



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

**Actividad metabólica bacteriana en un biorreactor con membranas sumergidas**

**Tesis**

**Que para obtener el título de Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental**

**Presenta:**

**Ingeniero Bioquímico Víctor Hugo Hipólito Zenteno**

**Asesor**

**Doctor en Ingeniería de Procesos Julio César Orantes Ávalos**

**Morelia Michoacán, Agosto 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por la beca proporcionada.

Al Dr. Julio César Orantes Avalos por el apoyo brindado, así como sus consejos, confianza y paciencia.

Al Dr. Gerardo Vázquez Marrufo, por conseguir que el desarrollo de la experimentación se llevara a cabo en las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina. Así como por sus comentarios, sugerencias y como parte del comité tutorial.

A la Dra. Yvonne Herrerías Diego por su compromiso con el trabajo mediante orientación y consejos, así como revisora del presente trabajo.

Al Dr. Javier Ponce Saavedra y al Dr. Raúl Cortez Martínez por la orientación consejos y aporte como revisores del presente trabajo.

Al laboratorio de Biología Acuática de la Facultad de Biología de la UMSNH.

Al laboratorio de Genética Microbiológica de la Facultad de Medicina de la UMSNH.

A mis compañeras Carmen y Diana por su amistad, compañía, apoyo y paciencia.

A mi familia, mi padre, mi madre y hermana, por su fe y apoyo incondicional

## Tabla de contenido

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabla de contenido .....</b>                                             | <b>1</b>  |
| <b>Índice de figuras .....</b>                                              | <b>4</b>  |
| <b>Índice de tablas .....</b>                                               | <b>7</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>                                                | <b>11</b> |
| <b>1.1 Hipótesis .....</b>                                                  | <b>13</b> |
| <b>1.2 Objetivos .....</b>                                                  | <b>14</b> |
| 1.2.1 Objetivo General .....                                                | 14        |
| 1.2.2 Objetivos específicos .....                                           | 14        |
| <b>1.3 Justificación.....</b>                                               | <b>15</b> |
| <b>2 MARCO TEÓRICO.....</b>                                                 | <b>16</b> |
| <b>2.1 Biorreactor con membranas sumergidas.....</b>                        | <b>16</b> |
| 2.1.1 Composición de la suspensión biológica .....                          | 24        |
| 2.1.2 Fracción biológica de la suspensión.....                              | 25        |
| <b>2.2 Comunidad Bacteriana.....</b>                                        | <b>26</b> |
| 2.2.1 Metabolismo bacteriano .....                                          | 28        |
| 2.2.2 Remoción de la DQO:.....                                              | 30        |
| 2.2.3 Asimilación y nitrificación del amonio: .....                         | 31        |
| 2.2.4 Análisis del potencial metabólico bacteriano.....                     | 32        |
| 2.2.5 Relación de los contaminantes con los compuestos de BIOLOG® Ecoplate™ | 34        |
| <b>3 ANTECEDENTES.....</b>                                                  | <b>36</b> |
| <b>4 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                          | <b>39</b> |
| <b>4.1 Diseño experimental .....</b>                                        | <b>39</b> |
| <b>4.2 Biorreactor con membranas sumergidas.....</b>                        | <b>39</b> |

|            |                                                                               |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.1      | Módulo de Membranas.....                                                      | 40        |
| 4.2.2      | Sustratos suministrados .....                                                 | 43        |
| 4.2.3      | Seguimiento de los parámetros experimentales.....                             | 44        |
| <b>4.3</b> | <b>Análisis metabólico bacteriano .....</b>                                   | <b>46</b> |
| 4.3.1      | Análisis del potencial degradativo global .....                               | 48        |
| 4.3.2      | Análisis del potencial gradativo por fuentes de carbono en la placa .....     | 49        |
| 4.3.3      | Relación de las variables operacionales con el potencial gradativo.....       | 50        |
| <b>4.4</b> | <b>Análisis estadísticos de los datos experimentales .....</b>                | <b>50</b> |
| 4.4.1      | Desempeño del BRM .....                                                       | 51        |
| 4.4.2      | Potencial degradativo .....                                                   | 51        |
| 4.4.3      | Fuentes de carbono utilizadas.....                                            | 52        |
| 4.4.4      | Relación de las variables operacionales con el potencial degradativo.....     | 52        |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>                                           | <b>53</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Biorreactor con membranas sumergidas.....</b>                              | <b>53</b> |
| 5.1.1      | Parámetros fisicoquímicos de control.....                                     | 53        |
| 5.1.2      | Evolución de la Biomasa .....                                                 | 54        |
| 5.1.3      | Eficiencia del Bioreactor .....                                               | 57        |
| <b>5.2</b> | <b>Análisis metabólico bacteriano .....</b>                                   | <b>60</b> |
| 5.2.1      | Potencial degradativo global.....                                             | 60        |
| 5.2.2      | Fuentes de carbono utilizadas.....                                            | 67        |
| 5.2.3      | Relación de las variables operativas del reactor con el potencial degradativo | 75        |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>                                    | <b>78</b> |
| <b>6.1</b> | <b>Validación de hipótesis .....</b>                                          | <b>78</b> |

|     |                                                                                                |     |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.2 | Conclusiones.....                                                                              | 78  |
| 6.3 | Recomendaciones generales.....                                                                 | 79  |
| 7   | REFERENCIAS .....                                                                              | 80  |
| 8   | ANEXOS: .....                                                                                  | 88  |
| A.  | Metabolismo bacteriano .....                                                                   | 88  |
| B.  | Estructuras químicas de las diferentes fuentes de carbono presentes en BIOLOG® Ecoplate™ ..... | 94  |
| C.  | Cinéticas AWCD vs tiempo de incubación.....                                                    | 101 |
| D.  | Aplicación del modelo logístico de crecimiento .....                                           | 102 |

## Índice de figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2.1: Diagrama simplificado de un biorreactor con membranas sumergidas (Mihelcic y Zimmerman, 2011). .....                                                                                                                                                 | 16 |
| Figura 2.2 Partículas retenidas por los distintos tipos de filtración y su tamaño de poro (Mihelcic y Zimmerman, 2011). .....                                                                                                                                    | 18 |
| Figura 2.3 Formas de ensuciamiento de la membrana (a) taponeamiento del poro. (b) estrechamiento del poro (c) Formación de la torta .....                                                                                                                        | 19 |
| Figura 2.4 Composición de la suspensión biológica (Orantes, 2005). .....                                                                                                                                                                                         | 24 |
| Figura 2.5 Niveles tróficos en un reactor biológico de biomasa en suspensión. (Mihelcic y Zimmerman, 2011) .....                                                                                                                                                 | 26 |
| Figura 2.6 Etapas del metabolismo (Tomado de Karp, 2011) .....                                                                                                                                                                                                   | 29 |
| Figura 2.7 Diagrama simplificado del metabolismo bacteriano (Metcalf y Eddy, 2003). .....                                                                                                                                                                        | 30 |
| Figura 4.1 Biorreactor experimental con membranas sumergidas (Negra, 2015) .....                                                                                                                                                                                 | 40 |
| Figura 4.2 Módulo de membranas en el BRM. ....                                                                                                                                                                                                                   | 41 |
| Figura 5.1 Análisis discriminante canónico. Las muestras se agrupan correctamente por condición experimental. ....                                                                                                                                               | 54 |
| Figura 5.2 Comportamiento de la biomasa a lo largo del tiempo de operación .....                                                                                                                                                                                 | 55 |
| Figura 5.3. Concentraciones de influente y efluente del BRM, así como porcentaje de remoción en cada condición experimental de la DQO. ....                                                                                                                      | 58 |
| Figura 5.4 Comportamiento del Nitrógeno a lo largo del proceso experimental, $N-NH_3$ in = nitrógeno amoniacal influente, $N-NH_3$ ef = nitrógeno amoniacal del permeado, $NT_{in}$ = nitrógeno total dl influente y $NT$ ef= nitrógeno total del permeado ..... | 59 |
| Figura 5.5 Remoción del nitrógeno total por asimilación .....                                                                                                                                                                                                    | 59 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 5.6 Ajuste de la Cinética AC 0.1 a al modelo de crecimiento logístico. Los cuadros azules indican los puntos experimentales y la línea roja el ajuste al modelo matemático .....                                                                                                                                                                                                         | 62  |
| Figura 5.7 Dendrograma para los datos de absorbancia utilizando el índice de similitud de Bray-Cuirtis, (AC: acetato en azul CO = 0.1 kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> , en verde CO = 0.3 kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ; GL: Glucosa, en rojo CO = 0.1 kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> y morado CO = 0.3 kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) ..... | 66  |
| Figura 5.8 PCA a la hora 40 de incubación de las placas (AC: acetato, en azul CO = 0.1 kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> , en verde CO = 0.3 kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ; GL: Glucosa, en rojo CO = 0.1 kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> y en morado CO = 0.3 kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) .....                                             | 68  |
| Figura 5.9 PCA a la hora 56 de incubación placas En azul las muestras de la comunidad alimentada con acetato CO = 0.1, Verde acetato CO = 0.3, rojo glucosa CO = 0.1 y morado glucosa CO = 0.3.....                                                                                                                                                                                             | 70  |
| Figura 5.10 PCA a la hora 120 de incubación En azul las muestras de la comunidad alimentada con ácido acetato CO = 0.1, Verde acetato CO = 0.3, rojo glucosa CO = 0.1 y morado glucosa CO = 0.3 .....                                                                                                                                                                                           | 72  |
| Figura 5.11 Mapa de calor para la degradación individual por pocillo de la BIOLOG® Ecoplate™ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 74  |
| Figura 5.12 Correlación canónica entre las variables de operación del BRM y los sustratos degradados ordenados por grupos.....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 76  |
| Figura A.1 fase 1 de la glucólisis: Fase de inversión de energía.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 89  |
| Figura A.2 Fase 2 de la glucólisis: Fase de rendimiento de energía .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 90  |
| Figura A.3 Ciclo del ácido cítrico .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 91  |
| Figura A.4 Participación de los diferentes aminoácidos en el ciclo del ácido cítrico                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 93  |
| Figura C.1 Cinéticas de degradación global (AWCD vs tiempo de incubación) mostradas por las comunidad bacteriana durante la fase experimental de alimentación con acetato.....                                                                                                                                                                                                                  | 101 |

|                                                                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura C.2 Cinéticas de degradación global (AWCD vs tiempo de incubación) mostradas por la comunidad bacteriana durante la fase experimental de alimentación con acetato.....                                                                                | 101 |
| Figura D.1 Ajustes al modelo logístico de las cinéticas AWCD vs tiempo de incubación, para la comunidad alimentada con acetato. Los cuadros azules nos muestran los puntos experimentales y la línea roja el ajuste hecho mediante el modelo matemático..... | 103 |
| Figura D.2 Ajustes al modelo logístico de las cinéticas AWCD vs tiempo de incubación, para comunidad bacteriana con glucosa. Los cuadros azules nos muestran los puntos experimentales y la línea roja el ajuste hecho mediante el modelo matemático.....    | 104 |

## Índice de tablas

|                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 2.1. Parámetros de operación del BRM modificado de Metcalf y Eddy (2013).                                                                                                                                                                                                               | 23 |
| Tabla 2.2 Principales componentes del agua residual representados por los grupos presentes en las BIOLOG® Ecoplates™ (los componentes fueron tomados de Delgadillo <i>et al.</i> , 2010 y CENTA, 2008).....                                                                                   | 35 |
| Tabla 4.1. Características del módulo de membranas empleado en el proceso experimental.....                                                                                                                                                                                                   | 41 |
| Tabla 4.2 Componentes de los efluentes sintéticos .....                                                                                                                                                                                                                                       | 43 |
| Tabla 4.3 Frecuencia de medición de variables en cada etapa de experimentación                                                                                                                                                                                                                | 44 |
| Tabla 4.4. Punto de muestreo para los parámetros de control.....                                                                                                                                                                                                                              | 46 |
| Tabla 4.5. Nomenclatura utilizada en el proceso experimental para diferencias las muestras de los tratamientos con los sustratos sintéticos utilizados y las cargas orgánicas de trabajo (CO) .....                                                                                           | 47 |
| Tabla 5.1. Comportamiento pH y temperatura (T) en cada una de las corridas experimentales (media $\pm$ desviación estándar). .....                                                                                                                                                            | 53 |
| Tabla 5.2 Tiempos de retención celular (TRC) y rendimiento observado ( $Y_{obs}$ ) durante el proceso experimental .....                                                                                                                                                                      | 56 |
| Tabla 5.3 Nomenclatura utilizada durante el proceso experimental. CO carga orgánica (0.1 y 0.3 kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> respectivamente); AC = acetato, GL= glucosa; a, b y c corresponden consecutivamente a las 3 semanas de trabajo en cada condición estabilizada. .... | 60 |
| Tabla 5.4 Análisis de varianza factorial para analizar los efectos de la CO, el tipo de sustrato y su interacción, con respecto al potencial degradativo global (AWCD) de la suspensión biológica. ....                                                                                       | 61 |
| Tabla 5.5 Constantes cinéticas. $K$ = Asíntota de la curva, $S$ = tiempo cunado y = 0.5 $K$ , $p$ = tasa de cambio en la porción exponencial de la curva y $R^2$ = coeficiente de correlación.....                                                                                            | 63 |

|                                                                                                                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 5.6 índice de Shannon (media $\pm$ desviación estándar, $n=3$ ) estimados con las placas incubadas con la biomasa del reactor de las diferentes condiciones experimentales ..... | 65  |
| Tabla 5.7 Resumen de los valores p resultado del ANOVA factorial.....                                                                                                                  | 75  |
| Tabla D.1 Parámetros cinéticos obtenidos mediante el ajuste al modelo logístico de crecimiento.....                                                                                    | 102 |

## Resumen

La estructura de la comunidad bacteriana en un biorreactor con membranas sumergidas (BRM), es altamente dependiente de las interacciones biológicas, las cuales pueden ser manipuladas indirectamente a través del control de ciertos parámetros fisicoquímicos y operativos clave. En el presente trabajo se planteó un diseño experimental con el objetivo principal de analizar la capacidad metabólica bacterianas de la suspensión biológica de un BRM escala laboratorio, mediante el uso de BIOLOG® Ecoplates™ al tratar dos efluentes a dos niveles de carga orgánica cada uno. El primer efluente sintético tuvo como fuente de carbono acetato y el segundo glucosa, los demás componentes fueron similares. En el biorreactor con membranas sumergidas se mantuvieron condiciones propicias para la degradación de materia orgánica y la nitrificación. El reactor mostró eficiencias superiores al 98 % de remoción de materia orgánica y 97 % de remoción de nitrógeno amoniacal en todas las condiciones experimentales propuestas. El análisis metabólico mediante las placas BIOLOG® Ecoplates™ mostró que el potencial degradativo global de una comunidad bacteriana es dependiente del efluente que trata el biorreactor. La carga orgánica juega un papel importante también, ya que propicia cambios en la comunidad bacteriana que desencadena diferencias en la degradación de los carbohidratos, polímeros y aminoácidos. Adicionalmente se detectó que el tiempo de retención celular es el factor que mayormente influye en la degradación de polímeros. Se concluyó que el comportamiento metabólico de la comunidad se ve afectado principalmente por la complejidad del efluente (referido a la diversidad de contaminantes presentes) que trata el biorreactor.

**Palabras Clave:** Biorreactor con membranas sumergidas, metabolismo bacteriano, tratamiento de agua residual, BIOLOG® Ecoplates™

## **Abstract**

The structure of the bacterial community, in a bioreactor with submerged membranes, is highly dependent on biological interactions, which can be manipulated indirectly through the control of certain key physicochemical and operational parameters. In the present work, an experimental design was proposed with the main objective of analyzing the bacterial metabolic capacity of the biological suspension of laboratory scale membrane bioreactor, through the use of BIOLOG® Ecoplates™, when treating two effluents at two levels of organic load each. The first synthetic effluent had as carbon source acetate and the second glucose, the other components were similar. In the bioreactor with membranes submerged laboratory scale conditions were maintained favorable for the degradation of organic matter and nitrification. The reactor showed efficiencies above 98% organic matter removal and 97% ammoniacal nitrogen removal in all proposed experimental conditions. Metabolic analysis using the BIOLOG® Ecoplates™ plates showed that the overall degradation potential of a bacterial community is dependent on the effluent treated by the bioreactor. the organic load plays an important role too. It promotes changes in the bacterial community that trigger differences in the degradation of carbohydrates, polymers and amino acids. Additionally it was detected that the cellular retention time is a factor that most influences the degradation of polymers. It was concluded that the metabolic behavior of the community is affected mainly by the complexity (referring to the diversity of contaminants present) of the effluent treated by the bioreactor.

**Key words:** Membrane biorreactor, bacterial metabolism, wastewater treatment, BIOLOG® Ecoplates™

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente es conocida la problemática hídrica en cuestión de contaminación de los cuerpos de agua y disponibilidad de la misma, por lo que es necesario, aplicar y mejorar las tecnologías existentes para el tratamiento de agua residual. El biorreactor con membranas sumergidas (BRM) es un proceso altamente eficiente y prometedor en el tratamiento de aguas residuales (Neoh *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2015). Los BRM muestran un buen desempeño en términos de alta eliminación de materia orgánica y una alternativa atractiva para la reutilización del agua (Quist-Jensen *et al.*, 2015; Hoinkis *et al.*, 2012; Miura *et al.*, 2007;). El BRM es un proceso de tratamiento biológico que utiliza un módulo de membranas de micro o ultra filtración para separar el agua tratada de la biomasa en suspensión. Los BRMs ofrecen varias ventajas; como el hecho de que son capaces de degradar diversos sustratos en tasas rápidas y estables debido a una mayor concentración de biomasa y que tienen tiempos de retención celular (TRC) mayores y relaciones alimento/microorganismo (F/M) menores. Otra ventaja es que no requieren un sedimentador secundario por lo cual ahorran espacio (Judd, 2008). La retención de la biomasa completamente en el reactor implica cambios en la estructura de la comunidad bacteriana ya que los microorganismos están expuestos a condiciones totalmente diferentes con respecto a otros tratamientos de biomasa en suspensión (Rosenberger *et al.*, 2002).

La suspensión biológica es un ecosistema artificial con una amplia diversidad de microorganismos (Zhang *et al.*, 2011). La biomasa en el reactor contiene varios grupos de microorganismos que coexisten para degradar los contaminantes. Las bacterias juegan el papel más importante en los procesos degradativos (Hashimoto *et al.*, 2014), por lo cual la caracterización metabólica se convierte en un importante parámetro de análisis. Weber y Lengge (2010) señalaron que el análisis metabólico puede proporcionar una medida sensible y ecológicamente relevante de la función de la comunidad microbiana y de las adaptaciones funcionales en el tiempo y el espacio. El análisis metabólico se lleva a cabo verificando el uso de diferentes fuentes de carbono. El espectro de las fuentes utilizadas se considera el perfil metabólico de la comunidad. Un método que se ha hecho popular para caracterizar y comparar la

diversidad funcional, el potencial funcional y la actividad metabólica de las comunidades microbianas heterotróficas es el uso de BIOLOG® EcoPlates™ (Button *et al.*, 2016). Estas placas permiten medir la actividad bacteriana derivada del consumo de las fuentes de carbono contenidas en los pozos de la misma. Se puede afirmar que dichas fuentes de carbono, se puede decir que son una representación relativamente amplia de los tipos de moléculas orgánicas que se encuentran en un complejo de aguas residuales (Button *et al.*, 2015), por lo cual que es factible utilizarlas como indicador del potencial de tratamiento de un agua residual por a comunidad bacteriana presente en un reactor.

Las condiciones de operación del reactor afectan la actividad y desempeño de los microorganismos de la suspensión biológica (Gómez-Silván *et al.*, 2014; Hashimoto *et al.*, 2014). Mantener una estructura comunitaria microbiológica racionalmente ensamblada (tanto en términos de diversidad como de abundancia) es fundamental para mantener un desempeño satisfactorio y estable a largo plazo (Ju y Zhang, 2015). La estructura comunitaria es altamente dependiente de las interacciones biológicas, que pueden ser manipuladas indirectamente a través del control de ciertos parámetros operativos clave (*e.g.* Cargas orgánicas y TRC) y los parámetros fisicoquímicos (Ju y Zhang, 2015). Se ha reportado que el metabolismo bacteriano es afectado por la relación carga orgánica e influencia cambios en el comportamiento reproductivo (Jegantheesan *et al.*, 2009; Rosenberger *et al.*, 2002). La manipulación microbiana hacia un mejor desempeño del proceso debe establecerse mediante la adquisición de conocimientos fundamentales sobre las complejas interacciones entre las comunidades microbianas (Ju y Zhang, 2015) por lo cual se diseñó un experimento para analizar el efecto de la composición del efluente a tratar y la carga orgánica de operación del BRM sobre el potencial de tratamiento de la comunidad bacteriana. Se trabajó en un reactor escala laboratorio con condiciones controladas.

## **1.1 Hipótesis**

El potencial degradativo de la comunidad bacteriana de un BRM, alimentado con dos efluentes completamente solubles y fácilmente biodegradables aumentará al incrementar la carga orgánica de operación, independientemente de la composición del efluente a tratar.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Evaluar el impacto de la variación en la carga orgánica de operación de un BRM, sobre el potencial degradativo de la comunidad bacteriana, en el tratamiento de dos efluentes de agua residual sintética.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- a) Evaluar la eficiencia del biorreactor con membranas sumergidas en términos de la materia orgánica y el nitrógeno amoniacal removidos, tratando dos efluentes de agua residual sintética con distinta fuente de carbono, a dos cargas orgánicas distintas cada uno.
- b) Evaluar la producción de biomasa en el biorreactor con membranas sumergidas tratando dos efluentes de agua residual sintética, con distinta fuente de carbono, a dos cargas orgánicas distintas cada uno.
- c) Analizar el potencial degradativo bacteriano sobre diferentes grupos químicos
- d) Relacionar las variables operativas del reactor con el potencial degradativo de la comunidad bacteriana.
- e) Comparar el potencial degradativo del biorreactor tratando dos efluentes sintéticos, a dos cargas orgánicas distintas cada uno

### **1.3 Justificación**

Lograr avances en las tecnologías que permitan tratar el agua residual, para su reutilización o descarga en cuerpos de agua es de suma importancia, particularmente en comunidades con poca disponibilidad hídrica y un alto impacto sobre los cuerpos de agua naturales. El uso del BRM es una tecnología probada que ofrece una buena tasa de remoción de materia orgánica y nitrógeno, así como un efluente libre de sólidos suspendidos y buena calidad sanitaria. En los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales, las bacterias son las principales degradadoras de los contaminantes, por lo cual su caracterización metabólica se convierte en un importante parámetro de análisis. Con una mayor comprensión de su potencial metabólico, se pretende dar un paso hacia una manipulación microbiana que permita mayor eficiencia del proceso, lo cual debe establecerse mediante la adquisición de conocimientos fundamentales sobre las complejas comunidades microbianas. Estos conocimientos también permitirían diseñar y operar los BRM de tal modo que se encuentren con una capacidad de degradación acorde con las necesidades del efluente a tratar. El análisis metabólico ofrece varias ventajas, permite un ahorro en tiempo y dinero respecto a los análisis moleculares actuales.

