrógeno se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y forma parte de aguas residuales; en organismos fotosintéticos es un compuesto importante; pero también representa una fracción del peso de proteínas, por lo cual se puede hacer una determinación del crecimiento de biomasa en un sistema por medio de un factor de conversión (American Public Health Association, 2013).

El nitrógeno Kjeldahl representa la suma del nitrógeno orgánico y amoniacal. Ambas formas del nitrógeno pueden ser determinadas por medio de una destilación y titulación con ácido sulfúrico 0.02N, en donde la cantidad de nitrógeno orgánico se obtiene por una digestión previa con ácido sulfúrico y una sal de sulfato de cobre.

Anexo 1.2. Comparación de técnicas para caracterizar compuestos de *biofilms* microbianos (Glazer A.N, 2007; Guo, Sagaram, Kim, y Wang, 2010, Fleming, 2007).

Técnica	Ventajas	Desventajas
Técnicas colorimétricas: (naranja de acridina, DAPI)	-Son técnicas que sirven para la cuantificación por métodos de número máximo. Identificación de ácidos nucleicos	-No identifican entre compuestos de células vivas o muertas.
Cultivos enriquecidos y puros	Permiten el aislamiento de algunas cepas que crecen en <i>biofilms</i> microbianos y el estudio de sustancias producidas por grupos específicos permitiendo hacer análisis de algunas especies formadoras de <i>biofilms</i> .	No reflejan la diversidad microbiológica real presente en <i>biofilms</i> , ya que solo una mínima fracción de los organismos es cultivable, el resto sufre lisis al salir de su nicho.
Potencial redox	Permite evaluar la presencia de biomasa a lo largo del tiempo por degradación de sustrato. Da una aproximación del tipo de metabolismo celular por el grado de reducción en un tiempo determinado.	Es una técnica indirecta para la estimación de crecimiento de biomasa, pero no permite conocer de manera detallada los grupos de organismos y compuestos presentes en un <i>biofilm</i> microbiano.
Turbiedad.	Es una medida indirecta de la actividad de microorganismos.	Son mediciones indirectas, y solo una fracción es materia orgánica en forma de sólidos disueltos.
Pruebas bioquímicas.	Sirven en la identificación de grupos de compuestos (azúcares, proteínas, entre otros); o ensayos inmunológicos en la	No son muy específicos y solo nos dan información de una pequeña parte de los

	determinación de la presencia de un compuesto e particular.	compuestos presentes en <i>biofilms</i> microbianos.
Técnicas moleculares (PCR, secuenciación, genotipificación)	<p>Sirven en la identificación de especies presentes en <i>biofilms</i> microbianos.</p> <p>Permiten hacer análisis a varios niveles (desde identificación de grupos hasta especie e identificación de proteínas y metabolitos específicos, así como identificación de genes asociados a la producción de ciertos compuestos).</p>	<p>Son ensayos exactos, pero su costo es muy elevado de acuerdo al tipo de estudio que se desee realizar.</p> <p>Actualmente la metagenómica permite hacer la identificación de grupos de organismos por sus características metabólicas asociadas a su genoma, sin embargo son análisis exhaustivos y muy costosos. Requieren mucho tiempo.</p>
Espectroscopia FT-IR	<p>Permite la identificación de grupos funcionales formadores de estructuras en <i>biofilms</i>.</p> <p>Actualmente se cuenta con bases de datos de compuestos puros. Es una herramienta muy utilizada en la industria y en el ramo de farmacología.</p> <p>Se ha introducido su uso en el análisis de la degradación de compuestos por la evolución de picos en los espectros.</p> <p>Dispositivos como el de reflectancia totalmente atenuada (ATR) permite la evaluación de muestras sin ninguna preparación con excepción de aquellas que cuenten con un grado alto de humedad.</p> <p>Es una técnica muy rápida y de bajo costo.</p>	<p>Es una técnica no muy utilizada en mezclas complejas.</p> <p>La presencia de agua en las muestras enmascara picos de otros compuestos.</p> <p>Se requiere tener control de la humedad y temperatura ya que esta técnica es muy sensible. En el caso de las muestras analizadas por transmitancia, se requiere la preparación de las muestras mediante su cristalización con algunas sales como son bromuro de potasio o su dilución en formol.</p> <p>No se considera una técnica robusta ya que actualmente se cuentan con técnicas que permiten identificar compuestos de manera más exacta por sus características químicas como pka y peso molecular tales como la cromatografía líquida y la espectrometría de masas.</p>

Capítulo 2.