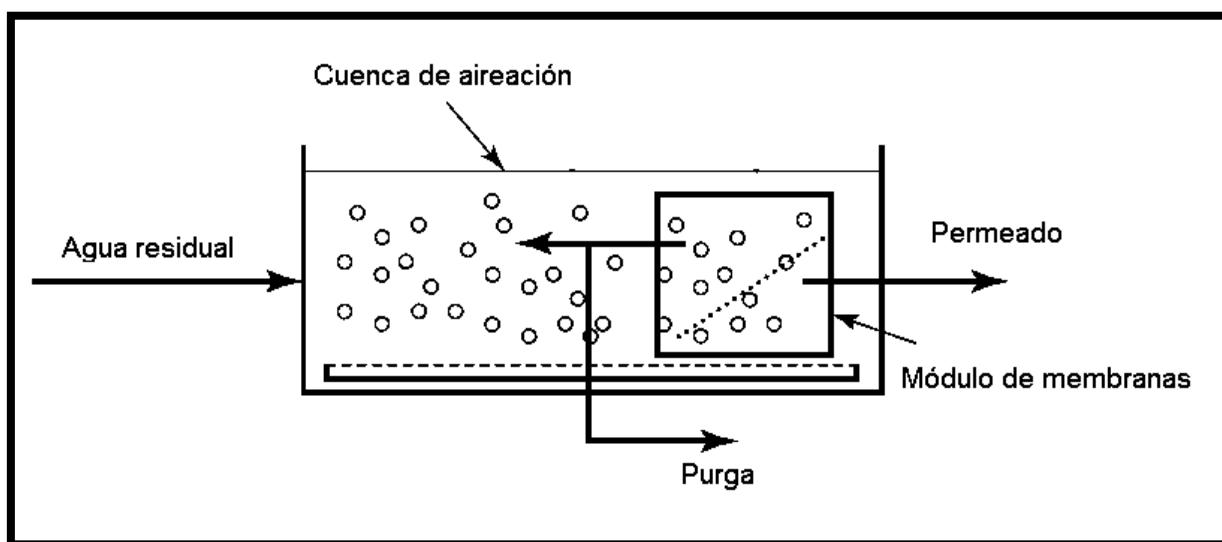
Este estudio resulta benéfico para la sociedad en general ya que permite obtener una mayor calidad del agua tratada que podría ser reusada, mejorando la disponibilidad del líquido. La descarga del agua tratada contribuye a la preservación del medioambiente. Por otra parte, a las personas que trabajan directamente con el tratamiento de agua les proporciona herramientas que permiten ahorrar tiempo y dinero mediante el ajuste de las condiciones operacionales hacia un proceso más eficiente y mejores diseños del reactor.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Biorreactor con membranas sumergidas

- **Fundamento**

Un biorreactor con membranas sumergidas consiste en un reactor biológico con biomasa en suspensión y separación de sólidos mediante una membrana de micro o ultra filtración (Figura 2.1). El agua que llega al proceso (influyente a tratar) se mezcla con la biomasa en el reactor, donde ocurre la degradación aerobia de la materia orgánica. Las membranas separan la biomasa del agua tratada mediante la aplicación de presión negativa, para succionar el agua tratada. La totalidad de la biomasa es contenida dentro del sistema otorgando un efluente de buena calidad, libre de sólidos suspendidos (Haandel y Lubbe, 2012; Metcalf y Eddy, 2003). El exceso de lodo es retirado mediante una purga, con el fin de controlar la concentración de biomasa (expresada como SSV), esto deriva en tiempos de retención celular distintos (Judd, 2008).



**Figura 2.1:** Diagrama simplificado de un biorreactor con membranas sumergidas (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

El proceso requiere del suministro de oxígeno para la oxidación de la materia orgánica por acción de las bacterias heterótrofas. Los valores típicos de oxígeno disuelto (OD) en un BRM se muestran en la Tabla 2.1. El oxígeno es suministrado mediante difusores de burbuja fina, este proceso es el que consume la mayor parte de la energía del tratamiento. El sistema de aireación es aprovechado para reducir ensuciamiento sobre las membranas por la acción mecánica de las burbujas. Las burbujas pequeñas controlan mejor el ensuciamiento de la membranas (Jegantheesan *et al.*, 2009). Es necesario mantener un programa de limpieza para evitar la colmatación, es decir el taponamiento de los poros de la membrana debido a la adición del material presente en la biomasa. Generalmente las membranas se limpian a contracorriente y en algunas ocasiones mediante lavado químico o ambos (Mihelcic y Zimmerman, 2011; Metcalf y Eddy, 2003) .

- **Módulo de membranas**

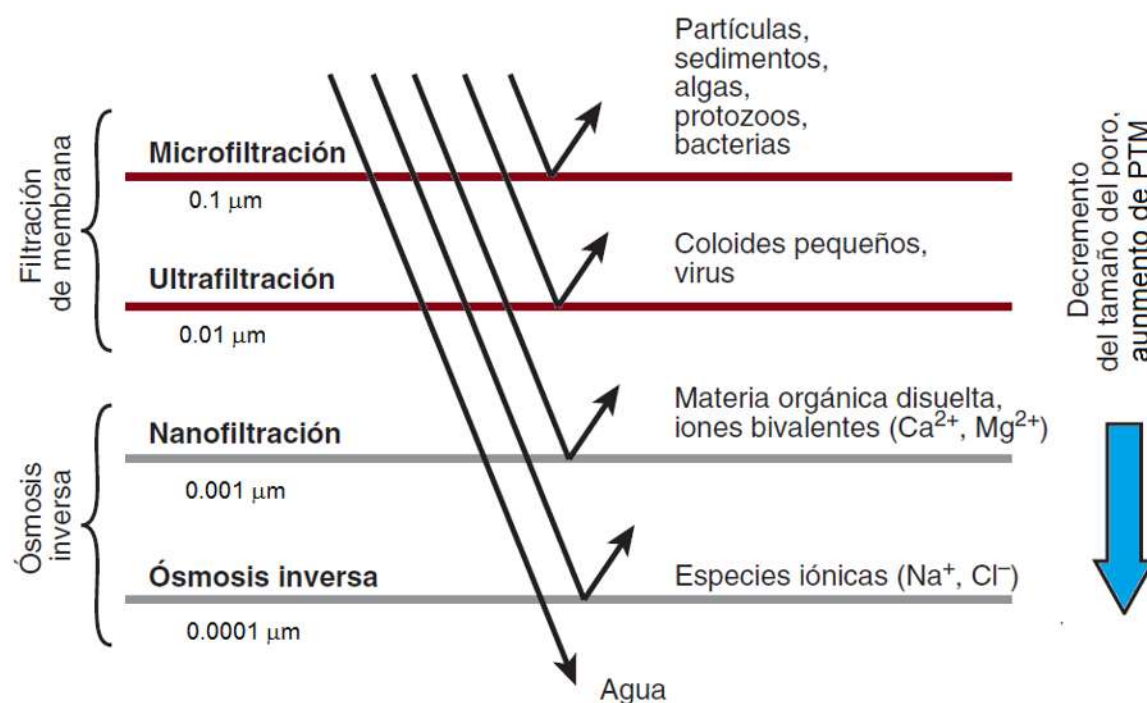
Las membranas son generalmente láminas delgadas soportadas por un material poroso más grande. Los polímeros mayormente utilizados para fabricar membranas son: difluoruro de polivinilideno (PVDF), polietilsulfona (PES), polietileno (PE), polipropileno (PP) (Judd, 2008).

El término módulo es utilizado para referirse al soporte donde se encuentran las membranas, de tal forma que es la estructura de soporte de las membranas y la salida del permeado. Los principales módulos utilizados para el tratamiento de agua son tubular, fibra hueca, enrollado en espiral y los de placas y marcos.

- **Filtración y selectividad de la membrana**

Las membranas de microfiltración o ultra filtración están en el rango de 0.01 a 0.4  $\mu\text{m}$  (Haandel y Lubbe, 2012; Metcalf y Eddy, 2003). En su rango más bajo de tamaño de poro la membrana del BRM retiene material coloidal, bacterias libres, sólidos suspendidos y algunos virus (Figura 2.2). La fuerza impulsora a través de la membrana es alcanzada creando vacío (menos de 50 kpa) en el lado de permeado

de la membrana (Metcalf y Eddy, 2003). La presión requerida para mantener el flujo a través de la membrana se llama presión transmembranal (PTM). El flujo transmembranal ( $J$ ) es el volumen que fluye a través del área de la membrana, se expresa en  $L \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$  (Judd, 2008).

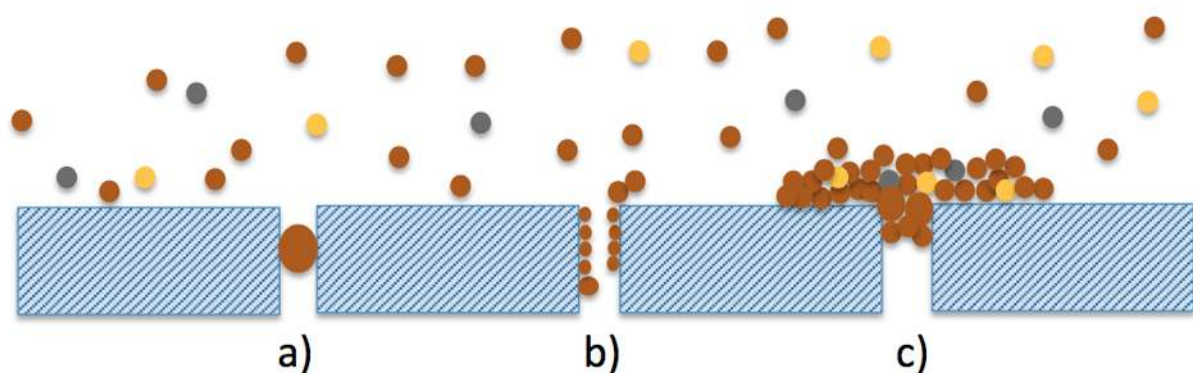


**Figura 2.2** Partículas retenidas por los distintos tipos de filtración y su tamaño de poro (Mihelcic y Zimmerman, 2011).

- **Ensuciamiento y limpieza de la membrana**

Una de las marcadas desventajas en los BRM es el ensuciamiento de la membrana. Durante el tratamiento la retención de partículas puede llegar a colmatar las membranas, y es necesario incrementar la succión para poder mantener el flujo de permeado. El ensuciamiento está influenciado por las condiciones hidrodinámicas del sistema, como el flujo de permeado, la velocidad de aireación y la concentración de sólidos. El ensuciamiento de la membrana se puede clasificar de diversas maneras,

una clasificación en función de la fuente de ensuciamiento es: i) Ensuciamiento biológico, ii) ensuciamiento orgánico y iii) ensuciamiento inorgánico entre otros (Wang *et al.*, 2014). Otra clasificación para el ensuciamiento de la membrana mencionado por Metcalf y Eddy (2003) es: I) Estrechamiento del poro, II) Taponamiento del poro y III) Formación de una torta causada por la concentración y polarización (Figura 2.3).



**Figura 2.3** Formas de ensuciamiento de la membrana (a) taponeamiento del poro. (b) estrechamiento del poro (c) Formación de la torta

El proceso de limpieza generalmente se especifica por el proveedor. La limpieza de las membranas se puede llevar a cabo de dos formas distintas, que incluyen una limpieza física ó una limpieza química, las cuales pueden ser *insitu* o *exsitu*, si es necesario extraerla del reactor (Wang *et al.*, 2014). Dentro de los métodos físicos se pueden incluir lavados a contracorriente y dentro de proceso químico está el lavado con hipoclorito de sodio hidróxido de sodio y ácido cítrico. Las limpiezas físicas se realizan en tiempos menos prolongados no producen residuos químicos y son menos propensas a degradar la membrana (Judd, 2006).

- **Flujo crítico**

Para reducir la colmatación de las membranas generalmente se trabaja en condiciones por debajo del flujo crítico (*i.e.* flujo subcrítico) (Judd, 2006). Este concepto asume que para la micro y ultra filtración existe un flujo, por debajo del cual, la caída de la permeabilidad con respecto al tiempo no desciende rápidamente y por encima de este la colmatación se acelera (Field, 2010).

Operando siempre a condiciones subcríticas se reduce notablemente el ensuciamiento de la membrana, sin embargo, debido a la naturaleza propia del tratamiento, las condiciones de operación del reactor no siempre son estables. Aun trabajando a condiciones subcríticas es inevitable el ensuciamiento y colmatación de la membrana aunque se prolongan los tiempos de limpieza.

- **Parámetros de control del BRM e impacto sobre el tratamiento**

Existen diferentes parámetros físicos, químicos y biológicos que se han determinado mayormente de forma empírica en busca de una buena remoción de contaminantes (Morgenroth, 2010) (Tabla 2.1). La PTM y J fueron descritos anteriormente (c.f. cap 2.1). Es necesario medir y controlar parámetros que influyen en la estructura y función de la comunidad bacteriana y por ende en la eficiencia del reactor. Las condiciones de operación del reactor afectan la actividad y desempeño de los microorganismos de la suspensión biológica (Gómez-Silván *et al.*, 2014; Hashimoto *et al.*, 2014). Se han reportado variables que tienen influencia significativa sobre la estructura y dinámica bacteriana como son: la temperatura, el pH, el TRH, la concentración de sólidos suspendidos volátiles y la relación C/N (Gómez-Silván, *et al.*, 2014; Miura *et al.*, 2007; Molina-Muñoz *et al.*, 2009). Estos mismos factores también ejercen influencia sobre el metabolismo bacteriano y sobre la producción de biomasa. (Jegantheesan *et al.*, 2009; Rosenberger *et al.*, 2002).

- **Parámetros fisicoquímicos:**

Las comunidades microbianas reaccionan a corto plazo a variaciones en temperatura, pH y el oxígeno disuelto. En la práctica, las condiciones climatológicas del lugar donde se encuentra el reactor y las características del efluente a tratar van a determinar estas condiciones fisicoquímicas. Sin embargo, se ha reportado que la temperatura es la variable que influye mayormente sobre las dinámicas bacterianas (Gómez-Silván, 2014; Hashimoto ., 2014), aunque también se ha reportado correlación con la remoción de amonio (Wan, 2011). El rango óptimo de pH para la degradación de materia orgánica se reporta en un amplio espectro de 6 a 9 (Metcalf y Eddy, 2003) y el oxígeno disuelto se debe mantener por encima de los 2 mg·L<sup>-1</sup> para la oxidación de la materia y la nitrificación (Haandel y Lubbe, 2012; Judd, 2008; Metcalf y Eddy, 2003) (Tabla 2.1).

- **Carga orgánica (CO):**

Se define como la relación entre la masa de materia orgánica que entra al reactor (DQO) y los microorganismos que la metabolizan, presentes en el reactor (SSV). Se expresa en kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (Haandel y Lubbe, 2012) y es considerado como uno de los más importantes parámetros de diseño de un biorreactor. Es de suma importancia en nuestro estudio ya que la dinámica y estructura de la comunidad bacteriana se ve directamente afectada por la calidad y cantidad de sustrato suministrado (Tomotani, 2007). Con cargas orgánicas bajas (i.e. CO < 0.5 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) se tiene una mayor eficiencia de remoción de contaminantes (Jegantheesan ., 2009) (Tabla 2.1)..

- **Carga orgánica volumétrica (COv):**

Es la relación entre la masa de materia orgánica que entra al reactor (DQO) y el volumen útil del reactor (Metcalf y Eddy, 2003). Esta variable no considera la cantidad de microorganismos que pueden degradar los contaminantes, por lo cual resulta de mayor utilidad la CO (Tabla 2.1).

- **Tiempo de retención celular (TRC):**

También llamado edad de lodo o tiempo de residencia celular, está definido como la relación de la masa de lodo presente en el sistema y la masa de lodo descargada diariamente del sistema (Haandel y Lubbe, 2012). Este parámetro representa el tiempo promedio que pasa el lodo, y por lo tanto los microorganismos en el sistema. El tiempo de retención celular se ha correlacionado con la diversidad de bacterias en el lodo activado (Ju y Zhang, 2015). En un BRM generalmente se tienen largos TRC, comparados con otros procesos biológicos de tratamiento, lo cual permite que crezcan microorganismos con tasas lentas de crecimiento, como bacterias nitrificantes y microorganismos capaces de degradar químicos sintéticos (Hoinkis, 2012; Jegantheesan, 2009; Metcalf y Eddy, 2003). Los altos TRC en un BRM son considerados como una clara ventaja en la nitrificación (Judd, 2008) (Tabla 2.1).

- **Tiempo de retención hidráulico (TRH):**

Es el tiempo promedio que el agua pasa dentro del reactor, está determinado por la relación entre el volumen útil del reactor y el gasto de operación. Tiene gran importancia biológica, ya que condiciona el tiempo que los contaminantes están en contacto con la suspensión biológica para su hidrólisis y degradación (Jegantheesan, 2009). Los BRM presentan la ventaja de que es posible controlar de manera independiente el TRH y el TRC, gracias al proceso de separación por medio de las membranas (Tabla 2.1).

- **Concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV):**

La concentración de sólidos suspendidos volátiles es una fracción de los sólidos suspendidos totales de la suspensión biológica del reactor. Comúnmente se utilizan para representar la biomasa del reactor (i.e. cantidad de microorganismos). Los BRM presentan como ventaja la posibilidad de trabajar con concentraciones más elevadas de SSV con respecto a otros procesos biológicos de tratamiento, gracias al proceso de separación por medio de membranas. Esta condición modifica totalmente el

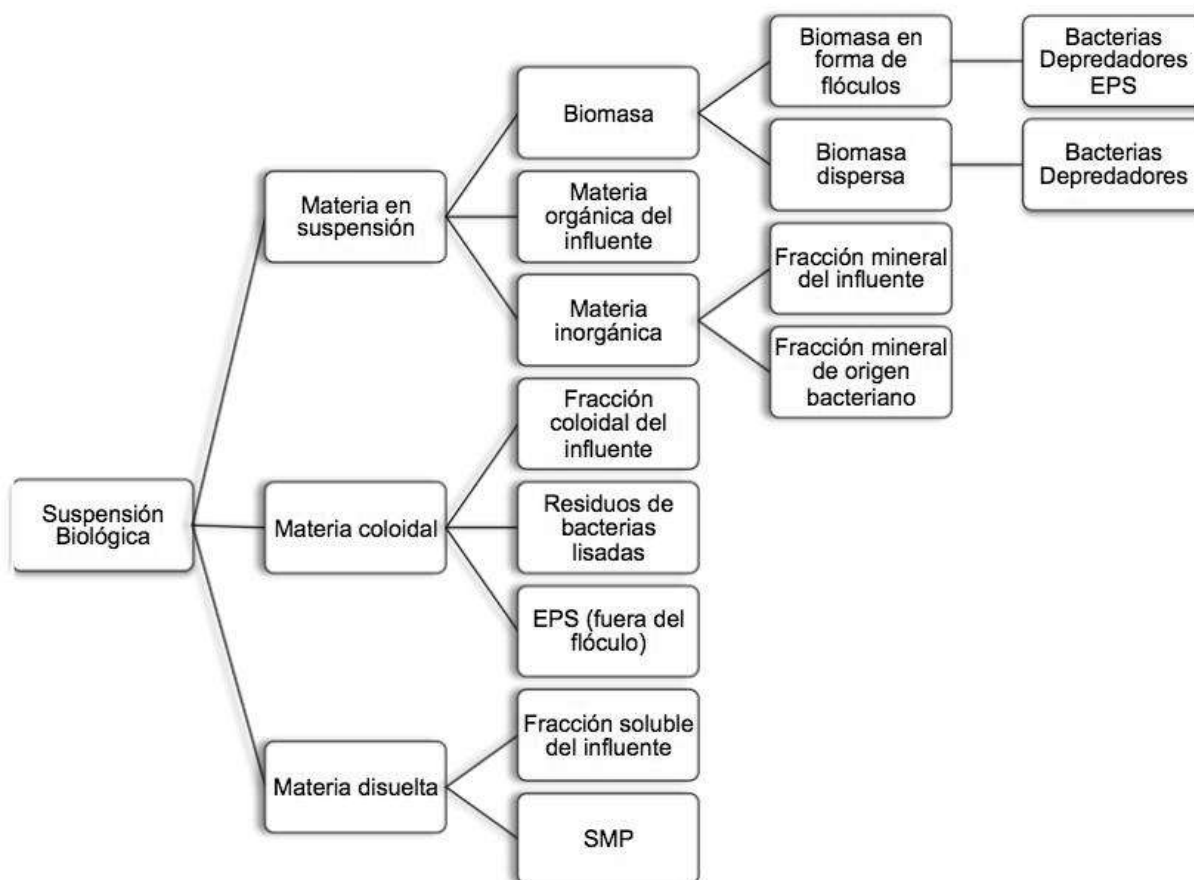
ambiente en el que se desarrollan los microorganismos (Judd, 2008), se presentan diferencias en estructura microbiológica y metabolismo bacteriano, ya que afecta directamente la CO (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Parámetros de operación del BRM modificado de Metcalf y Eddy (2013).

| Parámetro                      |        | Valores típicos | Unidades                                    | Formula                                    |
|--------------------------------|--------|-----------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Carga Orgánica                 | CO     | 0.1 a 0.4       | $g_{DQO} \times g_{SSV}^{-1} \times d^{-1}$ | $CO = \frac{Q \times DQO}{V_R \times SSV}$ |
| Carga Orgánica Volumétrica     | $CO_v$ | 2 a 4           | $kg_{DQO} \times m^{-3} \times d^{-1}$      | $CO_v = \frac{Q \times DQO}{V_R}$          |
| Flujo Transmembranal           | J      | 600 a 1100      | $L \times m^{-2} \times d^{-1}$             | $J = \frac{Q}{A}$                          |
| Oxígeno Disuelto               | OD     | 0.5 a 2         | $mg \times L^{-1}$                          |                                            |
| Presión Transmembranal         | PTM    | 4 a 35          | kPa                                         |                                            |
| Sólidos Suspendidos Totales    | SST    | 5 a 20          | $g \times L^{-1}$                           |                                            |
| Sólidos Suspendidos Volátiles  | SSV    | 4 a 16          | $g \times L^{-1}$                           |                                            |
| Tiempo de Retención Celular    | TRC    | 5 a 20          | d                                           | $TRC = \frac{V_R}{Q_w}$                    |
| Tiempo de Retención Hidráulico | TRH    | 4 a 5           | h                                           | $TRH = \frac{V_R}{Q}$                      |

### 2.1.1 Composición de la suspensión biológica

La suspensión biológica tiene una composición muy heterogénea. Estos componentes se pueden clasificar en tres grandes grupos, de acuerdo con su tamaño de partícula (Orantes, 2005): i) materia en suspensión, ii) material coloidal y iii) materia disuelta (Figura 2.4). Dentro de la materia en suspensión se encuentra la fracción biológica del reactor o Biomasa. Los componentes de la suspensión biológica son principalmente bacterias, las cuales se agrupan mayormente en forma de flóculos mientras algunas se encontrarán dispersas. Como parte de la red trófica y comparativamente en menor medida, existen protozoarios y metazoarios con papel importante para la estabilidad de la comunidad microbiológica.



**Figura 2.4** Composición de la suspensión biológica (Orantes, 2005)

### **2.1.2 Fracción biológica de la suspensión**

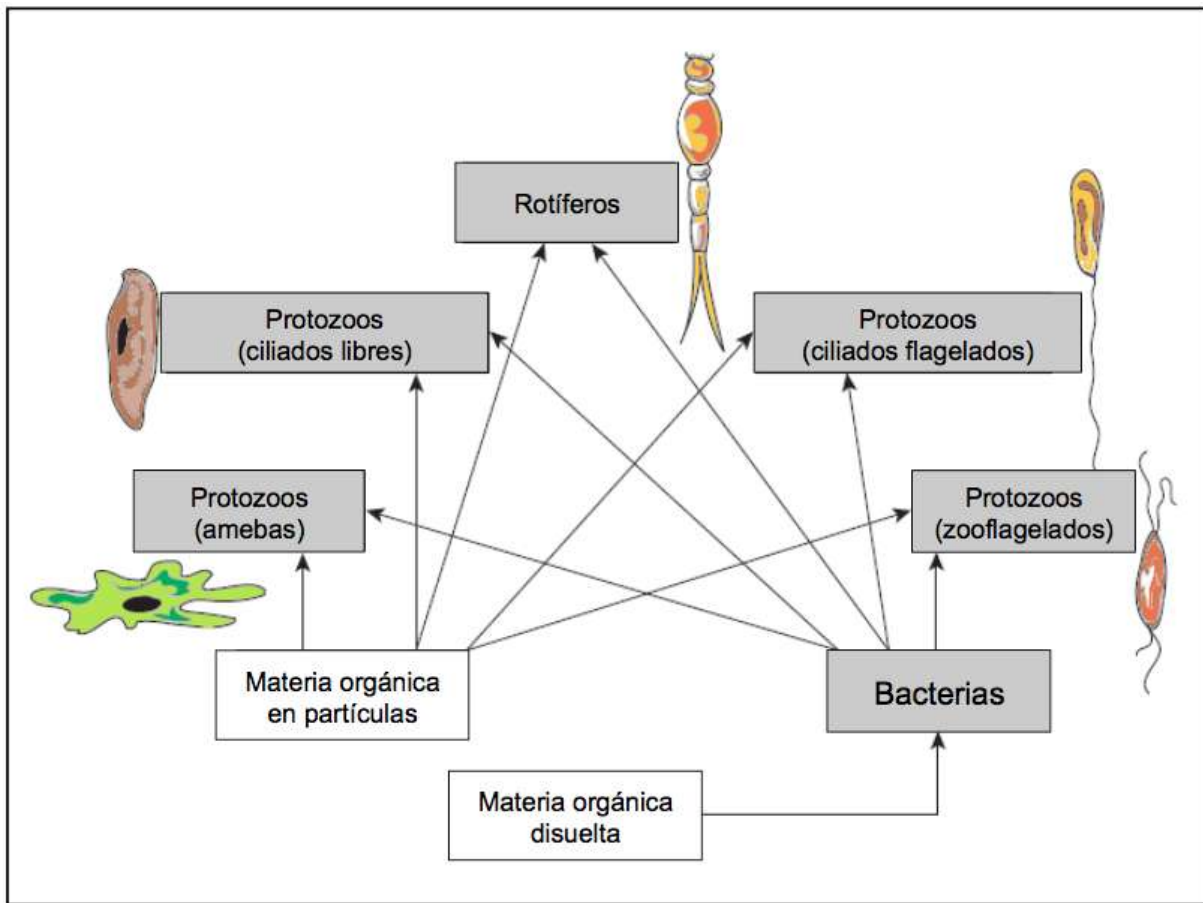
La fracción biológica del reactor es una mezcla de poblaciones de distintos microorganismos que incluye bacterias, hongos, algas, protozoarios, metazoarios y virus (Vilaseca, 2001; Metcalf y Eddy, 2003). Las condiciones del BRM diferencian totalmente el entorno en el cual se desarrollan los microorganismos, por lo que se presentan poblaciones microbiológicas diferentes en estructura y abundancia de especies (Wan, 2011). Los protozoarios y metazoarios juegan un papel crucial en el consumo de materia orgánica en suspensión y depredación de las bacterias (Vilaseca, 2001). Las interrelaciones entre las poblaciones de una comunidad contribuyen a la estabilidad ecológica del reactor (Atlas *et al.*, 2001), ya que los microorganismos coexisten e interactúan entre sí y con su ambiente (Figura 2.5).

- **Protozoarios**

Son microorganismos eucariontes comúnmente unicelulares, que presentan un tamaño mayor al de las bacterias. Reducen la concentración de bacterias libres y materia orgánica particulada en la suspensión biológica (Metcalf y Eddy, 2003). Son los organismos más abundantes de la microfauna, constituyendo aproximadamente el 5 % del peso seco de los sólidos en la suspensión. Los grupos básicos que pueden observarse en la suspensión biológica son: flagelados, amebas, ciliados nadadores libres y ciliados fijos (Vilaseca, 2001).

- **Metazoarios**

Su presencia en la suspensión es menor que la de los protozoarios, y se pueden encontrar rotíferos y nemátodos. Los rotíferos son organismos pluricelulares, de estructura más compleja que lo protozoarios, la mayoría son móviles. Metabolizan partículas sólidas y se alimentan de protozoarios y bacterias, contribuyen a la clarificación del efluente e indican tiempos de retención medio altos. En particular los nemátodos: son depredadores de las bacterias dispersas y protozoarios, son frecuentes en plantas con tiempos de retención celular medios altos (Vilaseca *et al.*, 2001).



**Figura 2.5** Niveles tróficos en un reactor biológico de biomasa en suspensión. (Mihelcic y Zimmerman, 2011)

## 2.2 Comunidad Bacteriana

La comunidad es la unidad biológica superior de la jerarquía ecológica compuesta por individuos y poblaciones. Las bacterias son las principales responsables de la eliminación de la materia orgánica y son la base de la cadena trófica en el reactor, constituyendo la población mayoritaria (Zhang *et al.*, 2012). El ecosistema donde se desarrolla la comunidad bacteriana es el biorreactor y sus condiciones ambientales son los parámetros operacionales (Atlas *et al.*, 2001).

En el tratamiento biológico encontraremos bacterias aerobias y facultativas con una característica importante que es la capacidad de flocular. Los flóculos formados están compuestos por bacterias unidas unas con otras y también por

partículas orgánicas e inorgánicas. La interacción con las bacterias filamentosas, da sustento a la formación del flóculo (J. Li *et al.*, 2008). Se ha encontrado que el filo más abundante de bacterias presentes tanto en el tratamiento convencional de lodos activados como en la variante con membranas sumergidas es *Proteobacteria* (Li *et al.*, 2015; Hashimoto *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012; Miura *et al.*, 2007); dentro de este filo el subgrupo dominante es el de *beta-proteobacteria* (Hashimoto *et al.*, 2014). Ji-hong y Yan (2008) identificaron tres géneros de bacterias de lodos activados *Acinetobacter*, *Escherichia* y *Aeromonas* como eficientes degradadoras de materia orgánica. Anteriormente se habían aislado e identificado *Zooglea* y *Comamonas* como las principales especies presentes en lodos activados (Dias y Bhat, 1965). Otros filos presentes son *Firmicutes* y *Actinobacteria* (Li *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2014). Aunque se han aislado e identificado algunas especies o familias presentes en el reactor (e.g. *Pseudomonas* conocidas por su acción desnitrificante y *Klebsiella oxytoca*, que es una bacteria nitrificante (Khan *et al.*, 2013)), aún existen claras desventajas para realizar estos estudios, como son el aislamiento y la necesidad de que existan datos disponibles para la identificación en el Genbank.

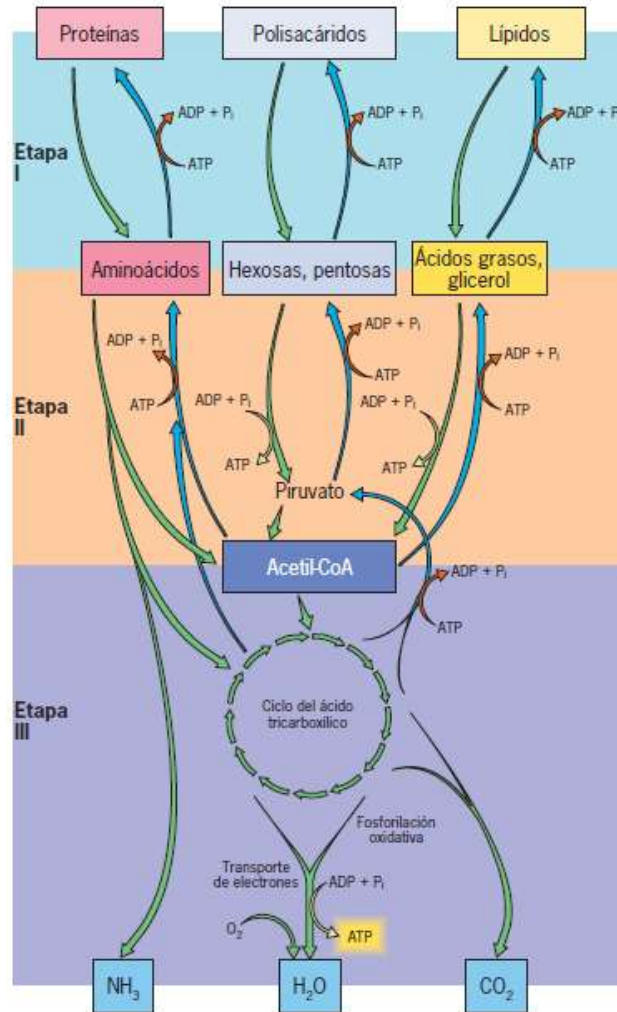
La dinámica de la comunidad bacteriana en una suspensión biológica están determinadas por la suma del crecimiento y decaimiento de las poblaciones bacterianas a lo largo del tiempo de operación del biorreactor así como las poblaciones presentes en el flujo de entrada de agua residual, así como la descarga de las poblaciones en el agua tratada (Hashimoto *et al.*, 2014). Grandes cambios en la estructura de la población son atribuidos a cambios operacionales en el reactor principalmente al cambio en la alimentación (Stamper *et al.*, 2003). Las dinámicas adecuadas en la estructura de las comunidades microbianas son importantes para el funcionamiento adecuado de los BRM (Miura *et al.*, 2007).

La comunidad bacteriana se puede analizar desde el punto de vista metabólico global, sin la necesidad de aislar o conocer las especies que participan en la depuración del agua residual. En una comunidad, cada población ocupa un papel funcional dentro del reactor, las cuales son susceptibles de ser remplazadas por

otras mejor adaptadas a las condiciones operacionales. El papel funcional puede ser desempeñado por especies diferentes, esto se conoce como redundancia funcional. La redundancia funcional tiene gran importancia dentro del tratamiento de agua residual, ya que ayuda a la auto recuperación del reactor en términos de la calidad del efluente.

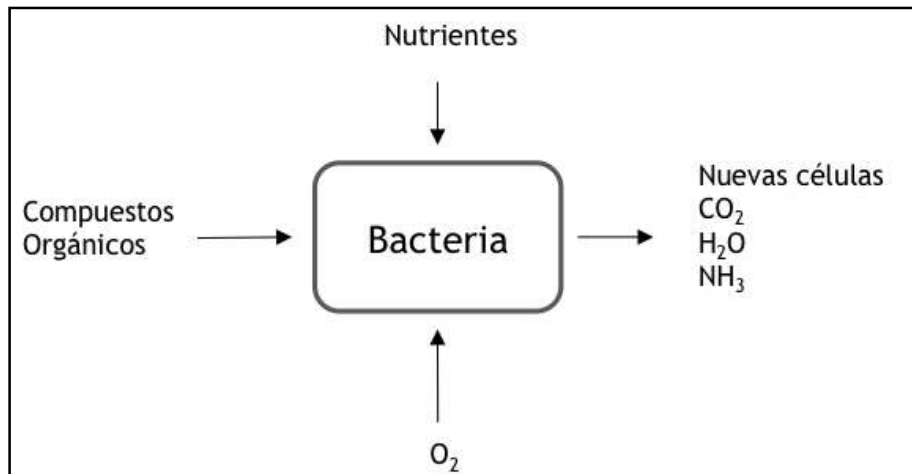
### **2.2.1 Metabolismo bacteriano**

El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en una célula, la mayoría de las cuales se agrupan en rutas metabólicas (Karp, 2011). Las rutas metabólicas se dividen en dos grandes grupos, las anabólicas y las catabólicas. Las rutas catabólicas parten de moléculas complejas para convertirlas en moléculas más simples, con el fin de liberar energía y proporcionar materia prima para sintetizar otras moléculas. Las rutas anabólicas consisten en la formación de moléculas complejas a partir de materiales más simples y requieren un gasto energético. Las rutas anabólicas utilizan la energía liberada por las rutas catabólicas (**Figura 2.6**) (c.f. Anexo A).



**Figura 2.6** Etapas del metabolismo (Tomado de Karp, 2011)

La degradación de los compuestos carbonaceos del agua se lleva a cabo por organismos heterótrofos (Haandel y Lubbe, 2012; Metcalf y Eddy, 2003). Adicionalmente a la fuente de carbono los microorganismos requieren de elementos inorgánicos (nutrientes) para su crecimiento; los principales son el nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio, magnesio, hierro, sodio y cloro (Metcalf y Eddy, 2003).



**Figura 2.7** Diagrama simplificado del metabolismo bacteriano (Metcalf y Eddy, 2003).

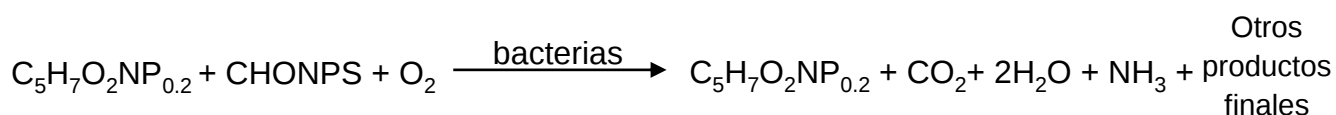
Como consecuencia del consumo y biodegradación de la materia orgánica que entra al reactor, los microorganismos se reproducen y su concentración aumenta. La biomasa generada en el anabolismo es medida mediante el incremento en la concentración de SSV en la suspensión biológica. La relación entre la masa sintetizada de microorganismos y la masa de materia orgánica consumida es llamado coeficiente de rendimiento ( $Y$ ) (Haandel y Lubbe, 2012). La expresión matemática para su obtención de acuerdo con Metcalf y Eddy (2003) es:

$$Y = \frac{g_{\text{Biomasa Producida}}}{g_{\text{sustrato Utilizado}}}$$

### 2.2.2 Remoción de la DQO:

El principal propósito de los reactores biológicos es la remoción de la materia orgánica del agua residual, esta es medida como DBO o DQO (Metcalf y Eddy, 2003). Para el caso de este estudio está representada como DQO. Los contaminantes del agua entran en contacto con los microorganismos heterótrofos

dentro en el reactor. El agua contaminada contiene la materia orgánica en distintas formas de disolución, sólidos disueltos, material coloidal y sólidos suspendidos, la fracción disuelta puede penetrar la membrana celular para ser metabolizada directamente. El material particulado, para ser metabolizado, tiene que pasar por otros procesos como la hidrólisis que ayuda a disolver el material (Haandel y Lubbe, 2012). Una parte de la materia orgánica es oxidada para proporcionar energía, el remanente de materia es utilizado para la síntesis de material celular. El exceso de biomasa producido es removido del reactor para mantener estables las condiciones de operación. La suspensión biológica del reactor es separada del agua tratada mediante la filtración con membrana. Estequiométricamente Metcalf y Eddy (2003), describen la reacción de oxidación aerobia como:



Donde: CHONPS es usada para representar la materia orgánica del agua residual y  $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$  representa el material celular

### 2.2.3 Asimilación y nitrificación del amonio:

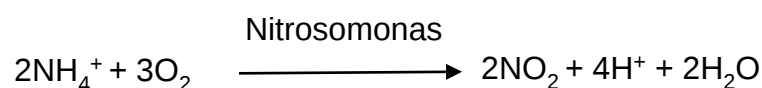
El nitrógeno en el agua residual se puede encontrar en diferentes formas, principalmente en dos: nitrógeno amoniacal y nitrógeno orgánico (urea, aminoácidos y otros compuestos con el grupo amino). La amonificación es la conversión del nitrógeno orgánico en nitrógeno amoniacal, la reacción inversa (conversión de amonio en nitrógeno orgánico) como parte del anabolismo, es llamada asimilación (Haandel y Lubbe, 2012).

La nitrificación es la oxidación del nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3$ ) en dos pasos hasta los nitratos ( $\text{NO}_3$ ), pasando por los nitritos ( $\text{NO}_2$ ), por la acción de dos grupos de distintas bacterias aerobias autótrofas. *Nitrosomonas* que se encarga de oxidar el amonio a nitritos y *Nitrobacter* que se encargada de oxidar los nitritos a nitratos

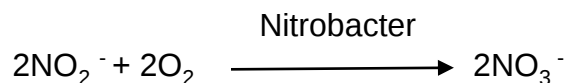
(Metcalf y Eddy, 2003). El proceso de nitrificación se lleva a cabo dentro del reactor paralelamente con la remoción de DQO. Para la nitrificación se requiere un ambiente aerobio así como un mínimo de seis días de TRC que permita el desarrollo de bacterias nitrificantes. Las bacterias nitrificantes requieren de mayores tiempos de retención celular e hidráulicos debido a que crecen más lento que las bacterias heterótrofas. Las temperaturas bajas impactan negativamente sus tasas de crecimiento y el rango óptimo de pH es de 7 a 8.5 (Haandel y Lubbe, 2012).

Estequiométricamente la nitrificación se expresa (Metcalf y Eddy, 2003):

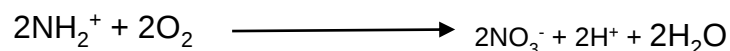
Paso 1: oxidación del amonio a nitritos



Paso 2: Oxidación del nitrito a nitrato



Reacción global de oxidación:



#### 2.2.4 Análisis del potencial metabólico bacteriano

Las comunidades microbianas desempeñan el papel primordial en el tratamiento de los contaminantes orgánicos en el biorreactor, por lo cual su caracterización metabólica es un importante parámetro de análisis. El análisis metabólico puede proporcionar una medida sensible y ecológicamente relevante de la función de la comunidad microbiana y de las adaptaciones funcionales en el tiempo y el espacio (Weber y Legge, 2010). El análisis metabólico se lleva a cabo verificando el uso de

diferentes fuentes de carbono. El espectro de las fuentes utilizadas es el perfil metabólico de la comunidad y puede obtenerse mediante la herramienta BIOLOG<sup>®</sup> EcoPlates<sup>™</sup>. Este método se ha hecho popular para caracterizar y comparar la diversidad funcional, el potencial funcional y la actividad metabólica de las comunidades microbianas heterotróficas (Button *et al.*, 2016). Inicialmente se realizó en comunidades microbianas en suelo (Garland y Mills, 1991) y se ha expandido hacia diferentes sistemas como en estudios de ecotoxicología (Chojniak *et al.*, 2015; Gryta *et al.*, 2014); para analizar comunidades presentes durante el compostaje (Albrecht *et al.*, 2010) y en el tratamiento de aguas residuales, en humedales y lodos activados (Button *et al.*, 2015; Hashimoto *et al.*, 2014).

- **Diversidad metabólica bacteriana**

Los procesos de una población se llevan a cabo en dimensiones temporales y espaciales. Para poder estudiar la dinámica de poblaciones son necesarias herramientas matemáticas de la ecología de comunidades las cuales permiten comparar de manera cuantitativa distintas comunidades, así como dar seguimiento a la evolución de las comunidades microbianas frente a las variaciones operacionales del reactor. Estas herramientas cuantitativas facilitan el acceso a fenómenos que de otra manera sería muy difícil apreciar (Molles, 2006).

La diversidad metabólica se expresa mediante índices de diversidad ecológicos. El índice más utilizado para estimar la diversidad de las comunidades microbianas es el Índice de Shannon-Wiener (Zamora, 2012). Este índice también se ha utilizado a partir de los perfiles metabólicos de las comunidades, como una medida para comprender los cambios espacio temporales de las comunidades (Weber *et al.*, 2010). Se puede estimar la diversidad metabólica desde varias perspectivas haciendo analogías con los conceptos de diversidad taxonómica (Zak, 1994). La manera más simple de determinar la diversidad es cuantificar el número de grupos degradativos presentes en el sistema por lo cual se ha determinado en algunos estudios el índice de riqueza como el número de pocillos con absorbancia mayor a 0.25 unidades de absorbancia (Button *et al.*, 2015, 2016).

### **2.2.5 Relación de los contaminantes con los compuestos de BIOLOG® Ecoplate™**

La composición del agua residual a tratar en un biorreactor es muy diversa en cuanto a materiales presentes y concentración de estos, haciendo de cada efluente un conjunto específico de compuestos que podemos relacionar con los compuestos presentes en las Ecoplacas (Tabla 2.2). Las aguas residuales, dependiendo de su origen, contienen en diferentes proporciones los diferentes compuestos químicos presentes en las ecoplacas (carbohidratos, polímeros, aminoácidos etc.)

Debido a la gran cantidad de componentes que pueden ser encontrados en las diferentes aguas residuales, generalmente se restringen las consideraciones para un grupo.

**Tabla 2.2** Principales componentes del agua residual representados por los grupos presentes en las BIOLOG® Ecoplates™ (los componentes fueron tomados de Delgadillo *et al.*, 2010 y CENTA, 2008)

| Componentes generales del agua residual       | Componentes específicos                             | Grupo representante en BIOLOG® Ecoplate™                                                                                 |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Materia Orgánica<br/>(Medida como DQO)</b> | Residuos alimenticios                               | Carbohidratos, Polímeros<br>Amidas/aminas, Aminoácidos,                                                                  |
|                                               | Grasas y aceites                                    | Carbohidratos,                                                                                                           |
|                                               | Heces y urea                                        | Aminas/amidas                                                                                                            |
|                                               | Celulosa                                            | Polímeros                                                                                                                |
|                                               | Compuestos nitrogenados                             | Aminoácidos, Aminas/amidas                                                                                               |
|                                               | Detergentes                                         | Polímeros                                                                                                                |
|                                               | Fertilizantes y pesticidas                          | -----                                                                                                                    |
| <b>Inorgánico</b>                             | Compuestos volátiles                                | Ácidos cetónicos y carboxílicos                                                                                          |
|                                               | Metales pesados                                     | -----                                                                                                                    |
|                                               | Nutrientes                                          | -----                                                                                                                    |
| <b>Partículas de tamaño mayor</b>             | Trozos de madera, trapos plásticos, arenas y gravas | Estos componentes normalmente se retienen en el pre tratamiento, por lo cual no se presentan en el tratamiento biológico |
| <b>Contaminantes emergentes</b>               | Fármacos                                            | Polímeros, ácidos cetónicos y carboxílicos                                                                               |
|                                               | Productos de limpieza personal                      | Ácidos cetónicos y carboxílicos                                                                                          |

### 3 ANTECEDENTES

Existen relativamente pocos antecedentes del estudio de la capacidad metabólica aplicada para los sistemas de tratamiento de agua residual. Al momento, no se ha encontrado un estudio específico, enfocado en el potencial metabólico de la suspensión de un BRM mediante BIOLOG® Ecoplate™. Sin embargo, se presentan algunos estudios relacionados con el tipo de proceso biológico y el tipo de reactor empleado o la técnica experimental, estos sirven como base para el planteamiento del presente estudio.

Los estudios realizados por Pérez *et al.*, (2015) y Villalón *et al.* (2012) se realizaron en el mismo BRM y ambos fueron enfocados en características de la biomasa, sirviendo como base para determinar las condiciones óptimas de funcionamiento del sistema

- Pérez *et al.* (2015), trabajaron caracterizando la microfauna del BRM, particularmente protozoarios y metazoarios. Este estudio aporta indicios, de que el incremento en la carga orgánica propicia cambios sobre la estructura microbiológica del reactor. Sus resultados mostraron que en cada carga orgánica se establecen diferentes comunidades de microfauna, estructuradas funcionalmente de acuerdo con sus requerimientos nutricionales, las condiciones ambientales y de operación del reactor biológico. La adaptación de la microfauna se refleja en la diversidad y el recambio de especies dentro de la suspensión biológica. Se llegó a estimar hasta un 77% de recambio de poblaciones en la estructura de la comunidad, con los cambios de carga orgánica.
- Villalón *et al.* (2012) analizaron la actividad bacteriana en un BRM con retención total de sólidos. Este estudio aporta información sobre cómo se orienta el metabolismo bacteriano a partir de las condiciones experimentales, específicamente la CO de trabajo del BRM. Concluyeron que los ciclos de síntesis, acumulación y consumo de productos de reserva de energía y las bajas cargas orgánicas másicas con las que regularmente operan los BRM, están

directamente relacionados con las bajas concentraciones de células activas observadas.

Los estudios centrados en la biomasa del BRM se basan hasta el momento principalmente en técnicas moleculares para determinar diversidad de especies microbianas como respuesta a variaciones operacionales. Los siguientes estudios aportaron conocimiento sobre la dinámica bacteriana y la relación que guarda con las variables en el sistema, específicamente con el influente a tratar.

- Miura *et al.* (2007) estudiaron mediante DGGE PCR y la fluorescencia de hibridación *in situ* (FISH) la estructura de las comunidades bacterianas en dos tipos de BRM y compararon los resultados obtenidos con la comunidad presente en un tratamiento de lodos activados convencional tratando la misma agua. Este estudio muestra que el influente de agua residual tiene un fuerte impacto sobre la estructura de la comunidad bacteriana. Concluyeron que no sólo la estabilidad sino también que las dinámicas adecuadas de la estructura de la comunidad bacteriana son importantes para un rendimiento estable de los BRM tratando compleja agua municipal.
- Stamper *et al.* (2003) monitorearon la población bacteriana de un sistema de tratamiento de aguas grises durante un periodo de 100 días en un BRM con un volumen de 1800 L. Encontraron que picos en el sustrato de alimentación provocan cambios significativos en la estructura de la comunidad y que a pesar de la población bacteriana es inestable, el BRM era capaz de cumplir con los parámetros de calidad del efluente. Este estudio sirve para hacer notar que el influente y la concentración de éste afectan la dinámica de la comunidad bacteriana.

Se reportan algunos estudios con BIOLOG® Ecoplate™ como herramienta para determinar el potencial metabólico o la diversidad metabólica pero aplicada a consorcios microbianos de distinta naturaleza y algunos aplicados a sistemas convencionales de lodos activados. Este estudio se basa principalmente en los descritos a continuación, los cuales aportan desde la preparación de la muestra hasta el análisis estadístico de los datos así como argumentos para la comparación.

- En el estudio realizado por Button *et al.*, (2015) utilizaron la misma técnica, pero aplicada al tratamiento de un efluente distinto. Button *et al.*, (2015). Compararon la diversidad metabólica de las comunidades microbiológicas en humedales a escala piloto con distintos diseños mediante el uso de BIOLOG® Ecoplate™ y relacionaron los índices de diversidad riqueza y actividad con las variables del proceso mediante análisis estadísticos. Encontraron que existía un mayor consumo de los polímeros y carbohidratos en las primeras etapas de los sistemas.
- Weber y Legge (2010) explicaron que diferentes comunidades pueden ser comparadas con base en sus patrones únicos de utilización de fuentes de carbono obtenido mediante BIOLOG® Ecoplate™.; así mismo describen el protocolo del laboratorio para obtener dicho perfil y proporcionan una descripción detallada de diferentes tipos de análisis de datos.