2.1. Polietileno de baja densidad como material de empaque.

Consiste en pequeñas piezas poliméricas de baja densidad con forma de barril cóncavo; de diámetro menor a 5 mm, y altura promedio de 4 mm. El etileno es producto de la reacción entre hidrógeno y acetileno; que a su vez es producto de la reacción entre el coque y el metano (Kalpakjian y Schmid, 2002).

El polietileno de baja densidad es un material liso, por lo cual puede ser una buena opción para la filtración de agua residual en etapas de tratamiento secundario o terciario si se desea obtener la eliminación de nutrientes (Biostyr corporation).

2.2. Caracterización del material de empaque.

El área superficial de los pellets de polietileno se relaciona con el caudal. Para determinar el área superficial de las unidades de empaque, se calculó el área de 24 pellets tomados al azar de su contenedor.

Para medir el área superficial de los pellets se procedió de la siguiente manera:

- Cada unidad se consideró como un elipsoide por la diferencia en los radios a lo largo y ancho de las bases, así como de la altura del material del empaque (Figura 5.1).
- Se midió con un vernier el radio de la base a lo largo y ancho y se consideró el primero de éstos igual al radio de la altura del pellet.

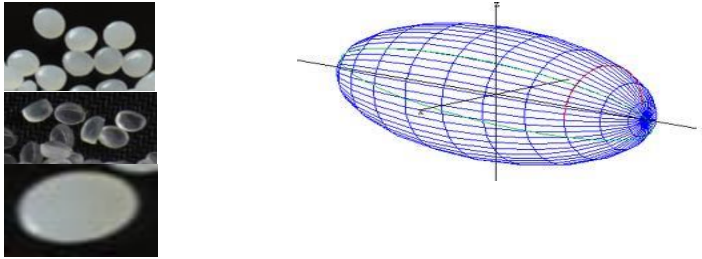


Figura A.1. Imágenes de piezas con microscopio estereoscópico y representación geométrica de una unidad de polietileno de baja densidad.

Para calcular el área superficial de un elipsoide se pueden considerar solo dos radios asumiendo que uno tercero es igual a la longitud del elipsoide, es decir, rotando alrededor del eje horizontal la parte superior de la elipse $x^2/a^2 + y^2/b^2 = 1$.

Se calculó el área superficial para los 24 pellets de la siguiente manera:

$$A_{\text{superficial}} = 2\pi b \frac{\left[a^2 \operatorname{Arctg} \left(\frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{b} \right) + b\sqrt{a^2 - b^2} \right]}{\sqrt{a^2 - b^2}}; a > b \quad (\text{A.1})$$

$$= 2\pi(1.945) \frac{\left[(2.294)^2 \operatorname{Arctg} \left(\frac{\sqrt{2.294^2 - 1.945^2}}{1.945} \right) + 1.945\sqrt{2.294^2 - 1.945^2} \right]}{\sqrt{2.294^2 - 1.945^2}} = 66.83 \text{mm}^2 \quad (\text{A.2})$$

A partir de los radios promedios a lo largo y ancho del elipsoide se calculó el área superficial considerando $a=2.294\text{mm}$ y $b=1.945\text{mm}$ (véase tabla A.1).

El área superficial del material de empaque nos permite calcular el área expuesta de material como filtro. De esta manera se puede saber la superficie de reacción en el sistema.

Se realizó la determinación del volumen que ocupa cada unidad de empaque utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. elipsoide} = \frac{4}{3} \pi ab^2 \quad (\text{A.3})$$

$$Vol_{elipsoide} = \frac{4}{3}\pi(2.294)(1.945)^2 = 36.35mm^3 \quad (A.4)$$

Para determinar el peso promedio de los pellets de polietileno de baja densidad, se secaron en la estufa a 60°C durante 30 minutos hasta tenerlos a peso constante (tabla 5.2). Este es un método paralelo para determinar la cantidad de pellets que puede haber en un volumen determinado. El peso de las unidades de empaque también nos permite determinar la densidad del material más espacios de vacíos en seco.



N° de pellet	Peso (mg)	N° de pellet	Peso (mg)	N° de pellet	Peso (mg)
1	37.2	11	44.4	21	31.8
2	43.7	12	36.1	22	34.2
3	36.4	13	44.1	23	33.4
4	41.5	14	37.6	24	38.8
5	31.8	15	37.8	25	38.7
6	35.3	16	38.9	26	37.5
7	37.4	17	35.6	27	38.2
8	35.2	18	32	28	29.7
9	37.6	19	35.5	29	38.5
10	36.1	20	40	30	35.7
Promedio	37.0				
Desv.estándar	3.5				

Tabla A.2. Peso promedio de pellets de polietileno de baja densidad

En promedio cada unidad de polietileno de baja densidad pesa 37.023 mg. La densidad reportada para el polietileno de baja densidad va de los 0.92 a los 0.98 g/cm³.

Tabla A.8. Área superficial calculada en unidades de polietileno de baja densidad.

$$A = 2\pi b \quad B = \left[a^2 \operatorname{arctg} \left(\frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{b} \right) + b\sqrt{a^2 - b^2} \right] \quad C = \frac{\left[a^2 \operatorname{arctg} \left(\frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{b} \right) + b\sqrt{a^2 - b^2} \right]}{\sqrt{a^2 - b^2}} \quad D = 2\pi b \frac{\left[a^2 \operatorname{Arctg} \left(\frac{\sqrt{a^2 - b^2}}{b} \right) + b\sqrt{a^2 - b^2} \right]}{\sqrt{a^2 - b^2}}; a > b$$

N° de pellet		r1 (mm)		r2 (mm)	A	B	C	D
1	4.9	2.45	3.65	1.825	11.466	7.914	4.841	55.518
2	4.7	2.35	3.95	1.975	12.409	6.982	5.482	68.034
3	4.75	2.375	4.15	2.075	13.037	7.019	6.075	79.204
4	4.65	2.325	3.85	1.925	12.095	6.847	5.251	63.522
5	4.15	2.075	3.8	1.9	11.938	4.787	5.739	68.520
6	4.65	2.325	3.9	1.95	12.252	6.813	5.381	65.933
7	4.55	2.275	3.9	1.95	12.2522	6.40347	5.4646	66.9537
8	4.65	2.325	3.6	1.8	11.3097	6.97294	4.7383	53.5891
9	4.55	2.275	3.85	1.925	12.0951	6.44563	5.3162	64.3010174
10	4.65	2.325	3.95	1.975	12.4092	6.77537	5.5228	68.5349
11	4.65	2.325	3.9	1.95	12.2522	6.81362	5.3813	65.9339
12	4.5	2.25	3.95	1.975	12.4092	6.14083	5.6970	70.6960
13	4.6	2.3	3.75	1.875	11.7809	6.71102	5.0380	59.3536
14	4.65	2.325	3.9	1.95	12.2522	6.81362	5.3813	65.9339
15	4.55	2.275	3.85	1.925	12.0951	6.44563	5.3162	64.3010
16	3.95	1.975	3.7	1.85	11.6238	4.00489	5.7918	67.3242
17	4.8	2.4	4	2	12.5663	7.36101	5.5485	69.7254
18	4.55	2.275	3.85	1.925	12.0951	6.44563	5.3162	64.3010
19	4.6	2.3	3.95	1.975	12.4092	6.56674	5.5710	69.1333
20	4.6	2.3	3.95	1.975	12.4092	6.56674	5.5710	69.1333
21	4.65	2.325	4	2	12.5663	6.73218	5.6783	71.3561
22	4.65	2.325	4	2	12.5663	6.73218	5.6783	71.3561
23	4.55	2.275	3.9	1.95	12.2522	6.40347	5.4646	66.9537
24	4.6	2.3	3.95	1.975	12.4092	6.5667	5.5710	69.1333
25	4.6	2.3	4	2	12.5663	6.51823	5.738	72.1182
PROM	4.588	2.294	3.89	1.945	12.2207	6.55136	5.462	66.8347
DES.V.E ST	0.185	0.092	0.120	0.060	0.37938	0.74651	0.292	5.24601
ERROR.E ST	0.037	0.018	0.024	0.012	0.07587	0.14930	0.058	1.04920