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

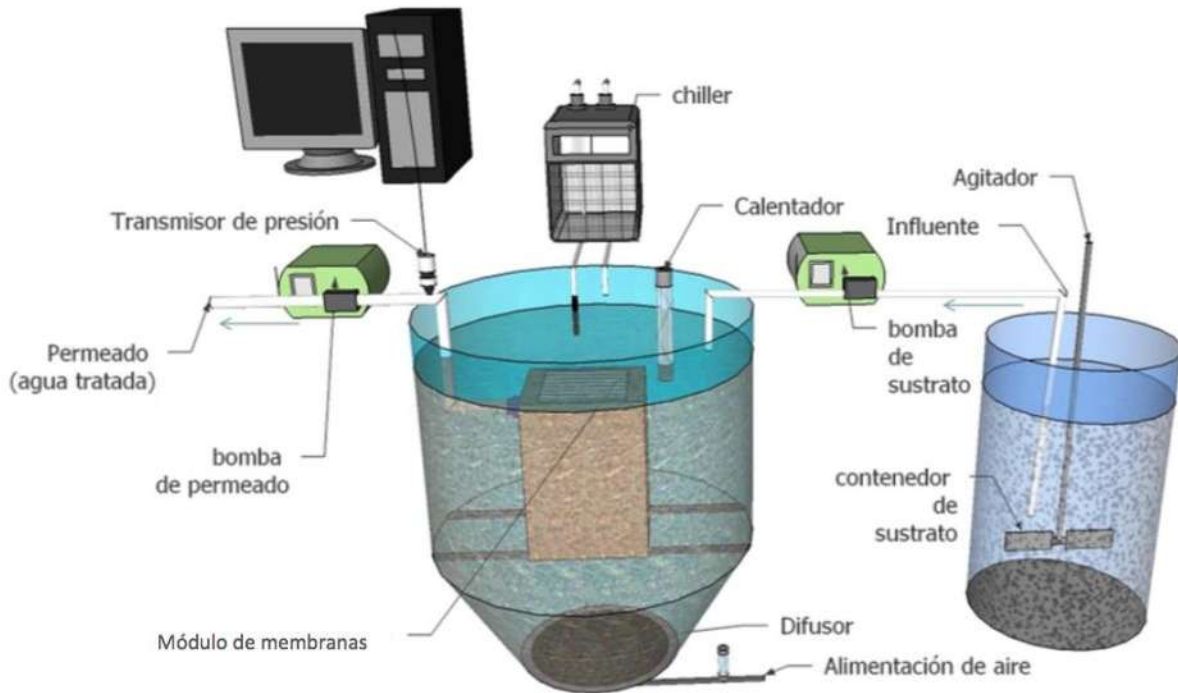
### **4.1 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño factorial  $2^2$ . Se utilizaron dos sustratos sintéticos con fuente de carbono distinta, acetato y glucosa, con dos niveles de carga orgánica cada uno. Se alimentó el BRM con cargas orgánicas de 0.1 y 0.3 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>.

Para observar los cambios metabólicos generados en la comunidad bacteriana como respuesta ante la variación en la alimentación, se tomaron tres muestras de la biomasa representativas de cada condición experimental del reactor. Las muestras fueron analizadas mediante BIOLOG® Ecoplate™. Se llevaron a cabo paralelamente los análisis de laboratorio para darle seguimiento al rendimiento del reactor.

### **4.2 Biorreactor con membranas sumergidas**

Para el desarrollo del trabajo se utilizó un biorreactor con membranas sumergidas, escala laboratorio, con un volumen de 70 L. Tiene forma cilíndrica en la parte superior con diámetro igual a 0.5 m y cono trunco en la parte inferior, que termina con un diámetro que se ajusta al difusor de aire de burbuja fina (22 cm). Esta geometría garantiza un régimen de mezcla completa y la correcta aireación de la suspensión (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Biorreactor experimental con membranas sumergidas (Negra, 2015)

#### 4.2.1 Módulo de Membranas

El BRM contó con un módulo de membranas planas de di-fluoruro de polivinilideno (PVDF) con un diámetro de poro de  $0.14 \mu\text{m}$  colocado en el centro del reactor sobre el difusor de burbuja fina (Figura 4.1). El flujo transmembranal de trabajo fue de  $4.6 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  y la presión PTM máxima aceptada era de 0.5 bar antes de someter a limpieza la membrana. Los de placas y marcos son módulos compactos de una serie de láminas de membranas planas y placas de soporte. El permeado pasa entre dos láminas de membranas adyacentes. Las placas sostienen las membranas y proveen una salida para el permeado (Figura 4.2). La fuerza de corte de las burbujas al subir ayuda a reducir el ensuciamiento de las membranas. El módulo de membrana cuenta con las características mostradas en la Tabla 4.1.



**Figura 4.2** Módulo de membranas en el BRM.

**Tabla 4.1.** Características del módulo de membranas empleado en el proceso experimental

| Característica       | Magnitud | Unidades                                               |
|----------------------|----------|--------------------------------------------------------|
| Tamaño de poro       | 0.14     | $\mu\text{m}$                                          |
| Número de placas     | 8        | piezas                                                 |
| Espacio entre placas | 12       | mm                                                     |
| Área filtrante       | 0.2      | $\text{m}^2$                                           |
| Área específica      | 54       | $\text{m}^2$ de área filtrante/ $\text{m}^3$ de módulo |

- **Limpieza de membrana**

Previo al inicio de la experimentación se realizó un lavado físico y químico del módulo de membranas, con el fin de eliminar toda suciedad que impidiera un flujo adecuado o contaminara nuestro experimento, al cambiar el sustrato se realizó nuevamente el lavado de la membrana para iniciar sin interferencias.

El lavado físico consiste en un lavado del módulo *ex situ*, con chorros a presión de agua limpia y temperatura ambiente, por un periodo de 30 minutos cuidando de no dañar las membranas del módulo con el fin de remover la biomasa acumulada sobre la superficie de la membrana.

Posterior al lavado físico se realizó un lavado químico con diferentes soluciones. Primeramente se realizó un lavado estático en una solución de hidróxido de sodio ( $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), durante 24 h. Posteriormente se pasó el módulo a una solución de ácido cítrico ( $22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durante 5 h y finalmente se sumergió el módulo de membranas en una solución de hipoclorito de sodio ( $0.2 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durante 5 h.

Al terminar los lavados químicos se pasó el módulo a un recipiente con agua destilada, donde se mantuvo siempre sumergido hasta el inicio de operación del reactor. Se trabajó bajo condiciones de flujo subcríticas obtenidas por Rocha *et al.* (2014) para este reactor y membrana bajo las mismas condiciones, para evitar el ensuciamiento excesivo de la membrana.

#### 4.2.2 Sustratos suministrados

El reactor se alimentó con dos sustratos completamente solubles y de fácil asimilación para los microorganismos con cargas orgánicas de 0.1 y 0.3 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> cada uno.

La composición de ambos sustratos fue similar, únicamente se cambió la fuente de carbono, ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) por glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). El resto de los nutrientes adicionados fueron: nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) y fosfato de amonio (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y micronutrientes (Tabla 4.2). Para obtener una relación C:N:P (DQO:N-NH<sub>3</sub>:P-PO<sub>4</sub>) 30:2:1. Se ajustó el pH a 7 ± 0.5 unidades, con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El sustrato se preparó una vez por semana y se alimentó de manera continua al BRM mediante una bomba peristáltica (Watson Marlow® Modelo 323) a un flujo de 0.92 L·h<sup>-1</sup>.

**Tabla 4.2** Componentes de los efluentes sintéticos

| Sustrato                                      | Componentes         |
|-----------------------------------------------|---------------------|
| <b>Primer sustrato<br/>a base de Acetato</b>  | Ácido acético       |
|                                               | Nitrato de amonio   |
|                                               | Fosfato de amonio   |
|                                               | Sulfato de magnesio |
|                                               | Cloruro de calcio   |
| <b>Segundo sustrato<br/>a base de Glucosa</b> | Glucosa             |
|                                               | Nitrato de amonio   |
|                                               | Fosfato de amonio   |
|                                               | Sulfato de magnesio |
|                                               | Cloruro de calcio   |

### 4.2.3 Seguimiento de los parámetros experimentales

El reactor operó en continuo durante toda la corrida experimental, se dividió el periodo en etapas de arranque, estabilización y etapas de operación estable. La primera etapa fue desde la inoculación hasta alcanzar una concentración de SSV igual a  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en el reactor, la etapa de estabilización comprendía desde que se realizaba un cambio en el sustrato hasta obtener parámetros fisicoquímicos de respuesta estables. Todos los periodos estables se mantuvieron durante dos semanas. Los análisis se realizaron como se muestra en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3** Frecuencia de medición de variables en cada etapa de experimentación

| Periodo        | Frecuencia         |
|----------------|--------------------|
| Arranque       | Cada 2 semanas     |
| Estabilización | Cada semana        |
| Estable        | 3 veces por semana |

- **Parámetros fisicoquímicos**

Los parámetros fisicoquímicos pH, T y OD fueron variables controladas en el proceso experimental. El punto de muestreo se muestra en la Tabla 4.4. El pH se controlaba en un rango de  $7 \pm 0.5$  unidades de pH en el reactor. Para su control se adicionaron soluciones de hidróxido de sodio (5N) o ácido sulfúrico (5N). La temperatura se controló con ayuda de un equipo enfriador para mantenerla a  $20 \pm 2$  °C. El OD se mantuvo en un valor superior a los  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante una aireación constante que garantizara la no colmatación de la membrana. Se verificó el valor comparando con estudios anteriores que usaron el mismo sistema de trabajo, siendo superior a lo requerido (Negra, 2015; Pérez, 2015; Rueda, 2014; Villalón, 2012).

- **Parámetros operacionales del reactor**

Los parámetros medidos y su punto de muestreo se observan en la Tabla 4.3. Todos los parámetros se obtuvieron de acuerdo con *Standard methods for the examination of water and wastewater* (1999). Para el reactor se mantuvieron constantes los parámetros flujo (Q) en 22.08 l·d<sup>-1</sup> lo que nos dio un TRH de 3.17 d. Para el seguimiento al desarrollo de la biomasa se midieron los sólidos suspendidos totales (SST) y los sólidos suspendidos volátiles (SSV). Los SSV se mantuvieron en un valor de 5 g·L<sup>-1</sup>. Para mantener estable la concentración se realizaron purgas regularmente del biorreactor.

La demanda química de oxígeno (DQO) representa la materia orgánica en el sistema. Se midió en tres puntos distintos, i) influente al reactor o sustrato de alimentación, ii) en el reactor y iii) el permeado (Tabla 4.4). La medición en el influente era un control para mantener la condición experimental de carga orgánica propuesta y verificar la correcta composición de éste. En el reactor se midió la DQO total de la suspensión y la DQO soluble. La DQO soluble se obtuvo del filtrado de la suspensión del reactor, con base en los métodos normalizados. La medición en el efluente se hizo para verificar el desempeño del reactor y medir la eficiencia de remoción de materia orgánica.

El nitrógeno en el agua residual puede presentarse formando químicamente distintos compuestos (Metcalf y Eddy, 2003). Para el control experimental se tomó como referencia el nitrógeno total (NT), el nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) y el nitrógeno de nitratos (N-NO<sub>3</sub>). Se midieron en los puntos que muestra la Tabla 4.4. EL N-NH<sub>3</sub> se midió en el influente como un control para verificar la correcta formulación y dar seguimiento a la relación C/N propuesta (15:1 C:N). En el efluente se midió para verificar la tasa de nitrificación alcanzada por el reactor. El NT y el N-NO<sub>3</sub> se midieron para dar seguimiento al comportamiento del nitrógeno en el reactor, adicionalmente esto permitió estimar de manera indirecta el nitrógeno orgánico (N<sub>org</sub>).

**Tabla 4.4.** Punto de muestreo para los parámetros de control

| Parámetro         | Punto de muestreo             |
|-------------------|-------------------------------|
| pH                | Reactor                       |
| Temperatura       | Reactor                       |
| Oxígeno disuelto  | Reactor                       |
| SST               | Reactor                       |
| SSV               | Reactor                       |
| DQO               | Influente, Reactor, Efluente, |
| NT                | Permeado                      |
| N-NH <sub>3</sub> | Influente, Permeado           |
| N-NO <sub>3</sub> | Permeado                      |

### 4.3 Análisis metabólico bacteriano

Las muestras tomadas del reactor se examinaron mediante BIOLOG® Ecoplate™, una herramienta que consta de 31 fuentes de carbón diferentes y un blanco por triplicado, en cada placa de 96 pozos. Cada pozo con un indicador redox (sales de tetrazolio) vira a violeta en un medio reductor (propiciado por la respiración celular) lo cual indica, de acuerdo a la intensidad del color, el consumo del sustrato en cada pozo donde se inoculó la biomasa. Mediante métodos espectrofotométricos se determinó que sustratos asimilaba cada comunidad, con lo cual se obtuvo el perfil metabólico para cada tiempo de operación del reactor.

Dado el diseño experimental se tenían distintas muestras para cada tratamiento de alimentación al reactor con un sustrato sintético y sus dos niveles de carga orgánica, para diferenciar las muestras tomadas se utilizó la nomenclatura mostrada en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.** Nomenclatura utilizada en el proceso experimental para diferenciar las muestras de los tratamientos con los sustratos sintéticos utilizados y las cargas orgánicas de trabajo (CO)

| Sustrato sintético | CO1   | CO2   |
|--------------------|-------|-------|
| Acetato            | AC1.1 | AC2.1 |
|                    | AC1.2 | AC2.2 |
|                    | AC1.3 | AC2.3 |
| Glucosa            | GL1.1 | GL2.1 |
|                    | GL1.2 | GL2.2 |
|                    | GL1.3 | GL2.3 |

- **Toma y preparación de la muestra**

Se tomaron 200 mL del lodo del reactor para cada muestra a lo largo del tiempo de operación para examinar el perfil metabólico de la comunidad y posteriormente compararlos entre sí para observar los cambios presentados.

A partir del lodo del reactor se obtuvo una suspensión biológica modificando la metodología descrita por Braun *et al.* (2010) para los lodos del reactor. Esta solución se utilizó para inocular los pozos de las placas BIOLOG® Ecoplate™ con un volumen de 150 µL. Esto se realizó para cada muestra tomada del reactor en los diferentes tiempos: Las placas se incubaron a  $20 \pm 2$  °C y se midió absorbancia a 590 nm por 120 horas.

#### 4.3.1 Análisis del potencial degradativo global

Los datos arrojados por el software lector de la placa de BIOLOG® a 590 nm son utilizados para determinar el promedio del desarrollo del color (AWCD) (Weber y Legge, 2010). Se tomó el AWCD como un índice del potencial metabólico global de la comunidad bacteriana. Se construyeron gráficas del AWCD en función del tiempo de incubación de la placa. Para su comparación se tomaron dos métodos: i) la comparación estadística de los datos normalizados a la hora 120 de incubación. Se tomó esta hora ya que en este punto todas las cinéticas se encontraban en su fase estacionaria y la comunidad bacteriana se había expresado totalmente; ii) adicionalmente para aumentar el poder de análisis se ajustó la cinética mostrada a una ecuación no lineal de crecimiento logístico (Salomo *et al.*, 2009). Se tomó este modelo debido a que los parámetros cinéticos considerados permanecen constantes con respecto a la densidad de los inóculos y, por lo tanto, compensan diferentes números de bacterias iniciales en los varios pozos cuando tienen valores aceptables de correlación (*i.e.* mayores al 95 %)(Salomo *et al.*, 2009).

$$Y = AWCD = \frac{K}{1 + e^{-p(t-s)}}$$

Mediante este modelo se obtuvieron tres parámetros cinéticos, i) la asíntota ( $K$ ), ésta se presenta en el valor máximo alcanzado del AWCD en cada cinética, ii) la tasa exponencial de cambio ( $p$ ) y iii) el tiempo al punto medio de la porción exponencial de la curva.

- **Diversidad metabólica**

Adicionalmente al potencial metabólico se determinó la diversidad de sustratos que utilizaba la comunidad bacteriana del reactor mediante el índice de Shannon:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

Donde:

H= Diversidad de sustrato

$p_i$  = Relación de la actividad de utilización un sustrato en particular respecto a la suma total de la actividad mostrada por todos los sustratos (valor de absorbancia)

Para observar la similitud mostrada por las diferentes muestras de la comunidad del reactor, en términos de las fuentes de carbón utilizadas, se realizó un análisis comparativo mediante el índice de Bray-Curtis, con ayuda del software PAST 3.0 tomando los datos de la hora 120 de incubación de las placas.

#### **4.3.2 Análisis del potencial gradativo por fuentes de carbono en la placa**

Dada la cantidad de fuentes de carbono en la placa, los sustratos se clasificaron en 5 grupos de acuerdo a su estructura química; carbohidratos, polímeros, ácidos cetónicos y carboxílicos, aminoácidos y aminos/amidas (Webber y Lengge, 2010). Para el análisis comparativo de la degradación por grupos químicos se discretizaron las curvas promedio de cada muestra que se incubó por triplicado, considerando tres fases: (i) adaptación, (ii) crecimiento exponencial y (iii) fase estacionaria. El análisis se realizó considerando los puntos correspondientes a las horas 40 y 56 en la fase de crecimiento exponencial y a la hora 120 en la fase estable.

#### **4.3.3 Relación de las variables operacionales con el potencial gradativo**

Las variables seleccionadas para este análisis, por su relevancia en el control de los procesos biológicos de tratamiento de agua en un biorreactor fueron: i) la carga orgánica experimental (CO) que corresponde a la masa de sustrato suministrada a la biomasa del reactor, por unidad de tiempo ( $\text{kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), ii). la fuente de carbono en la composición del sustrato (*i.e.* glucosa y acetato), iii) la Relación experimental C/N del influente, iv) el tiempo de retención celular, v) la relación entre los sólidos suspendidos volátiles y los sólidos suspendidos totales en el reactor (SSV/SST) y vi) la concentración de nitrógeno amoniacal en el efluente. No obstante que se ha señalado la influencia de los parámetros fisicoquímicos sobre la estructura de la comunidad bacteriana (Gómez-Silván *et al.*, 2014; Molina-Muñoz *et al.*, 2009), no se tomaron en cuenta las variables control (pH, T, TRH) ya que se mantuvieron sin cambios importantes durante la experimentación.

#### **4.4 Análisis estadísticos de los datos experimentales**

Dada la gran cantidad de variables e interacciones presentes en el proceso biológico durante la experimentación, Se utilizaron tanto técnicas de análisis univariado como multivariado. Para validar las diferencias entre las condiciones de operación correspondientes a cada una de las corridas experimentales, se verificó que las muestras de cada condición experimental se encontraran bajo condiciones significativamente distintas de las otras condiciones de trabajo y que todas las muestras dentro de cada condición experimental fueran similares entre sí. Para ello se realizó un análisis discriminante canónico (Figura 5.1). Las variables seleccionadas fueron las impuestas para el proceso experimental: DQO del influente, N-NH<sub>3</sub> del influente, relación experimental C/N, SSV, pH y temperatura del reactor. Se realizaron las pruebas de significancia (Wilks' Lambda, Pillai's Trace, Hotelling-Lawley, Roy's Max Root)

#### 4.4.1 Desempeño del BRM

El desempeño del reactor se verificó en términos de materia orgánica (porcentaje de DQO removida), porcentaje de nitrógeno amoniacal removido y producción de biomasa (TRC y  $Y_{obs}$ ). Para el análisis de estos datos se utilizaron los promedios de las tres semanas que se mantuvo cada condición experimental ( $n=3$ ).

Para verificar el efecto de las variables: fuente de carbono del sustrato, la CO y su interacción, sobre el desempeño del reactor se realizó un análisis de varianza factorial ( $\alpha < 0.05$ ) y la prueba post-hoc de Tukey. Se verificó distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk ( $\alpha < 0.05$ ).

#### 4.4.2 Potencial degradativo

Para el análisis de los datos obtenidos de las ecoplacas, primeramente, se realizó una normalización de los datos como lo sugiere Garland (1999):

$$OD_{norm}(i, j, t) = \frac{OD(i, j, t)}{AWCD(j, t)}$$

Donde:

$OD_{norm}(i, j, t)$  = Densidad óptica normalizada del pocillo  $i$ , réplica  $j$ , en el tiempo  $t$

$OD(i, j, t)$  = Densidad óptica del pocillo  $i$ , de la réplica  $j$ , en el tiempo  $t$

$AWCD(j, t)$  = Desarrollo promedio del color de la réplica  $j$ , en el tiempo  $t$

El análisis del potencial degradativo global, representado por el AWCD de las ecoplacas, y la degradación de los grupos químicos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) factorial, si se encontraban diferencias significativas entre las medias se utilizaba, para determinar que medias son las que difieren, la prueba post-hoc de Tukey. El índice de Shannon se comparó mediante la prueba de  $t$  modificada por Hutcheson (Moreno *et al.*, 2011).

#### **4.4.3 Fuentes de carbono utilizadas**

Para evaluar los grupos químicos más utilizados, en cada momento por la comunidad del reactor y como auxiliar en el análisis exploratorio de datos se utilizó el análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en ingles: Principal Component Analysis) a las horas 40, 56 y 120 de incubación (Weber y Legge, 2010). Las hipótesis surgidas como consecuencia de los PCA se corroboraron mediante ANOVAs factoriales y pruebas de Tukey. Auxiliariamente se realizó un mapa de calor y un análisis comparativo mediante el índice de Bray-Curtis.

#### **4.4.4 Relación de las variables operacionales con el potencial degradativo**

Se trabajó con la hora 56 de incubación debido a que se encuentra dentro del tiempo de retención hidráulico del reactor, además de que cumple con los requisitos citados en estudios previos (Weber y Legge, 2010), mayor varianza y menor número de pocillos con absorbancia mayor a 2. Las variables operativas del reactor consideradas fueron: i) Nitrógeno amoniacal del efluente, ii) Carga orgánica, iii) Relación experimental C/N del influente, iv) Tiempo de retención celular y v) relación sólidos suspendidos volátiles, sólidos suspendidos totales (SSV/SST). El análisis se llevo a cabo mediante un análisis de correlación canónica (CCA por sus siglas en inglés: Canonical Correlation Analysis). Las tendencias mostradas en el CCA se verificaron univariadamente mediante un análisis de correlación lineal, Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software PAST 3 (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>).

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Biorreactor con membranas sumergidas

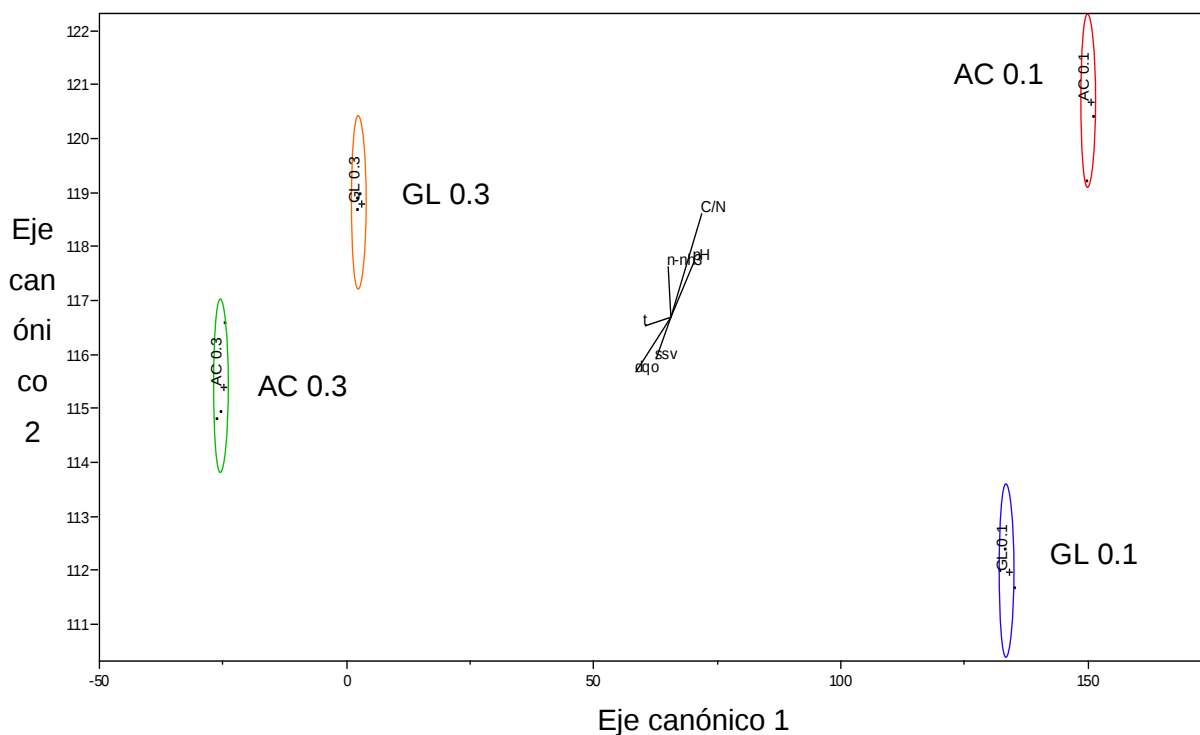
#### 5.1.1 Parámetros fisicoquímicos de control

Los parámetros fisicoquímicos pH, temperatura y oxígeno disuelto fueron controlados para eliminar las variaciones en el proceso experimental. Durante los periodos estables no se requirió corregir el pH. El comportamiento general del pH en la suspensión del reactor se mantuvo dentro del rango propuesto ( $7 \pm 0.5$ ). La temperatura se controló adecuadamente y se mantuvo dentro del rango propuesto ( $20 \pm 2$  °C) (**Tabla 5.1**). El OD se mantuvo en un valor superior a los  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante una aireación constante que garantizara tanto una correcta oxigenación, como la mezcla completa de la suspensión biológica, evitando además la colmatación excesiva de la membrana (Negra, 2015; Pérez, 2015; Rueda, 2014; Villalón, 2012).

**Tabla 5.1.** Comportamiento pH y temperatura (T) en cada una de las corridas experimentales (media  $\pm$  desviación estándar).

|               | pH $\pm$ SD        | T $\pm$ SD (°C)    |
|---------------|--------------------|--------------------|
| <b>AC 0.1</b> | 7.352 $\pm$ 0.0539 | 18.89 $\pm$ 0.0751 |
| <b>AC 0.3</b> | 6.977 $\pm$ 0.1179 | 18.54 $\pm$ 0.258  |
| <b>GL 0.1</b> | 7.064 $\pm$ 0.0719 | 18.53 $\pm$ 0.267  |
| <b>GL 0.3</b> | 7.192 $\pm$ 0.0427 | 18.28 $\pm$ 0.450  |

El análisis discriminante canónico reveló mediante las pruebas de significancia (Wilks' Lambda, Pillai's Trace, Hotelling-Lawley, Roy's Max Root) que todos los grupos son significativamente diferentes agrupados por condición experimental (Figura 5.1)

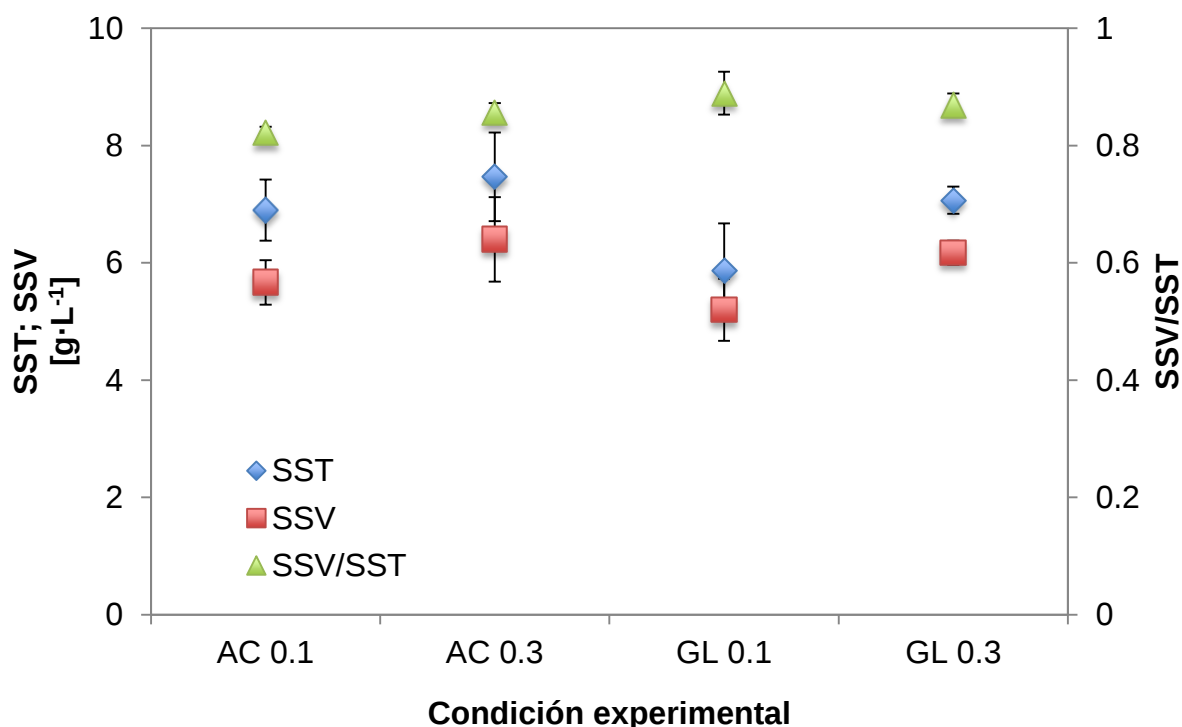


**Figura 5.1** Análisis discriminante canónico. Las muestras se agrupan correctamente por condición experimental.

### 5.1.2 Evolución de la Biomasa

El reactor comenzó con una concentración  $1.64 \text{ gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$  por lo cual fue necesario una etapa de crecimiento celular para llevar la concentración a parámetros típicos de este biorreactor ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Metcalf y Eddy, 2003). Le tomó al reactor alrededor de 50 días llegar a la concentración deseada. Una vez alcanzada esta concentración se mantuvo extrayendo lodo del biorreactor periódicamente. La relación SSV/SST

comenzó en 0.55 y fue incrementando hasta alcanzar relativa estabilidad en el día 50 de operación. En la condición experimental de alimentación con acetato a  $CO = 0.1 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  y  $CO = 0.3 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  la relación  $SSV/SST$  fue  $0.82 \pm 0.01$  y  $0.86 \pm 0.02$  respectivamente. La biomasa alimentada con glucosa como fuente de carbono a  $CO = 0.1 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  y  $CO = 0.3 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  tuvo relaciones de  $0.89 \pm 0.04$  y  $0.87 \pm 0.02$  respectivamente. Se encontró diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) debido al efecto del cambio de sustrato y no al cambio de carga orgánica ni a la interacción de estos factores. Esto se puede explicar por la mayor acumulación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS por sus siglas en inglés: Extracellular Polymeric Substances) (*i.e.* carbohidratos en este caso), acumuladas en los flóculos de la suspensión alimentada con glucosa, lo cual hace que se eleve la relación  $SSV/SST$  en la suspensión.



**Figura 5.2** Comportamiento de la biomasa a lo largo del tiempo de operación

Para mantener estable la concentración de SSV se purgó periódicamente lodo del reactor, lo que resultó en tiempos de retención celular relativamente altos para cada condición experimental (Tabla 5.2). Se obtuvo un coeficiente de rendimiento aparente ( $Y_{obs}$ ) para cada condición (Tabla 5.3). El menor rendimiento se obtuvo con el acetato como fuente de carbono con una CO de  $0.1 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  lo que indica que existe una menor cantidad de biomasa producida por la asimilación de la materia orgánica consumida (*i.e.* DQO). Jegantheesan *et al.* (2009) indican que el uso de cargas orgánicas bajas causa estrés en las bacterias, por lo cual su metabolismo se centra en la manutención y no en la síntesis anabólica.

No se encontraron diferencias significativas ( $\alpha > 0.05$ ) en cuanto a la  $Y_{obs}$ , mientras que para el TRC se encontró que influye significativamente la carga orgánica y no el tipo de sustrato, esto es atribuible a que ambos sustratos son de fácil asimilación para las bacterias y la carga orgánica mayor propiciará mayor producción celular que deriva en un tiempo de retención celular menor y del propio sustrato disponible para la síntesis de compuestos celulares, después de haber satisfecho los requerimientos básicos de mantenimiento energético de las bacterias, que son el principal grupo de microorganismos que presentes en la suspensión biológica.

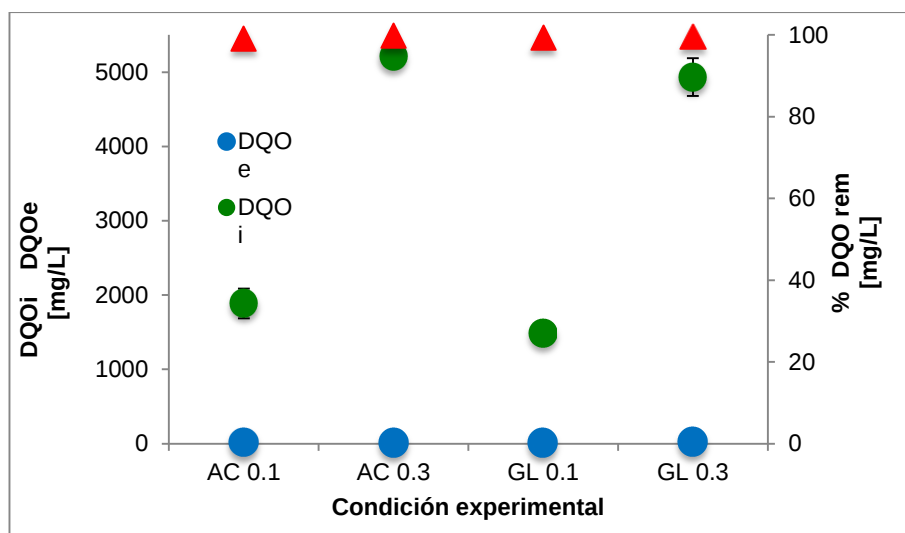
**Tabla 5.2** Tiempos de retención celular (TRC) y rendimiento observado ( $Y_{obs}$ ) durante el proceso experimental

| Condición experimental | TRC $\pm$ SD<br>(d) | $Y_{obs} \pm$ SD<br>(kgSSV/kgDQO) |
|------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| AC 0.1                 | 63.90 $\pm$ 26.03   | 0.1768 $\pm$ 0.0941               |
| AC 0.3                 | 24.73 $\pm$ 9.071   | 0.1797 $\pm$ 0.0843               |
| GL 0.1                 | 59.69 $\pm$ 38.41   | 0.2534 $\pm$ 0.1831               |
| GL 0.3                 | 11.95 $\pm$ 0.89    | 0.3647 $\pm$ 0.0401               |

### 5.1.3 Eficiencia del Bioreactor

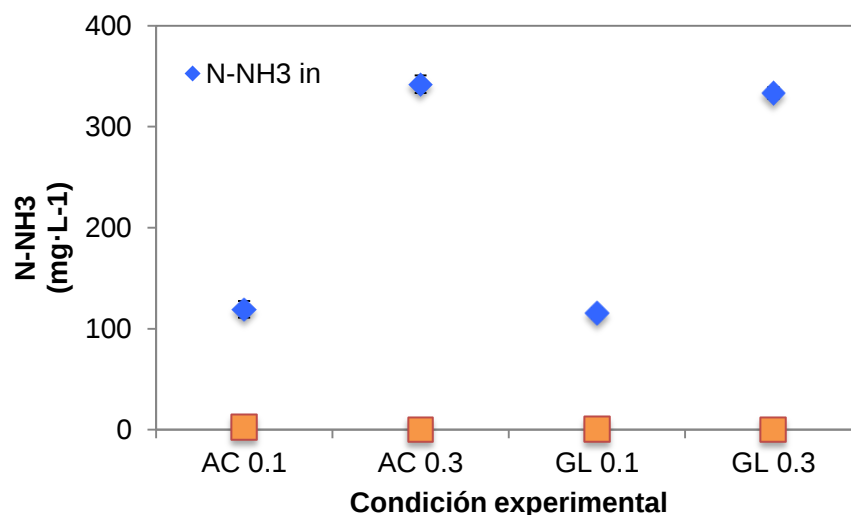
La eficiencia del reactor se evaluó en términos de la materia orgánica (DQO) removida, la oxidación de nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ) y la remoción de nitrógeno total. La remoción de DQO mantuvo valores estables por arriba del 98 % en las condiciones experimentales propuestas (Figura 5.3). Estas altas eficiencias de remoción se explican (i) por las características de los sustratos utilizados que son completamente solubles y fácilmente biodegradables; (ii) por las altas tasas de remoción que presentan los BRM asociados a las concentraciones de biomasa con las que son operados y (iii) por el proceso de separación por membranas, que además garantiza la calidad sanitaria del efluente tratado (Judd, 2008). Se han reportado tasas de remoción similares en otros BRM, con la ventaja de que mantienen altas eficiencias de remoción y una calidad del efluente estables aun cuando se ven sometidos a variaciones en las condiciones operacionales (e.g. CO) (Khan *et al.*, 2013; Hoinkis *et al.*, 2012). También se ha reportado estabilidad del proceso independientemente del cambio en las condiciones de operación que desencadenaron cambios en las poblaciones microbianas en su BRM (Gómez-Silván *et al.*, 2014; Rosenberger *et al.*, 2002). Este comportamiento de los BRM ha sido explicado por la redundancia funcional de los microorganismos que aseguran un funcionamiento estable del reactor, aun cuando las variaciones operacionales hayan cambiado la estructura microbiológica (Molina-Muñoz *et al.*, 2009; Miura *et al.*, 2007).

En este estudio, las variaciones observables en la remoción de DQO ocurrieron durante los periodos de estabilización, posteriores a cambios en el sustrato de alimentación, sin embargo el reactor recuperó rápidamente sus altas tasas de remoción. Pese a que siempre se obtuvo un porcentaje aceptable de remoción de DQO, se encontró un efecto significativo ( $\alpha < 0.05$ ) por el cambio de carga orgánica, sobre dicha remoción. El efecto del cambio de sustrato por sí solo no representa un cambio significativo en el porcentaje de remoción.



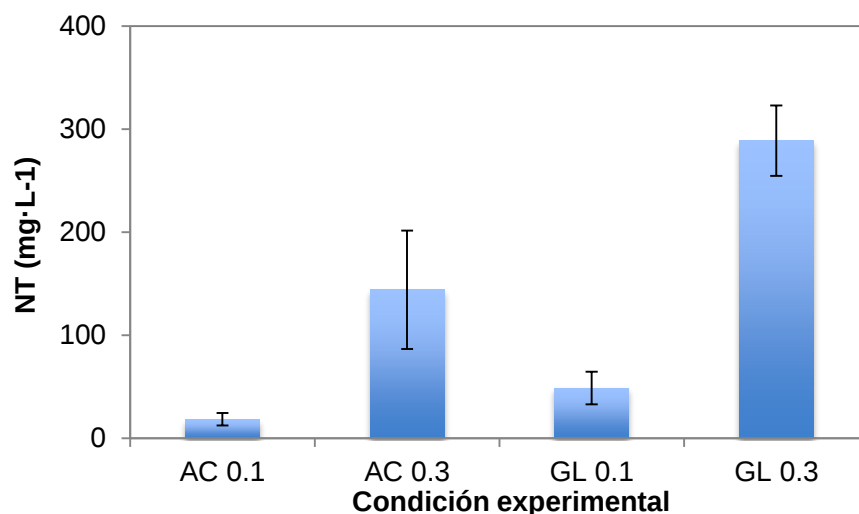
**Figura 5.3.** Concentraciones de influente y efluente del BRM, así como porcentaje de remoción en cada condición experimental de la DQO.

La remoción de nitrógeno amoniacal alcanzó valores superiores al 97 % debido a los altos tiempos de residencia celular (Hoinkis *et al.*, 2012; Judd, 2008; Metcalf y Eddy, 2003). Cuando el reactor fue alimentado con glucosa como fuente de carbono incluso se alcanzaron remociones de nitrógeno amoniacal superiores al 99 % (Figura 5.4). Debido a las condiciones de operación, el nitrógeno amoniacal fue removido por dos vías: (i) oxidación hasta nitratos por bacterias autótrofas o (ii) asimilado por las bacterias heterótrofas. Debido a que no había condiciones anóxicas que permitieran que hubiera desnitrificación en el reactor ( Reboleiro-Rivas *et al.*, 2015; Judd y Judd, 2008; Metcalf y Eddy, 2003).



**Figura 5.4** Comportamiento del Nitrógeno a lo largo del proceso experimental, N-NH3 in = nitrógeno amoniacal influente, N-NH3 ef = nitrógeno amoniacal del permeado, NTin= nitrógeno total dl influente y NT ef= nitrógeno total del permeado

Por otro lado, al analizar el nitrógeno total (Figura 5.5), las mayores remociones de nitrógeno total se alcanzan con las CO altas, que corresponden a los TRC más bajos. Cuando había mayor producción celular y menor TRC, consecuentemente se asimilaba más nitrógeno, que se requería para la formación de nuevo material celular.



**Figura 5.5** Remoción del nitrógeno total por asimilación

## 5.2 Análisis metabólico bacteriano

### 5.2.1 Potencial degradativo global

Para el análisis metabólico se tomaron en cuenta las muestras de cada semana (Anexo C), independientemente de que hubiera una estabilidad en términos de los parámetros de operación y de eficiencia de tratamiento en el reactor. Como ya se discutió previamente, la estabilidad en la eficiencia de remoción de contaminantes no garantiza que las poblaciones que integran la comunidad bacteriana de la suspensión biológica permanezcan sin cambio. La nomenclatura para diferenciar cada toma de muestra en las condiciones experimentales propuestas para cada semana se muestra en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3** Nomenclatura utilizada durante el proceso experimental. CO carga orgánica (0.1 y 0.3 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> respectivamente); AC = acetato, GL= glucosa; a, b y c corresponden consecutivamente a las 3 semanas de trabajo en cada condición estabilizada.

| Fuente<br>de<br>carbono | CO = 0.1<br>(kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) | CO = 0.3<br>(kgDQO·kgSSV <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Acetato                 | AC 01.a                                                   | AC 03.a                                                   |
|                         | AC 01.b                                                   | AC 03.b                                                   |
|                         | AC 01.c                                                   | AC 03.c                                                   |
| Glucosa                 | GL 0.1.a                                                  | GL 0.3.a                                                  |
|                         | GL 0.1.b                                                  | GL 0.3.b                                                  |
|                         | GL 0.1.c                                                  | GL 0.3.c                                                  |

El análisis de varianza (ANOVA) factorial (**Tabla 5.4**) muestra que el aumento significativo ( $\alpha < 0.05$ ) en el potencial degradativo de la suspensión (AWCD) se debe al cambio de sustrato y no al aumento de la carga orgánica o la interacción de estos dos factores. Posteriormente mediante pruebas de Tukey se determinó que el sustrato que tuvo glucosa como fuente de carbono mostró un mayor potencial degradativo para las fuentes de carbono de la placa. Para dar mayor validez a este resultado se realizó también un análisis del perfil cinético formado por el AWCD contra el tiempo de incubación.

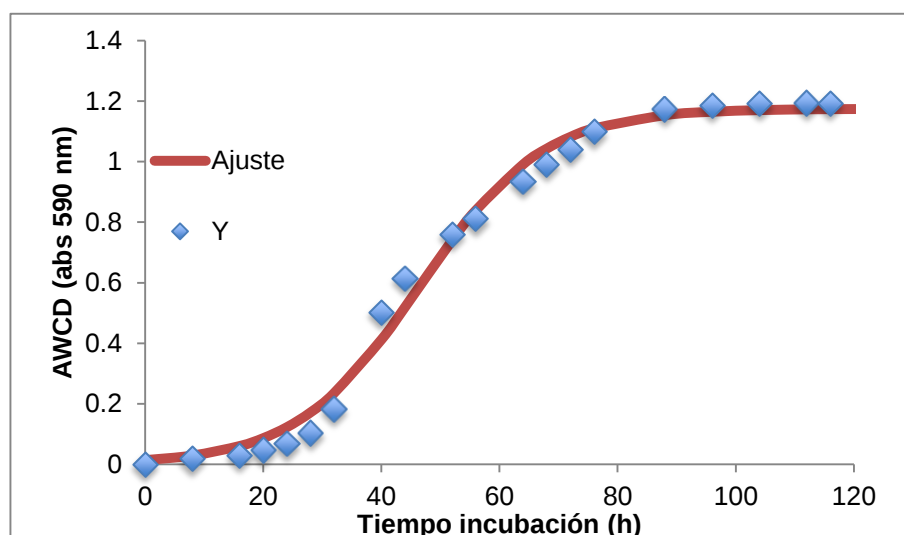
**Tabla 5.4** Análisis de varianza factorial para analizar los efectos de la CO, el tipo de sustrato y su interacción, con respecto al potencial degradativo global (AWCD) de la suspensión biológica.

| Term                       | Estimate  | Std Error | t Ratio | Prob> t |
|----------------------------|-----------|-----------|---------|---------|
| <b>Intercept</b>           | 1.2242245 | 0.020589  | 59.46   | <.0001* |
| <b>Sustrato[A]</b>         | -0.103552 | 0.020589  | -5.03   | <.0001* |
| <b>CO[0.1]</b>             | 0.0148965 | 0.020589  | 0.72    | 0.4748  |
| <b>Sustrato[A]*CO[0.1]</b> | -0.019521 | 0.020589  | -0.95   | 0.3504  |

- **Perfil cinético**

Las cinéticas AWCD contra tiempo de incubación de la placa se ajustaron ( $r^2 > 0.95$ ) a un modelo de crecimiento logístico que proporciona información independiente de la densidad del inóculo (Salomo *et al.*, 2009). En la Figura 5.6 se observa de manera ilustrativa una cinética ajustada al modelo, el resto de los ajustes se muestran en el Anexo D. Se obtuvieron tres parámetros cinéticos, i) la asíntota ( $K$ ), ésta se presenta en el valor máximo alcanzado del AWCD en cada cinética, por lo tanto corresponde a

la tasa de actividad metabólica más alta que se alcanza con base en la degradación de un sustrato y sirve como indicador del potencial degradativo que tiene la comunidad bacteriana del reactor ii) la tasa exponencial de cambio ( $p$ ) que nos va a indicar la rapidez a la que se puede adaptar una comunidad bacteriana a la degradación de un nuevo sustrato que llegue en el influente del reactor y iii) el tiempo al punto medio de la porción exponencial de la curva que estará asociado a la afinidad de la comunidad bacteriana para degradar un sustrato en específico cuando este está presente en el influente del reactor (Tabla 5.5. c.f. Anexo D).



**Figura 5.6** Ajuste de la Cinética AC 0.1 a al modelo de crecimiento logístico. Los cuadros azules indican los puntos experimentales y la línea roja el ajuste al modelo matemático

Estas variables se analizaron mediante técnicas multivariadas y univariadas. Se eliminó la muestra AC 0.1.c por corresponder a un valor atípico desde el punto de vista estadístico. El análisis de K mostró que es significativamente mayor ( $\alpha=0.05$ ) por efecto del cambio de sustrato, es decir la comunidad alimentada con glucosa mostró una capacidad de degradación mayor, esto coincide con el análisis del potencial degradativo (**Tabla 5.4**). Este aumento en el potencial degradativo es

atribuible a las diferencias estructurales de la fuente de carbono utilizada. El acetato, que es un sustrato más simple, entra directamente al ciclo de Krebs, mientras que la glucosa, con una estructura más compleja, requiere de una mayor variedad enzimática, ya que pasa primeramente por la ruta de la glucólisis.

La variable  $p$  mostró una respuesta significativa al efecto de la variación de la carga orgánica, siendo mayor la tasa de cambio cuando la CO es más elevada. Este comportamiento está vinculado al potencial degradativo de cada comunidad, aunque también debe estar asociado al TRC, ya que las bacterias al poseer más sustrato y TRC menores pueden tener una capacidad de adaptación más rápida derivada de los menores tiempos de duplicación celular. Por último, la variable  $S$  no mostró ningún cambio significativo al efecto del cambio de sustrato o de la carga orgánica ni a su interacción.