2.3. Configuración de reactores.

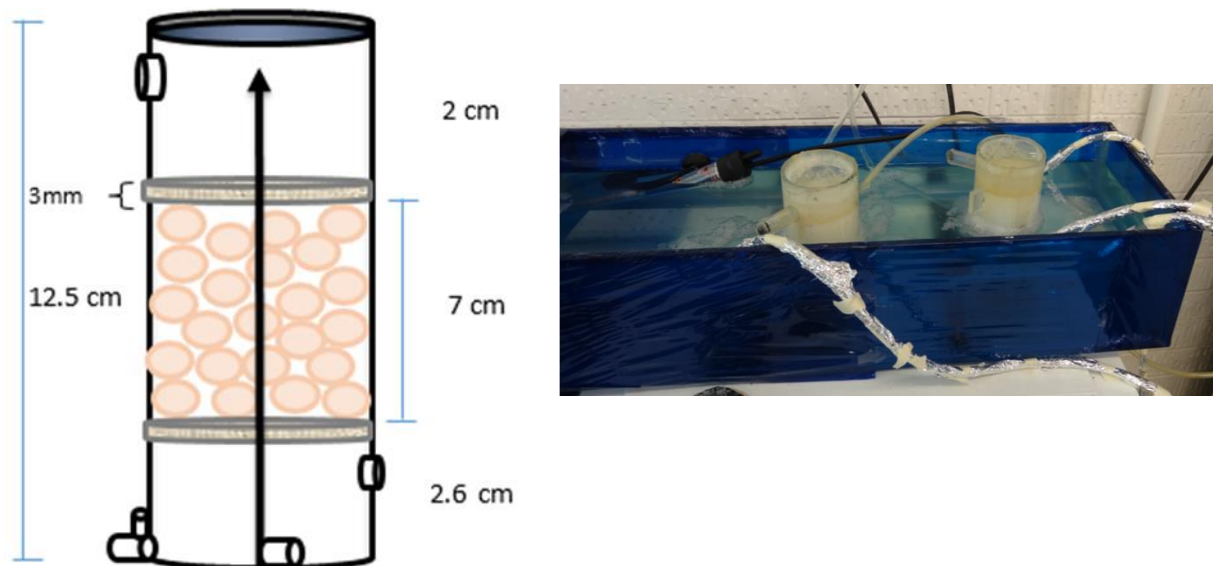


Figura A.2. Configuración y funcionamiento de reactores.

El volumen del sistema filtrante se calculó de la siguiente manera:

$$Vol.Filtro = \pi \times 2.85^2 \times 7cm = 178.62ml \quad (A.5)$$

2.4. Porosidad del medio filtrante

La porosidad se calculó con base en el sistema de filtrado por el acomodo de los pellets de polietileno en un volumen conocido, que es el volumen asignado al sistema de filtración por flujo ascendente (178.62 ml).

Para corroborar el volumen que ocupa un determinado peso en piedras de polietileno, se aforaron éstos en una probeta de 50 ml para después pesar todo. La medición se llevó a cabo por triplicado para calcular el número de pellets promedio de acuerdo al peso promedio de cada unidad de polietileno de baja densidad.

Un volumen de 50 ml es ocupado por 26.7 g de piezas de polietileno. Debido a que hay flotación en el lecho y las piezas tienden a ocupar la parte superior del sistema, se colmató el espacio de filtración registrando el peso total de pellets en el reactor; el cual fue de 102.5 g. Para determinar la densidad aparente del material en seco se utilizó la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{m_{pellets}}{vol_{pellets} + vacíos} = \frac{102.5g}{178.62ml} = 0.573g/ml \quad (A.6)$$

Se determina el volumen que ocupa cada unidad de empaque más su correspondiente espacio de vacíos en el reactor con la densidad aparente y el peso promedio de cada unidad:

$$Vol_{pellet} + vacíos = \frac{m_{pellet}}{\rho_{aparente}} = \frac{0.0370233g}{0.573} = 0.06461ml \quad (A.7)$$

Cada unidad de empaque más su espacio de vacíos ocupa un volumen de 0.06461 ml.

La porosidad se calcula utilizando el volumen que ocupan los pellets como elipsoides

$$\eta = 1 - fracciónsólida = 1 - \frac{36.35mm^3}{64.61mm^3} = 1 - (0.5626) = 0.4374 \quad (A.8)$$

Es decir que la porosidad para el sistema de filtrado en los reactores es de 43.74%. En un metro cúbico, 56.26% del volumen será ocupado por material de empaque. El número de pellets por metro cúbico considerando la fracción sólida del sistema es:

$$\frac{N^{\circ} pellets}{m^3} = \frac{0.5626m^3}{36.35 \times 10^{-9} m^3} = 1,547,730.39 pellets \quad (A.9)$$