**Tabla 5.5** Constantes cinéticas.  $K$  = Asíntota de la curva,  $S$  = tiempo cunado  $y = 0.5$   $K$ ,  $p$  = tasa de cambio en la porción exponencial de la curva y  $R^2$  = coeficiente de correlación

| Condición experimental | $K$ (AWCD) $\pm$ SD | $p \pm$ SD        | $S$ (h) $\pm$ SD    | $R^2 \pm$ SD      |
|------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| <b>AC 0.1</b>          | 1.206 $\pm$ 0.244   | 0.073 $\pm$ 0.026 | 61.652 $\pm$ 19.152 | 0.993 $\pm$ 0.001 |
| <b>AC 0.3</b>          | 1.112 $\pm$ 0.075   | 0.092 $\pm$ 0.008 | 49.032 $\pm$ 3.083  | 0.994 $\pm$ 0.004 |
| <b>GL 0.1</b>          | 1.307 $\pm$ 0.095   | 0.102 $\pm$ 0.004 | 41.409 $\pm$ 2.403  | 0.981 $\pm$ 0.004 |
| <b>GL 0.3</b>          | 1.371 $\pm$ 0.084   | 0.074 $\pm$ 0.008 | 47.970 $\pm$ 4.078  | 0.974 $\pm$ 0.009 |

- **Diversidad metabólica**

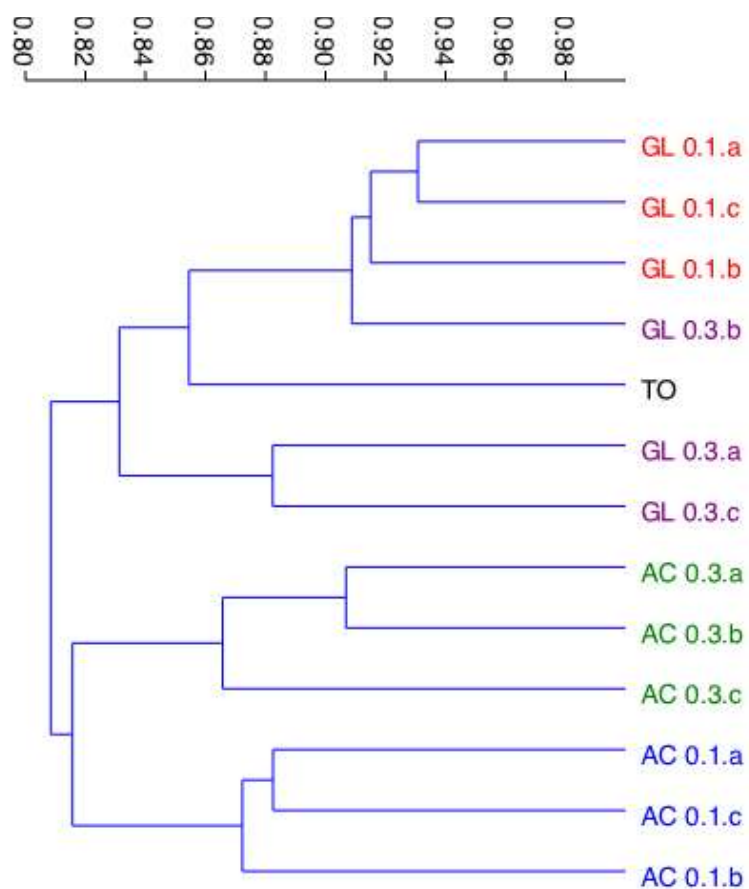
La diversidad metabólica, estimada mediante el índice de Shannon muestra que la diversidad crece con el paso de las horas de incubación de la placa debido a que se presentaban más pozos con desarrollo de color (Tabla 5.6). El índice de Shannon se comparó estadísticamente mediante la prueba modificada de t por Hutchenson y no se encontraron diferencias significativas entre las muestras. Aunque no hubo diferencias significativas el valor más alto se presentó en el inóculo a las 120 h. Este incremento en el índice de Shannon muestra que no obstante que las condiciones ambientales influyen en él, la suspensión biológica de un BRM tiene una rápida capacidad de adaptación ante un cambio de sustrato. Las 120 h en las que ya no hay diferencia del índice de Shannon corresponden al TRC con el que se desarrollan las bacterias heterótrofas responsables de degradar estos sustratos. Esto implica que con sólo un TRC ya se están degradando los sustratos de la placa, sin necesidad de un periodo de adaptación para el cambio de condiciones (*i.e.* fuente de carbono) del reactor a la placa.

Las condiciones adversas para el desarrollo microbiológico tienden a propiciar un valor menor del Índice de Shannon. Así, se ha documentado que el índice de Shannon para una comunidad presente en agua contaminada por fenol alcanzó sólo un valor de 1.46 a las 72 h de incubación de la placa (Chojniak *et al.*, 2015); también disminuye cuando la biomasa de una planta de tratamiento de agua residual es contaminada con metales pesados (Gryta *et al.*, 2014).

**Tabla 5.6** Índice de Shannon (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ) estimados con las placas incubadas con la biomasa del reactor de las diferentes condiciones experimentales

| Condición Experimental | Índice de Shannon |                  |                  |
|------------------------|-------------------|------------------|------------------|
|                        | 40 h              | 56 h             | 120 h            |
| <b>AC 0.1</b>          | 2.63 $\pm$ 0.194  | 2.81 $\pm$ 0.163 | 3.19 $\pm$ 0.072 |
| <b>AC 0.3</b>          | 2.88 $\pm$ 0.088  | 2.99 $\pm$ 0.034 | 3.20 $\pm$ 0.011 |
| <b>GL 0.1</b>          | 2.90 $\pm$ 0.116  | 3.06 $\pm$ 0.058 | 3.25 $\pm$ 0.022 |
| <b>GL 0.3</b>          | 2.77 $\pm$ 0.036  | 2.96 $\pm$ 0.062 | 3.19 $\pm$ 0.074 |

El agrupamiento hecho mediante el índice de Bray-Curtis (**Figura 5.7**) mostró que había una similitud general de alrededor del 80 % o mayor ( $r^2 = 0.638$ ), similitud alta que coincide con los valores similares de  $H'$  en todas las condiciones experimentales. Comportamientos similares se han descrito en la literatura, donde el potencial de degradación de fuentes de carbono varía poco entre muestras distintas del mismo reactor bajo diferentes condiciones. Esto es atribuible, entre otras variantes, a la redundancia funcional que presentan las poblaciones microbianas de los reactores biológicos de biomasa en suspensión (Hashimoto *et al.*, 2014; Miura *et al.*, 2007) y que resultaría aún más relevante por el estado de actividad de la biomasa, que al tener altas concentraciones de biomasa, permite que una parte de la esta se mantenga en estado de latencia en condiciones normales de operación en el reactor, pero se activa cuando hay presencia adicional de sustrato (Villalón, 2012). En este estudio se encontró una mayor diferenciación entre las comunidades alimentadas con acetato al variar la carga orgánica, lo que nos indica una mejor estabilidad funcional en estas condiciones que en las condiciones de alimentación por glucosa. Se ha reportado que la estabilidad y rendimiento técnico del BRM no implica necesariamente una comunidad microbiana estable (Gómez-Silván *et al.*, 2014).



**Figura 5.7** Dendrograma para los datos de absorbancia utilizando el índice de similitud de Bray-Cuirtis, (AC: acetato en azul CO = 0.1 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, en verde CO = 0.3 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; GL: Glucosa, en rojo CO = 0.1 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> y morado CO = 0.3 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)

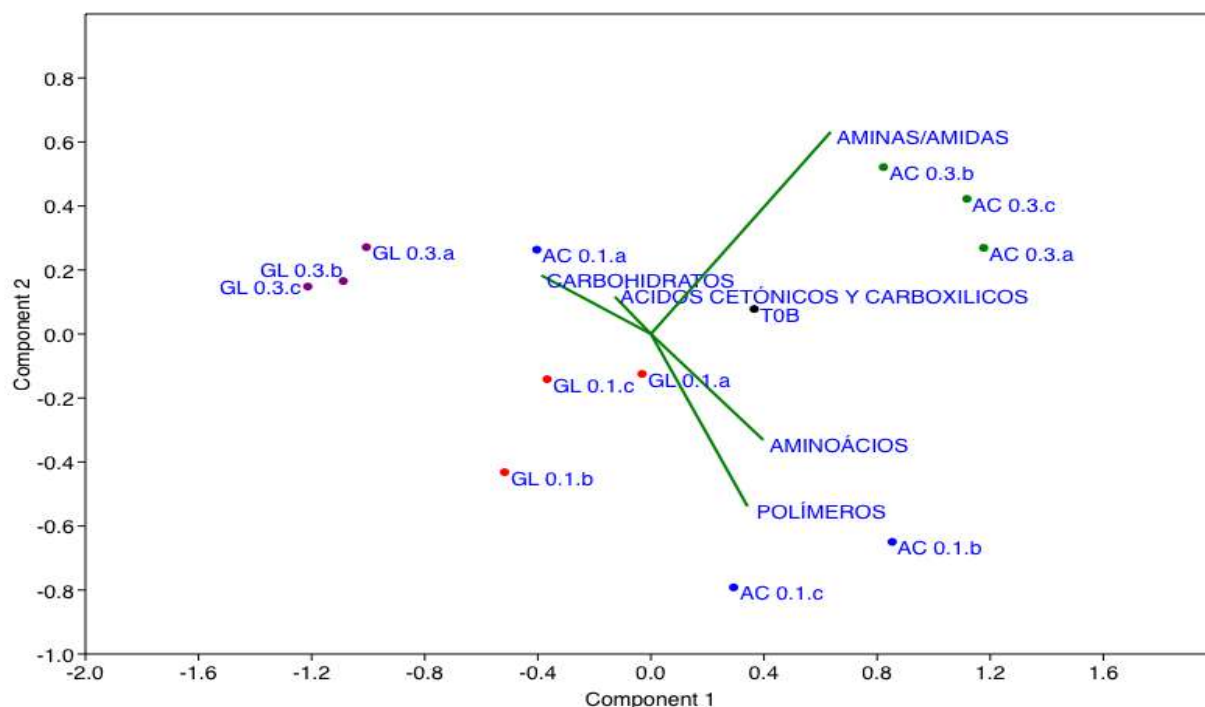
### 5.2.2 Fuentes de carbono utilizadas

- **Análisis a la hora 40 de incubación**

El PCA correspondiente a esta hora describe en el componente principal PC1 (eje x) el 76.359 % de la variación, el PC2 (eje y) el 17.906 % entre ambos aportan 94.265 % del total de la variación explicada del análisis. El PC1 representa en los valores positivos la degradación del grupo aminas/amidas y aminoácidos, mientras que, en el sentido negativo, los carbohidratos. La comunidad en los valores positivos del PC1 fue alimentada por acetato en el reactor, esta se inclinan en mayor medida por los compuestos nitrogenados, mientras que la comunidad en el sentido negativo correspondientes a la alimentada con glucosa en el reactor se inclina por carbohidratos y ácidos cetónicos y carboxílicos. El PC2 describe principalmente en el sentido positivo la degradación de aminas/amidas mientras que, en el sentido negativo la degradación de polímeros. La comunidad agrupada en el sentido positivo de este componente corresponden a la  $CO = 0.3 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  mientras que en el sentido negativo a la comunidad alimentadas a una  $CO = 0.1 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . La comunidad alimentada con CO baja degradaban polímeros y aminoácidos comparativamente mejor. Esto puede explicarse por el hecho de que el rompimiento del ion amonio de una amina es un proceso relativamente más simple que la despolimerización de los compuestos poliméricos de la placa, por otro lado la degradación completa de estos compuestos dependerá de la capacidad que tengan las bacterias presentes en la suspensión de sintetizar las enzimas necesarias para la degradación de los compuestos de la placa. Por tanto la comunidad presente en el reactor con las  $CO = 0.1 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , con mayor TRC puede tener mayor capacidad enzimática para la degradación de dichos polímeros. Sin embargo es importante señalar que la energía global necesaria para la degradación de los compuestos depende en gran medida de la síntesis enzimática de la comunidad y no sólo de la estructura de los compuestos a degradar.

En la hora 40 de incubación la comunidad del reactor alimentada con acetato como fuente de carbono se orienta hacia la degradación de polímeros, aminoácidos y aminas/amidas, mientras que la comunidad alimentada con glucosa se orienta hacia

la degradación de los carbohidratos (Figura 5.9). El ácido 2-hidroxibenzoico no es degradado por ninguna comunidad, dentro del grupo de las aminos/amidas hay mayor degradación por parte de la comunidad de acetato específicamente en la feniletilamina, dentro de los carbohidratos la D-xilosa y el i-eritritol son menormente degradados.



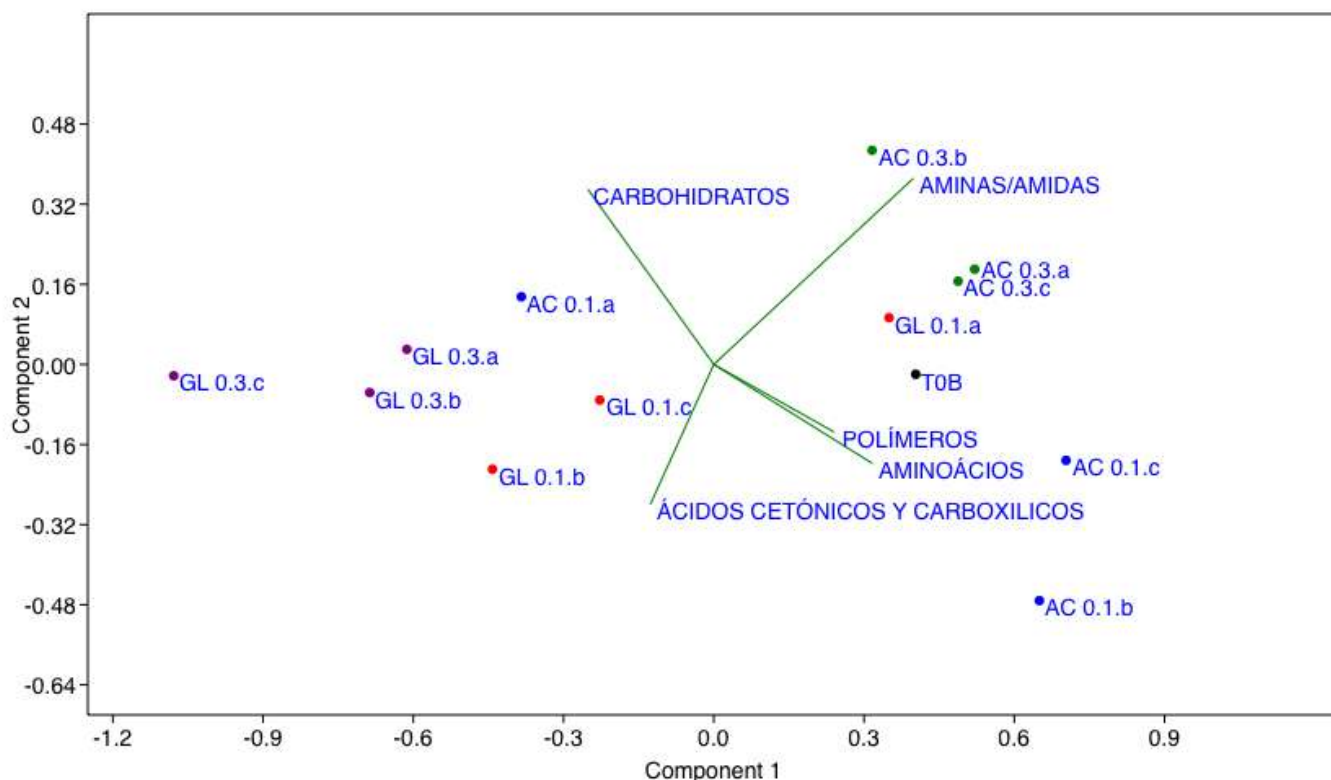
**Figura 5.8** PCA a la hora 40 de incubación de las placas (AC: acetato, en azul CO = 0.1 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, en verde CO = 0.3 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; GL: Glucosa, en rojo CO = 0.1 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> y en morado CO = 0.3 kgDQO·kgSSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)

#### • Hora 56 de incubación

El PCA correspondiente a esta hora describe en el componente principal PC1 (eje x) el 80.524 % de la variación, el PC2 (eje y) el 11.204 % entre ambos aportan 91.728 % del total de la variación explicada del análisis. El PC1 representa en los valores positivos la degradación del grupo aminos/amidas y aminoácidos, mientras que, en el sentido negativo, los carbohidratos. La comunidad en los valores positivos del PC1 fue alimentada por acetato en el reactor, se orienta en mayor medida por la

degradación de los compuestos nitrogenados, mientras que la comunidad en el sentido negativo correspondiente a las alimentada con glucosa en el reactor se orienta hacia la degradación de carbohidratos y ácidos cetónicos y carboxílicos. El PC2 describe principalmente en el sentido positivo la degradación de aminos/amidas y carbohidratos, mientras que, en el sentido negativo la degradación de ácidos cetónicos y carboxílicos en mayor medida. La comunidad agrupadas en el sentido positivo de este componente corresponden a la  $CO = 0.3 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  mientras que en el sentido negativo a la comunidad alimentadas a una  $CO = 0.1 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , la comunidad alimentada con CO alta degradaba aminos/amidas y carbohidratos comparativamente mejor.

En la hora 56, la comunidad del reactor alimenta con acetato como fuente de carbono se inclinan hacia la degradación de polímeros, aminoácidos y aminos/amidas, mientras que la comunidad alimentada con glucosa se inclina hacia la degradación de los carbohidratos Figura 5.9. El ácido 2-hidroxibenzoico prácticamente no es degradado; la D-xilosa muestra degradación por la comunidad alimentada con glucosa, dentro del grupo de aminoácidos el ácido glicil-L-glutámico y la L-treonina son degradados en menor proporción.



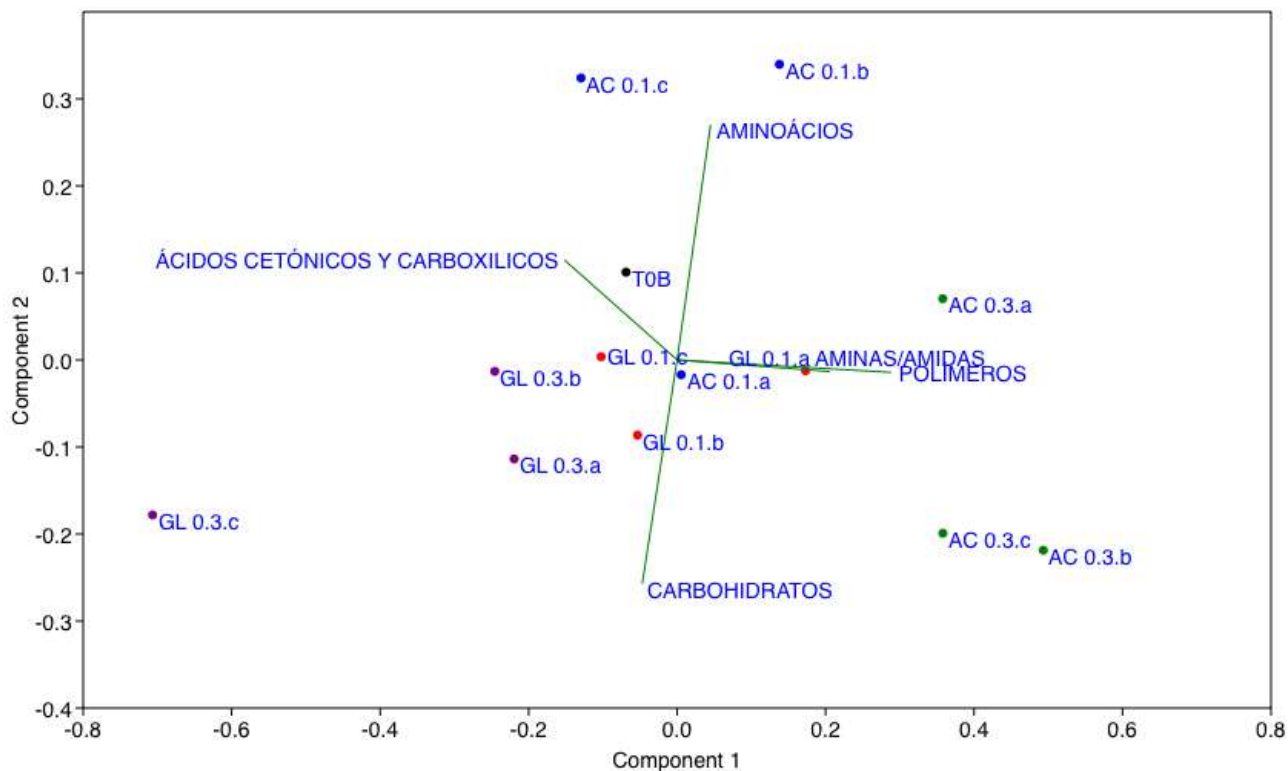
**Figura 5.9** PCA a la hora 56 de incubación placas En azul las muestras de la comunidad alimentada con acetato CO = 0.1, Verde acetato CO = 0.3, rojo glucosa CO = 0.1 y morado glucosa CO = 0.3

- **Hora 120 de incubación**

El PCA correspondiente a esta hora describe en el componente principal PC1 (eje x) el 76.333 % de la variación, el PC2 (eje y) el 19.46 % entre ambos aportan 95.793 % del total de la variación explicada del análisis. El PC1 representa en los valores positivos la degradación del grupo polímeros, principalmente, mientras que, en el sentido negativo, los ácidos cetónicos y carboxílicos. La comunidad en los valores positivos del PC1 corresponden a la alimentada con acetato en el reactor, es decir se inclinan en mayor medida por los polímeros, mientras que la comunidad en el sentido negativo correspondientes a la alimentada con glucosa se inclinan por ácidos cetónicos y carboxílicos. El PC2 describe en el sentido positivo la degradación de aminoácidos, mientras que, en el sentido negativo, la degradación de carbohidratos en mayor medida. La comunidad agrupada en el sentido positivo con respecto a este

componente corresponden a la  $CO = 0.1 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  degrada comparativamente mejor los aminoácidos, mientras que en el sentido negativo a la comunidad alimentada a una  $CO = 0.3 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , la comunidad alimentada con CO alta degradaban carbohidratos comparativamente mejor.

En la hora 120 se observó que la comunidad del reactor alimentada con acetato como fuente de carbono se orientan hacia la degradación de Polímeros, Aminoácidos y aminas/amidas, mientras que la comunidad alimentada con glucosa se orienta hacia la degradación de los carbohidratos. El ácido 2-hidroxibenzoico no fue degradado; dentro de los aminoácidos el ácido glicil-L-glutámico y la L-treonina prácticamente no muestran degradación; dentro de los carbohidratos el D,L-a-glicerol fosfato no fue degradado y; dentro del grupo de aminas/amidas la feniletilamina fue principalmente degradada por la comunidad alimentada con acetato. Los polímeros que hasta la hora 56 eran mayormente degradados por la comunidad AC 0.1, finalmente fue mayormente degradado por la comunidad AC 0.3, debido a que la fase exponencial de crecimiento se presentó en diferentes tiempos, estabilizándose primeramente en AC 0.1 y posteriormente en AC 0.3.

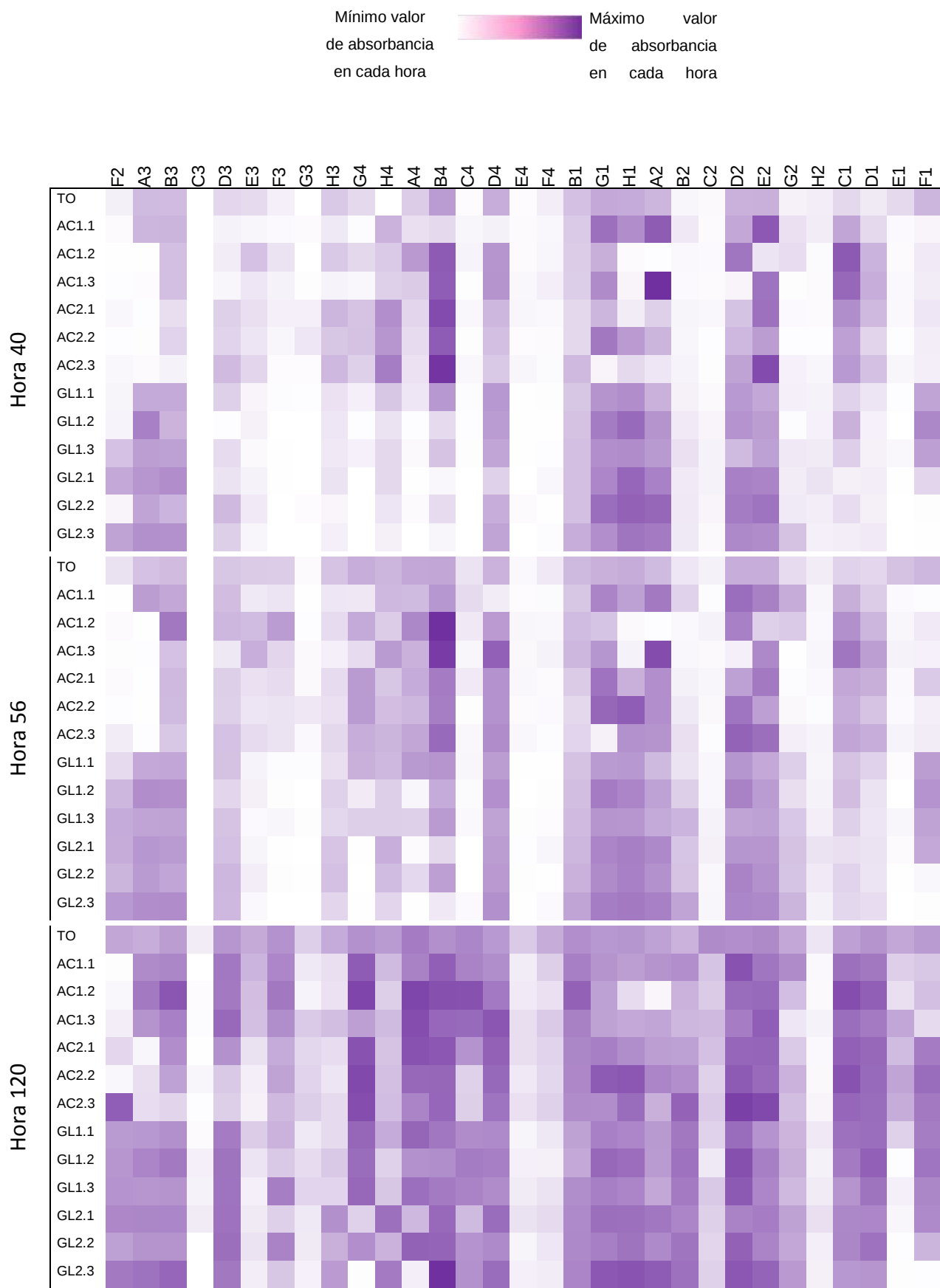


**Figura 5.10** PCA a la hora 120 de incubación En azul las muestras de la comunidad alimentada con ácido acetato CO = 0.1, Verde acetato CO = 0.3, rojo glucosa CO = 0.1 y morado glucosa CO = 0.3

De manera general se presentó una degradación similar a lo largo de las diferentes horas, esta tendencia se verificó mediante análisis estadísticos (ANOVA y pruebas de Tukey ( $\alpha < 0.05$ )) y no fue significativamente similar. Esto se debe al comportamiento del metabolismo bacteriano, ya que en cada pocillo siguen sus propias cinéticas de degradación y la fase exponencial se alcanza en cada una a diferentes horas, lo que provoca diferencias significativas en las degradaciones a lo largo de las diferentes horas.

El grupo de ácidos cetónicos y carboxílicos presentaron a la hora 120 degradación significativamente menor ( $\alpha < 0.05$ ) que el resto de los grupos bajo las condiciones impuestas en este estudio. Hashimoto *et al.* (2014) reportaron que las comunidades de lodos activados no degradan efectivamente los ácidos carboxílicos, partiendo de un lodo con condiciones similares a las de este estudio provenientes de

una planta de tratamiento de agua residual municipal. Button *et al.* (2015) reportaron baja utilización de este mismo grupo en las capas superficiales de un humedal tratando agua residual municipal.



**Figura 5.11** Mapa de calor para la degradación individual por pocillo de la BIOLOG® Ecoplate™

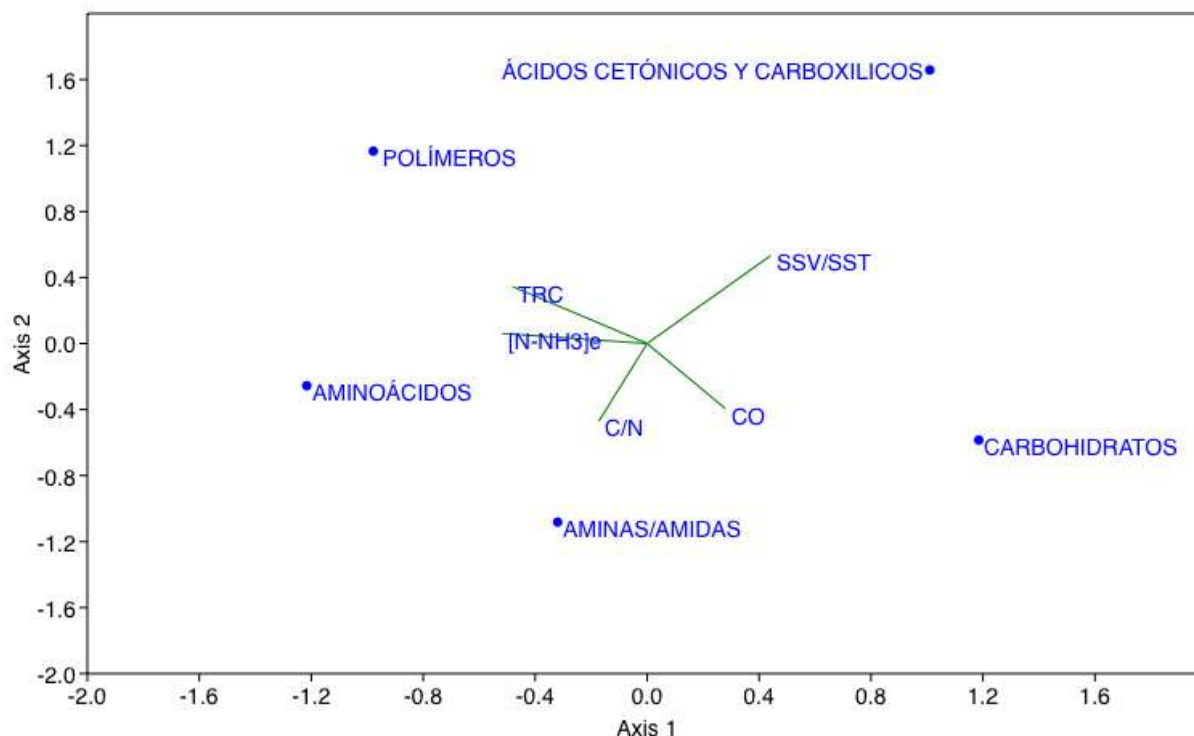
### 5.2.3 Relación de las variables operativas del reactor con el potencial degradativo

Todos los grupos químicos (carbohidratos, polímeros, ácidos cetónicos y carboxílicos, aminoácidos y aminos/amidas) variaron significativamente por efecto del cambio de sustrato de alimentación al reactor (Tabla 5.7). Los carbohidratos y ácidos cetónicos y carboxílicos fueron mejor degradados por la comunidad alimentada con glucosa. El cambio de CO tuvo una influencia significativa sobre la degradación de carbohidratos, polímeros y aminoácidos. Los polímeros y aminoácidos tuvieron mejor degradación con  $CO = 0.1 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , mientras que los carbohidratos con la  $CO=0.3 \text{ kgDQO} \cdot \text{kgSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ .

**Tabla 5.7** Resumen de los valores p resultado del ANOVA factorial

| Grupo                        | Sustrato | CO      | Interacción |
|------------------------------|----------|---------|-------------|
| Carbohidratos                | 0.0017*  | 0.0044* | 0.4796      |
| Ac. Cetónicos y carboxílicos | <0.0001* | 0.3678  | 0.0002*     |
| Polímeros                    | 0.0002*  | 0.0005* | 0.0023*     |
| Aminoácidos                  | <0.0001* | 0.0286* | 0.3955      |
| Aminas/amidas                | 0.0003*  | 0.8749  | 0.0088*     |

En el análisis de correlación canónica el eje 1 (eje x) describe 77.36% de la variación total y el eje 2 (eje y) el 18.05%, ambos suman 95.41 % de la variación explicada. Se encontró relación entre el TRC del BRM y la degradación de los polímeros, la relación C/N afecta la degradación de las Aminos/amidas, la concentración de nitrógeno amoniacal en el efluente está relacionada con la degradación de aminoácidos, La relación SSV/SST favorece la degradación de los ácidos cetónicos y carboxílicos y, finalmente, la CO afecta la degradación de los carbohidratos.



**Figura 5.12** Correlación canónica entre las variables de operación del BRM y los sustratos degradados ordenados por grupos.

No obstante que las relaciones entre variables verificadas univariadamente no resultaron estadísticamente significativas, sí hay una tendencia entre los parámetros de operación del BRM y el potencial de degradación de los diferentes grupos de sustratos.

La variación de la CO bajo las condiciones experimentales propuestas afecta principalmente la degradación de los carbohidratos. Esta relación puede explicarse por el hecho de que al incrementar la CO hay mayor cantidad de biomasa activa y en crecimiento, que potencialmente puede degradar más sustrato, pero particularmente comunidad que era alimentada con glucosa, que es un carbohidrato en el BRM, naturalmente pudieron degradar más fácilmente los carbohidratos de la placa. La degradación de polímeros está relacionada con el TRC. Una de las ventajas de los BRM es que sus TRC altos permiten el desarrollo de microfauna capaz de degradar

compuestos complejos (Judd, 2008; Metcalf Eddy, 2003) y ésta diversidad de microfauna también estaría asociada al potencial de síntesis enzimática, que está directamente vinculado a la despolimerización y degradación de los polímeros.

La relación C/N que se ha reportado como unas de las principales variables que influyen sobre la estructura y dinámica bacteriana del reactor (Gómez-Silván *et al.*, 2014), tuvo influencia sobre la degradación de aminas/amidas. Esta variable fue mayor durante la alimentación con acetato y fue cuando se presentó una degradación de aminas/amidas.

La biodiversidad en las plantas de tratamiento de aguas residuales se desarrollará dinámicamente y no necesariamente predeciblemente, en función de las condiciones de operación. Sin embargo Morgenroth, (2010) demostró que es la diversidad funcional, más que la biodiversidad general, lo que está asociado con la flexibilidad del sistema.

## 6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Validación de hipótesis

Ho: El potencial degradativo de la comunidad bacteriana de un BRM, alimentado con dos efluentes completamente solubles y fácilmente biodegradables aumentará al incrementar la carga orgánica de operación, independientemente de la composición del efluente a tratar.

La hipótesis nula se rechaza: El potencial degradativo de la comunidad bacteriana de un BRM alimentado con dos efluentes completamente solubles y fácilmente biodegradables, no aumentó con el incremento de la carga orgánica y si hubo diferencia en el potencial degradativo de la comunidad bacteriana al cambiar el efluente a tratar.

### 6.2 Conclusiones

- La carga orgánica de operación del BRM, a pesar de no influir globamente en el potencial degradativo de la biomasa, sí ocasiona cambios metabólicos que afectan la degradación de algunos grupos químicos específicos de sus sustratos
- El impacto sobre el comportamiento metabólico de la comunidad está influenciado en mayor medida por el tipo de efluente que trata el biorreactor.
- Aún cuando la estructura microbiológica del BRM cambie, el reactor mantiene altas tasas tanto de remoción de materia orgánica, como de nitrificación, debido a que se presenta redundancia funcional.
- Los coeficientes de rendimiento de la biomasa no cambiaron significativamente cuando hubo cambios en el efluente a tratar, debido a que Las cargas orgánicas bajas, características de este tipo de biorreactor, propician que el metabolismo bacteriano se centre en su mantenimiento y no en la duplicación celular.

### **6.3 Recomendaciones generales**

Los resultados obtenidos se pueden tomar como un punto de partida para comprender cómo las variables operacionales afectan la remoción de contaminantes específicos. Aún hace falta llevar a cabo la investigación sobre variables operacionales específicas, como el TRC, C/N, y SSV para verificar si presentan correlación con la degradación de grupos químicos de contaminantes.

Se recomienda realizar un estudio a una escala real y con mayores tiempos de operación, para complementar el análisis de la respuesta de la comunidad bacteriana.

La comunidad bacteriana mostró una adaptación específica a la composición del efluente a tratar, por lo tanto, se recomienda hacer estudios con efluentes de composición más compleja y diversa, para corroborar las tendencias de respuesta mostradas en este estudio.

## 7 REFERENCIAS

- Albrecht, R., Périssol, C., Ruaudel, F., Petit, J. L. y Terrom, G. (2010). Functional changes in culturable microbial communities during a co-composting process: Carbon source utilization and co-metabolism. *Waste Management*, 30(5), 764–770. <http://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.12.008>
- Bartha, R., y Atlas, R. M. (2001). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. (P. Educación, Ed.) (4th ed.). Madrid.
- Braun, B., Böckelmann, U., Grohmann, E. y Szewzyk, U. (2010). Bacterial soil communities affected by water-repellency. *Geoderma*, 158(3–4), 343–351. <http://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.06.001>
- Button, M., Nivala, J., Weber, K. P., Aubron, T. y Müller, R. A. (2015). Microbial community metabolic function in subsurface flow constructed wetlands of different designs. *Ecological Engineering*, 80, 162–171. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.073>
- Button, M., Weber, K., Nivala, J., Aubron, T. y Müller, R. A. (2016). Community-Level Physiological Profiling of Microbial Communities in Constructed Wetlands: Effects of Sample Preparation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(5), 960–973. <http://doi.org/10.1007/s12010-015-1921-7>
- CENTA. (2008). Manual de depuración de aguas residuales urbanas. *Centa, Secretariado de Alianza Por El Agua, Ecología Y Desarrollo.*, 264. <http://doi.org/Z-2802/08>

- Chojniak, J., Wasilkowski, D., Płaza, G., Mrozik, A. y Brigmon, R. (2015). Application of Biolog Microarrays Techniques for Characterization of Functional Diversity of Microbial Community in Phenolic-contaminated Water, *9*(3), 785–794.
- Dias, F. F. y Bhat, J. V. (1965). Microbial Ecology of Activated Sludge. *Applied Microbiology*, *13*(2), 257–261.
- Field, R. (2010). Fundamentals of Fouling. *Membrane Technology*, *4*, 1–23.  
<http://doi.org/10.1002/9783527631407.ch1>
- Garland, J. A. Y. L. y Mills, A. L. (1991). Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization, *57*(8), 2351–2359.
- Gómez-Silván, C., Arévalo, J., González-López, J. y Rodelas, B. (2014). Exploring the links between population dynamics of total and active bacteria and the variables influencing a full-scale membrane bioreactor (MBR). *Bioresource Technology*, *162*, 103–114. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.122>
- Greenberg, A. E., y Eaton, A. D. (eds). (1999). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- Gryta, A., Frąc, M. y Oszust, K. (2014). The Application of the Biolog EcoPlate Approach in Ecotoxicological Evaluation of Dairy Sewage Sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *174*(4), 1434–1443.  
<http://doi.org/10.1007/s12010-014-1131-8>
- Haandel, A. C. van y Lubbe, J. G. M. van der. (2012). *Handbook of Biological Wastewater Treatment: Design and Optimisation of Activated Sludge Systems*.

Retrieved

from

[https://books.google.co.uk/books/about/Handbook\\_of\\_Biological\\_Wastewater\\_Treatment.html?id=RBLA8y6GGAMCypgis=1](https://books.google.co.uk/books/about/Handbook_of_Biological_Wastewater_Treatment.html?id=RBLA8y6GGAMCypgis=1)

- Hashimoto, K., Matsuda, M., Inoue, D. y Ike, M. (2014). Bacterial community dynamics in a full-scale municipal wastewater treatment plant employing conventional activated sludge process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 64–71. <http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.008>
- Hoinkis, J., Deowan, S. a., Panten, V., Figoli, A., Huang, R. R. y Drioli, E. (2012). Membrane Bioreactor (MBR) Technology – a Promising Approach for Industrial Water Reuse. *Procedia Engineering*, 33(2009), 234–241. <http://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1199>
- Huang, L. y Lee, D.-J. (2015). Membrane bioreactor: A mini review on recent Ryamp;D works. *Bioresource Technology*, 194(July), 383–388. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.013>
- Jegantheesan, V., Shu, L. y Vasanathan, C. (2009). Application of Membrane Bioreactors for Water Reuse. *Asian Institud of Technology*.
- Ju, F. y Zhang, T. (2015). Bacterial assembly and temporal dynamics in activated sludge of a full-scale municipal wastewater treatment plant, 9(3), 683–695. <http://doi.org/10.1038/ismej.2014.162>
- Judd, S. y Judd, C. (2008). *The MBR book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment*. Elsevier (First edit). <http://doi.org/10.1016/B978-185617481-7/50005-2>

- Kang, G. y Cao, Y. (2014). Application and modification of poly(vinylidene fluoride) (PVDF) membranes – A review. *Journal of Membrane Science*, 463, 145–165. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.03.055>
- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular*. (2011 McGraw-Hill Interamericana de España S.L., Ed.). Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=HKaHBwAAQBAJydq=biologia+celular+y+molecular+karpyhl=esysa=Xysqi=2ypjf=1yved=0ahUKEwi\\_qa-1p4TVAhXox4MKHZeaATYQ6wEIJDAA](https://books.google.com.mx/books?id=HKaHBwAAQBAJydq=biologia+celular+y+molecular+karpyhl=esysa=Xysqi=2ypjf=1yved=0ahUKEwi_qa-1p4TVAhXox4MKHZeaATYQ6wEIJDAA)
- Khan, S. J., Parveen, F., Ahmad, A., Hashmi, I. y Hankins, N. (2013). Performance evaluation and bacterial characterization of membrane bioreactors. *Bioresource Technology*, 141, 2–7. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.140>
- Li, H., Tan, L., Ning, S. y He, M. (2015). Reactor performance and microbial community dynamics during aerobic degradation and detoxification of Acid Red B with activated sludge bioaugmented by a yeast *Candida tropicalis* TL-F1 in MBR. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 104, 149–156. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.006>
- Li, J., Li, Y., Ohandja, D. G., Yang, F., Wong, F. S. y Chua, H. C. (2008). Impact of filamentous bacteria on properties of activated sludge and membrane-fouling rate in a submerged MBR. *Separation and Purification Technology*, 59(3), 238–243. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.06.011>
- M<sup>a</sup> Mercè Vilaseca Vallvè. (2001). Observación Microscópica De Fangos Activados En Los Tratamientos De Depuración Biológica. *Boletín Intexter (U.P.C.)*, 119,

67–72.

- Metcalf, E. y Eddy, H. (2003). *Wastewater engineering: treatment and reuse. Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse. Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (eds). Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 4th edition. New Delhi, India (Fourth). New York: Mc Graw-Hill Higher Education.*  
[http://doi.org/10.1016/0309-1708\(80\)90067-6](http://doi.org/10.1016/0309-1708(80)90067-6)
- Mihelcic, J. y Zimmerman, J. (2011). *Environmental Engineering: Fundamentals, Sustainability, Design* (1st Editio).
- Miura, Y., Hiraiwa, M. N., Ito, T., Itonaga, T., Watanabe, Y. y Okabe, S. (2007). Bacterial community structures in MBRs treating municipal wastewater: Relationship between community stability and reactor performance. *Water Research*, 41(3), 627–637. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.005>
- Molina-Muñoz, M., Poyatos, J. M., Sánchez-Peinado, M., Hontoria, E., González-López, J. y Rodelas, B. (2009). Microbial community structure and dynamics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor aerobically treating domestic wastewater under real operation conditions. *Science of The Total Environment*, 407(13), 3994–4003. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.03.024>
- Moreno, C. E., Barragán, F., Pineda, E. y Pavón, N. P. (2011). Reanálisis de la diversidad alfa: Alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4), 1249–1261. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Morgenroth, E. (2010). Functional diversity in wastewater treatment, (August), 15–17.

- Neoh, C. H., Noor, Z. Z., Mutamim, N. S. A. y Lim, C. K. (2016). Green technology in wastewater treatment technologies: Integration of membrane bioreactor with various wastewater treatment systems. *Chemical Engineering Journal*, 283, 582–594. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.060>
- Qiu, G., Song, Y.-H., Zeng, P., Duan, L. y Xiao, S. (2013). Characterization of bacterial communities in hybrid upflow anaerobic sludge blanket (UASB)-membrane bioreactor (MBR) process for berberine antibiotic wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 142, 52–62. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.077>
- Quist-Jensen, C. A., Macedonio, F. y Drioli, E. (2015). Membrane technology for water production in agriculture: Desalination and wastewater reuse. *Desalination*, 364, 17–32. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2015.03.001>
- Reboleiro-Rivas, P., Martín-Pascual, J., Juárez-Jiménez, B., Poyatos, J. M., Vílchez-Vargas, R., Vlaeminck, S. E., González-López, J. (2015). Nitrogen removal in a moving bed membrane bioreactor for municipal sewage treatment: Community differentiation in attached biofilm and suspended biomass. *Chemical Engineering Journal*, 277, 209–218. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.141>
- Rosenberger, S., Krüger, U., Witzig, R., Manz, W., Szewzyk, U. y Kraume, M. (2002). Microbiological aspects of a biorreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal wastewater. *Water Research*, 36(2), 413–420. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00223-8](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00223-8)
- Salomo, S., Münch, C. y Röske, I. (2009). Evaluation of the metabolic diversity of

microbial communities in four different filter layers of a constructed wetland with vertical flow by Biolog analysis. *Water Research*, 43(18), 4569–4578. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.009>

Stamper, D. M., Walch, M. y Jacobs, R. N. (2003). Bacterial population changes in a membrane bioreactor for graywater treatment monitored by denaturing gradient gel electrophoretic analysis of 16S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 852. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.2.852>

Tang, B., Zhang, Z., Chen, X., Bin, L., Huang, S., Fu, F., Chen, C. (2014). Biodiversity and succession of microbial community in a multi-habitat membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 164, 354–361. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.007>

Tomotani, E. J. y Vitolo, M. (2007). Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1020–1025. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.039>

Wan, C. Y., De Wever, H., Diels, L., Thoeye, C., Liang, J. Bin y Huang, L. N. (2011). Biodiversity and population dynamics of microorganisms in a full-scale membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Research*, 45(3), 1129–1138. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.008>

Wang, Z., Ma, J., Tang, C. Y., Kimura, K., Wang, Q. y Han, X. (2014). Membrane cleaning in membrane bioreactors: A review. *Journal of Membrane Science*, 468, 276–307. <http://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.05.060>

- Weber, K. P., y Legge, R. L. (2010). Bioremediation, 599, 263–281.  
<http://doi.org/10.1007/978-1-60761-439-5>
- Zamora, A. (2012). Revisión análisis funcional de microorganismos: un estimador de diversidad y estructura comunitaria Microbial Functional Analysis : A estimator of community structure and diversity, 32(1), 57–86.
- Zhang, T., Shao, M. y Ye, L. (2012). 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal*, 6(6), 1137–1147. <http://doi.org/10.1038/ismej.2011.188>

## 8 ANEXOS:

### A. Metabolismo bacteriano

En este apartado se describen las rutas metabólicas comunes (glucólisis y ciclo del ácido cítrico) para los distintos tipos de compuestos químicos. Los compuestos químicos que no entran directamente en estas rutas son transformados a intermediarios o metabolitos comunes que pueden participar en la glucólisis o el ciclo del ácido cítrico (Conocido como ciclo de Krebs es el “centro del metabolismo” (VOET). Es la vía de oxidación de la mayor parte de carbohidratos y aminoácidos)

#### Carbohidratos

La principal ruta de degradación de los carbohidratos es la glucólisis, los carbohidratos entran en la glucólisis después de ser transformados en uno de los intermediarios glucolíticos.

#### Polímeros

Son degradados a monómeros de glucosa o en monómeros que pueden ser transformados a uno de los intermediarios de la glucólisis o el ciclo del ácido cítrico.

**Las dextrinas** son hidrolizadas hasta monómeros de glucosa. **El glucógeno** en una forma polimérica de la glucosa que se transforma en unidades de glucosa 6 fosfato para la glucólisis.

## Glucólisis

En la glucólisis se degrada una molécula de glucosa en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, dando dos moléculas de piruvato. El piruvato resultante es convertido, fuera de la ruta de la glucólisis, en acetil-CoA por actividad enzimática con pérdida de su grupo carboxilo en forma de  $\text{CO}_2$ , dando el grupo acetilo del acetil-coenzima A, que es oxidado de manera completa a  $\text{CO}_2$  por el ciclo del ácido cítrico. Se realiza en dos fases.

**Fase 1:** preparatoria, en la que la glucosa es fosforilada y fragmentada para dar lugar a dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato. Este proceso consume 2 ATPs, por lo cual se considera una inversión energética.