Se puede calcular el área superficial específica multiplicando el área superficial por unidad de empaque por el número de pellets que hay en un metro cúbico:

$$\Sigma A_{sup.}/m^3 = \frac{N^{\circ} pellets}{m^3} \cdot \frac{A_{Superficial}}{1 pellet} \quad (A.10)$$

$$\Sigma A_{sup.} = \frac{154773039}{m^3} \cdot \frac{66.83 \times 10^{-6} m^2}{1 pellet} = 1034.3482 m^2 / m^3 \quad (A.11)$$

De manera paralela, por determinación del peso sabemos que 178.62 ml en volumen de material de empaque pesan 102.5 g, y que cada pellet pesa 0.037023 g. Podemos determinar el número de pellets de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} 1 pellet &\rightarrow 0.037023g \\ x &\leftarrow 102.5g \\ x &= 2768.55 pellets \end{aligned} \quad (A.12)$$

El volumen que ocupan los pellets para una porosidad de 43.74% en el filtro con un volumen de 178.62 ml es de:

$$Volumen = 178.62 ml \times (1 - 0.4374) = 100.4916 ml \quad (A.13)$$

2.5. Carga orgánica y caudal.

El caudal se despaja a partir de la siguiente ecuación:

$$C.O. = \frac{Q \cdot S_o}{A_{superficialde pellets}} = gDQO / m^2 \cdot d \quad (A.14)$$

$$Q = \frac{C.O. \cdot A_{Superficial.de.pellets}}{S_o} = m^3 / d \quad (A.15)$$

Teniendo un área aproximada de los pellets, se procedió a determinar el caudal:

$$\begin{aligned} A_{sup.específica} &= 1034.3482 m^2 \rightarrow 1 m^3 \\ x &\leftarrow 0.00017862 m^3 \\ x &= 0.187552 m^2 \end{aligned} \quad (A.16)$$

Se determinó el caudal requerido para un agua residual municipal, cuya DQO en promedio es de 450 g/m³:

$$Q = \frac{12gDQO/m^2 \cdot d \times 0.187552m^2}{450gDQO/m^3} = 5.001L/d \quad (A.17)$$

El tiempo de retención hidráulico (TRH) se define como el tiempo medio teórico que permanece un fluido dentro de un sistema. Basado en el caudal se puede determinar el TRH a partir del siguiente despeje:

$$Q = \frac{Vol.útil}{TRH} \quad (A.18)$$

$$TRH = \frac{Vol.útil}{Q} \quad (A.19)$$

El volumen útil es el volumen de agua que pasa a través del sistema hasta su efluente. Considerando que en el filtro con una porosidad del 43.47% hay un volumen de 77.64 ml en volumen de vacíos, de la base del reactor a la primer placa inferior hay 2.6 cm de altura, y de la placa superior al efluente hay 2 cm; los volúmenes en agua para estos son de 74.001 ml de capacidad en la parte inferior y 51.035 ml en la parte superior, lo cual en volumen útil total es 202.682 ml, lo cual es igual a 0.000202682 m³.

$$TRH = \frac{0.000202682 m^3}{0.005m^3/d} = 0.0440d \quad (A.20)$$

Equivalente a 1.056 horas.

2.6. Llenado del lecho filtrante.

El material de soporte fue tratado previo a su colocación en ambos reactores, sumergiendo las unidades de polietileno de baja densidad en una solución de H₂SO₄ al 1% por 12 horas. Este tratamiento se dio debido a que la naturaleza del material es liso y propicia el rápido desprendimiento de *biofilm*. Posteriormente el exceso de ácido fue lavado utilizando detergente concentrado libre de fosfatos y enjuagado con agua potable y agua destilada para ser finalmente secado en la estufa a 60°C por una hora hasta peso constante.

Las placas de acrílico que delimitaban el espacio de filtración en ambos reactores fueron fijadas al sistema por medio de silicón líquido, el cual se dejó secar por un lapso de dos horas antes de comenzar la operación de los reactores.

2.6. Crecimiento de biomasa en los reactores.

Como se menciona en el apartado 3.2. Durante el crecimiento de biomasa en ambos reactores hay un menor desprendimiento de sólidos suspendidos totales a lo largo del proceso de operación. Como se muestra en la siguiente figura, la biomasa creció adherida al medio de soporte.



Figura A.3. Medio de soporte colmatado de biomasa. Fotografía tomada durante proceso de mantenimiento semanal. Marzo, 2014.