**Fase 2:** Las dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato se convierten en piruvato con la producción de cuatro ATPs. Por consiguiente, el rendimiento neto de la glucólisis es de dos ATPs por molécula de glucosa: la reacción global

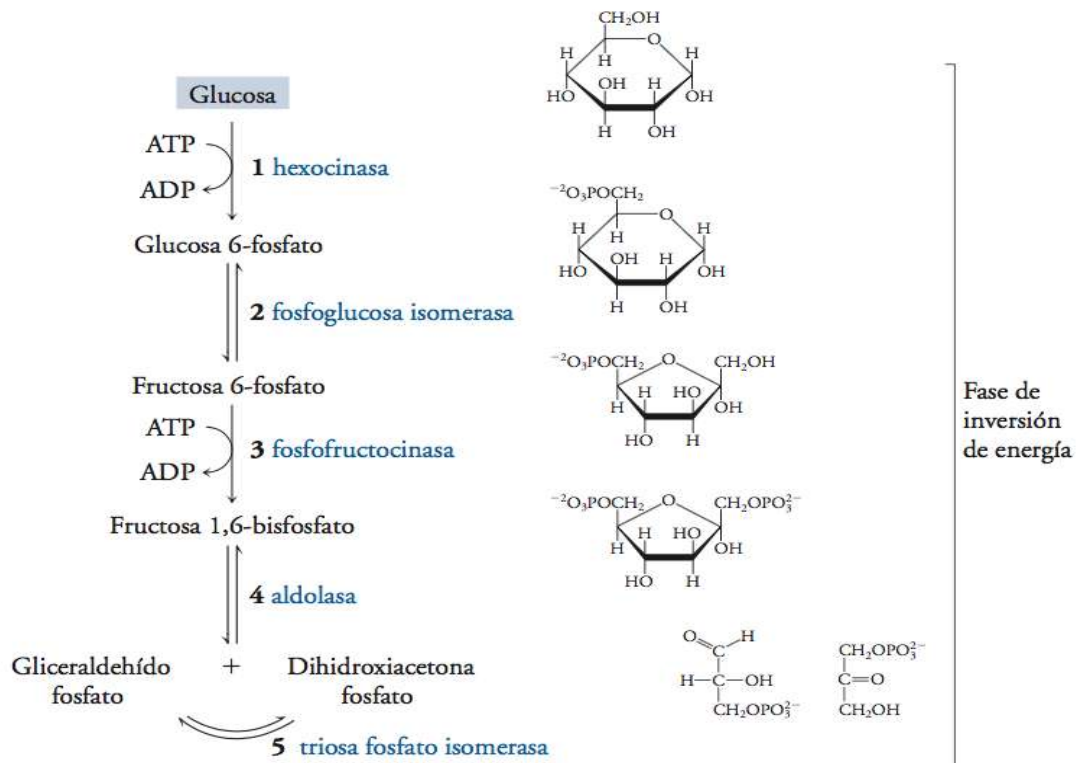


Figura A.1 fase 1 de la glucólisis: Fase de inversión de energía

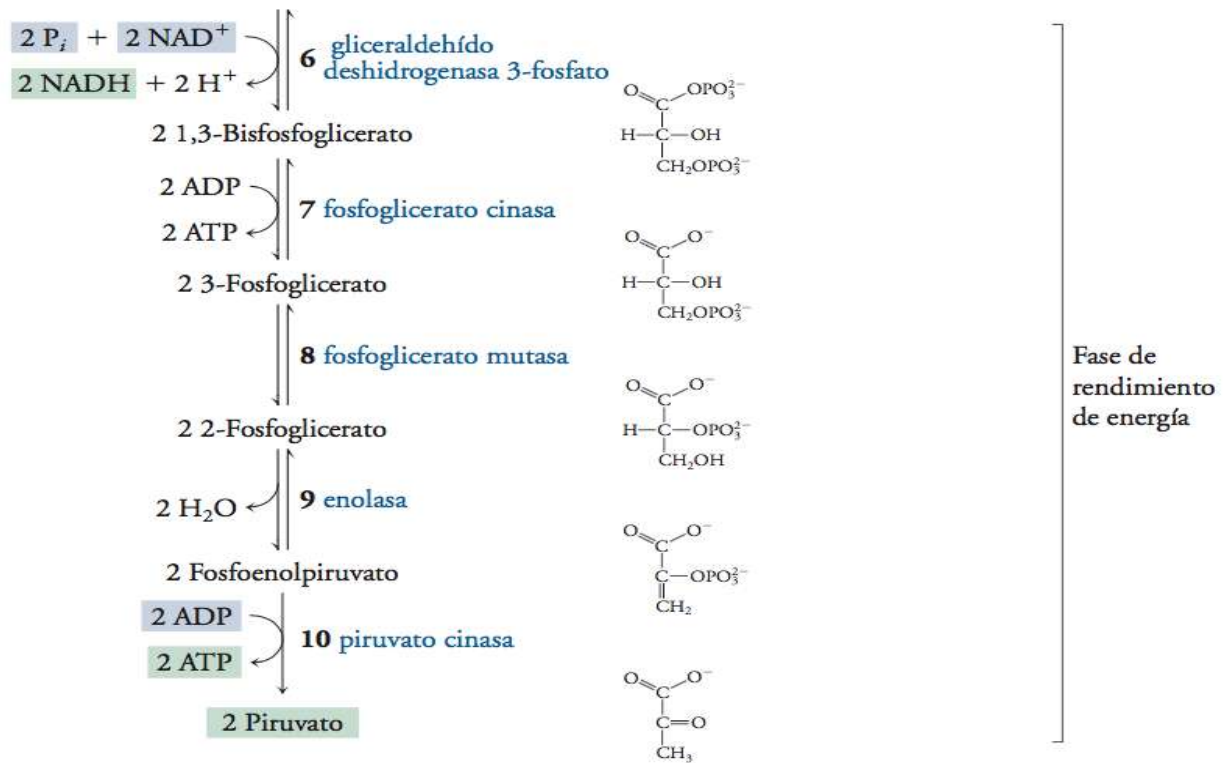


Figura A.2 Fase 2 de la glucólisis: Fase de rendimiento de energía

## Ciclo del ácido cítrico

Conocido como ciclo de Krebs es el “centro del metabolismo” (VOET). Es a vía de oxidación de la mayor parte de **carbohidratos** y **aminoácidos**. El ciclo del ácido cítrico, la forma común del metabolismo oxidativo en la mayoría de los organismos, esta mediado por ocho enzimas que conjuntamente convierten una molécula de acetil coenzima A en dos CO<sub>2</sub>, produciendo tres NADs un FADH<sub>2</sub> y un GTP o ATP. El NADH y el FADH<sub>2</sub> son oxidados por el O<sub>2</sub> en la cadena de transporte electrónico con síntesis concomitante de once ATPs

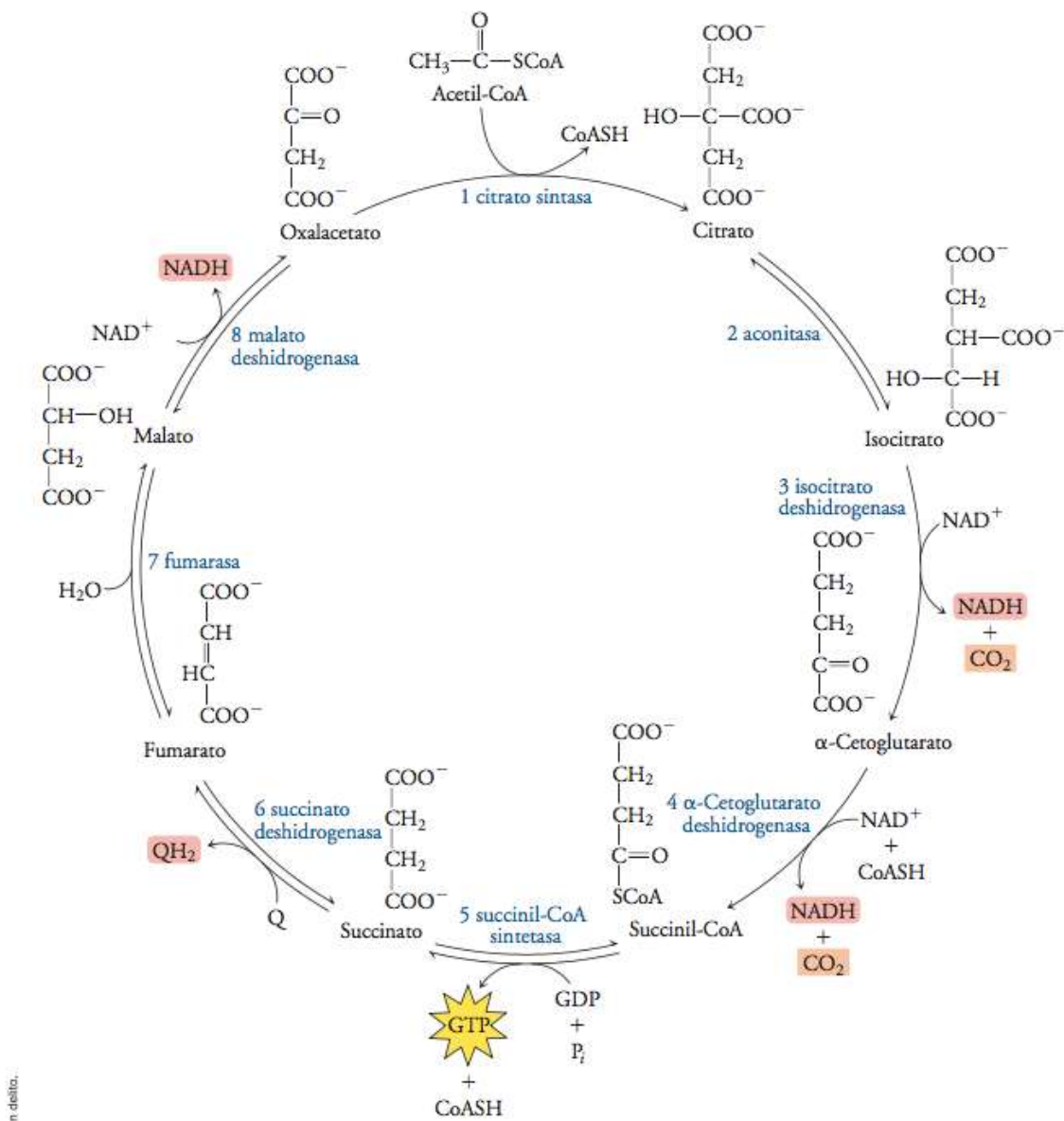


Figura A.3 Ciclo del ácido cítrico

## Metabolismo de los aminoácidos

Los aminoácidos, además de su papel como unidades monomérica de las proteínas, son metabolitos energéticos y precursores de muchos compuestos biológicos importantes que contienen nitrógeno, pueden ser precursores de la glucosa, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, son combustibles metabólicos. Los aminoácidos son convertidos en metabolitos intermediarios, tales como el piruvato, el oxalacetato y el  $\alpha$ -cetoglutarato y entran al **ciclo del ácido cítrico** de modo que pueden ser metabolizados hasta ser degradados en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .

La conversión de los diferentes aminoácidos a compuestos intermediarios de ciclo del ácido cítrico siguen rutas muy diversas, debido a sus diferentes esqueletos de carbono.

El metabolismo de los aminoácidos puede dividirse en dos grupos:

- 1.- Aminoácidos glucogénicos cuyos esqueletos de carbono se degradan a piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato u oxalacetato y son por lo tanto precursores de la glucosa.
- 2.- Aminoácidos cetogénicos, cuyos esqueletos de carbono son degradados a acetil-CoA o acetoacetato y pueden ser convertidos en ácidos grasos o cuerpos cetónicos.

Los aminoácidos son degradados a uno de los siete intermediarios comunes. La **treonina** y **serina** se degradan a piruvato. La asparagina se convierte a oxalacetato, por acción enzimática, primeramente se hidroliza a aspartato y la transaminación del aspartato lleva al oxalacetato, la **arginina** se degrada por conversión a glutamato el que a su vez se degrada a  $\alpha$ -cetoglutarato por la glutamato deshidrogenasa. La primera degradación de la **fenilalanina** es su hidroxilación a tirosina, los productos finales son el fumarato, un intermediario del ácido cítrico y el acetoacetato, un cuerpo cetónico.

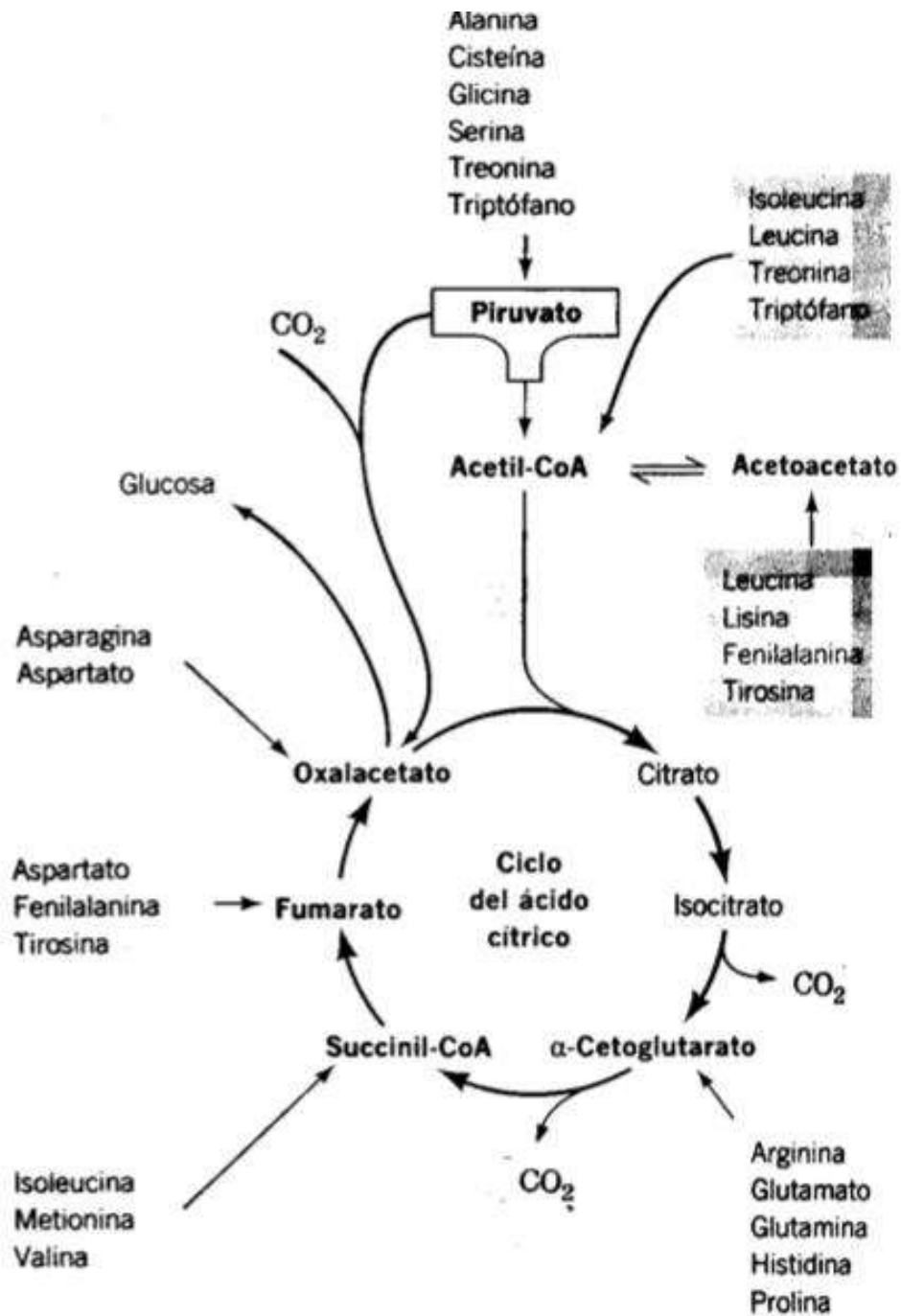
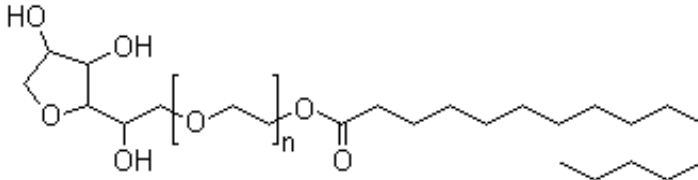
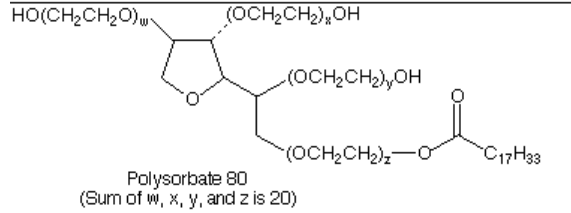


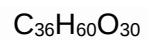
Figura A.4 Participación de los diferentes aminoácidos en el ciclo del ácido cítrico

## B. Estructuras químicas de las diferentes fuentes de carbono presentes en BIOLOG® Ecoplate™

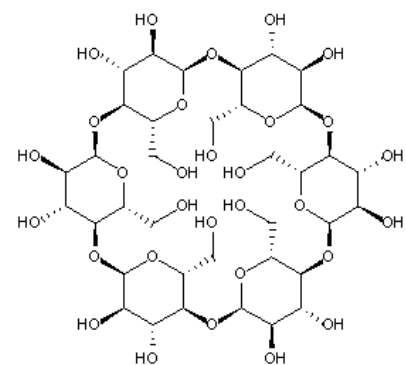
| Pocillo   | Nombre                     | Grupo        | Fórmula Qca                                      | PM(g·mol <sup>-1</sup> ) | Estructura química                                                                                                                           |
|-----------|----------------------------|--------------|--------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>B1</b> | Acido pirúvico metil ester | Carbohidrato | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>     | 102.09                   | $  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  \text{C}=\text{O} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $                                          |
| <b>C1</b> | Tween 40                   | Polimeros    | C <sub>62</sub> H <sub>112</sub> O <sub>26</sub> | 1283.63                  |                                                           |
| <b>D1</b> | Tween 80                   | Polimeros    | C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub> | 1310                     |  <p>Polysorbate 80<br/>(Sum of w, x, y, and z is 20)</p> |

**E1** $\alpha$ -ciclodextrina

Polímeros

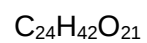


972.84

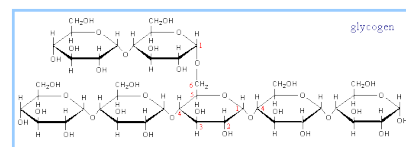
**F1**

Glucógeno

Polímeros

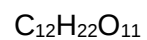


666.57

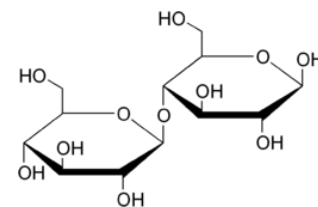
**G1**

D-celobiosa

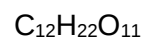
Carbohidratos



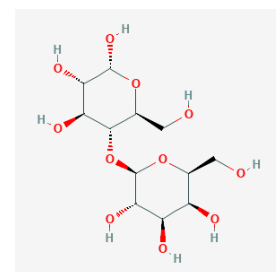
342.29

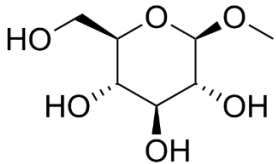
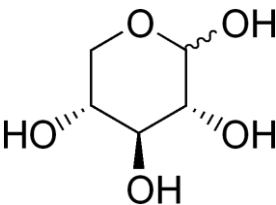
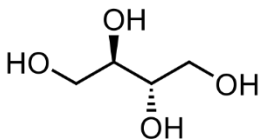
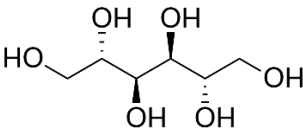
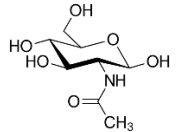
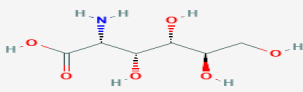
**H1** $\alpha$ -D-Lactosa

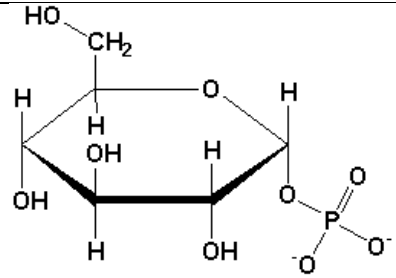
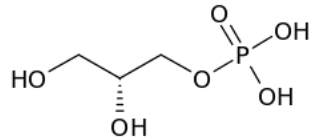
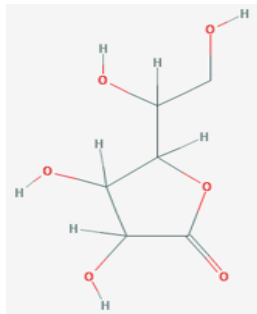
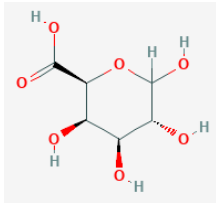
Carbohidratos

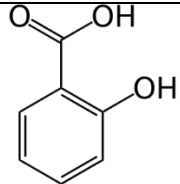
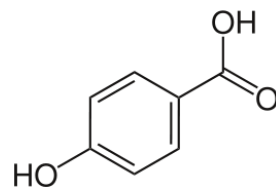
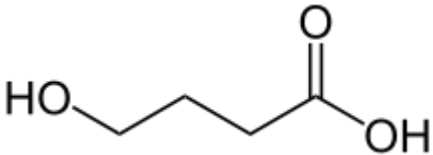
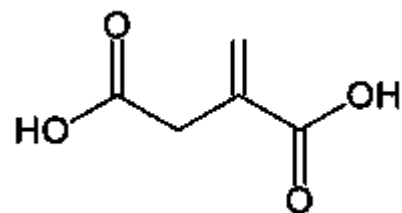
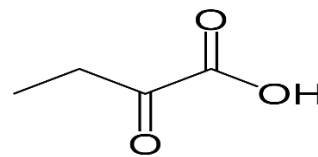


342.3

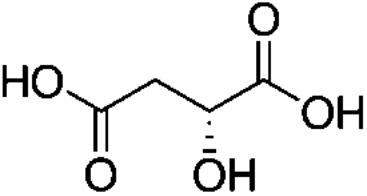
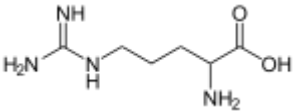
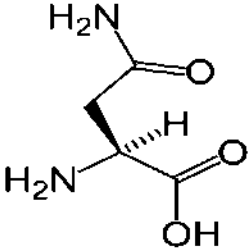
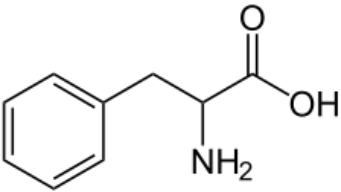


|           |                            |                               |                          |         |                                                                                       |
|-----------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A2</b> | $\beta$ -Metil-D-glucosido | Carbohidratos                 | $C_7H_{14}O_6$           | 194.18  |    |
| <b>B2</b> | D-Xilosa                   | Carohidratos                  | $C_5H_{10}O_5$           | 150.13  |    |
| <b>C2</b> | i-Eritritol                | Carbohidratos                 | $HOCH_2[CH(OH)]_2CH_2OH$ | 122.12  |    |
| <b>D2</b> | D-Manitol                  | Carbohidratos                 | $C_6H_{14}O_6$           | 182.87  |    |
| <b>F2</b> | N-acetil-D-glucosamina     | Carbohidratos                 | $C_8H_{15}NO_6$          | 221.208 |   |
| <b>F2</b> | Acido D-glucosaminico      | Acido cetónicos y carboxílico | $C_6H_{13}NO_6$          | 195.17  |  |

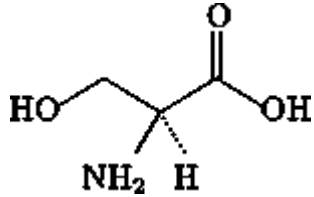
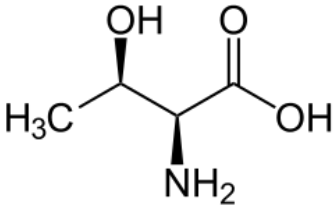
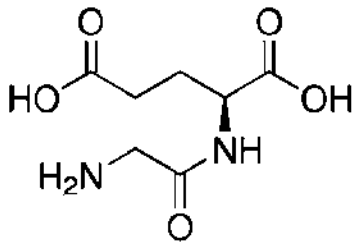
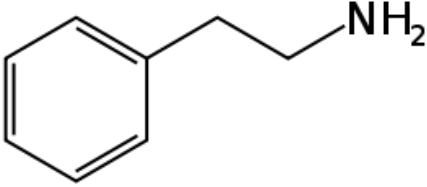
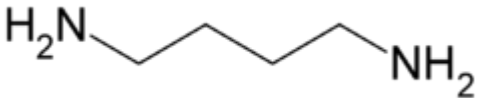
|           |                               |                    |                 |         |                                                                                                                       |
|-----------|-------------------------------|--------------------|-----------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>G2</b> | Glucosa 1 fosfato             | Carbohidratos      | $C_6H_{13}O_9P$ | 260.136 |  <p><b>Glucose-1-phosphate</b></p> |
| <b>H2</b> | D,L-α- Glicerol fosfato       | Carbohidratos      | $C_3H_9O_6P$    | 172.074 |                                    |
| <b>A3</b> | Ácido D-Galactónico-γ-lactona | Cetonico Y CARB    | $C_6H_{10}O_6$  | 178.14  |                                   |
| <b>B3</b> | ácido D - galacturónico       | Carboxílico Y CARB | $C_6H_{10}O_7$  | 194.139 |                                  |

|           |                           |                   |             |         |                                                                                       |
|-----------|---------------------------|-------------------|-------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>C3</b> | Ácido 2-Hidroxibenzoico   | Carboxílico Y CET | $C_7H_6O_3$ | 138.121 |    |
| <b>D3</b> | Ácido 4-Hidroxibenzoico   | CET Y CARB        | $C_7H_6O_3$ | 138.12  |    |
| <b>E3</b> | Ácido γ - hidroxibutírico | CET Y CARB        | $C_4H_8O_3$ | 104.10  |    |
| <b>F3</b> | Ácido itacónico           | Carboxílo         | $C_5H_6O_4$ | 130.099 |   |
| <b>G3</b> | Ácido α-Cetobutírico      | Cetonico          | $C_4H_6O_3$ | 102.089 |  |

---

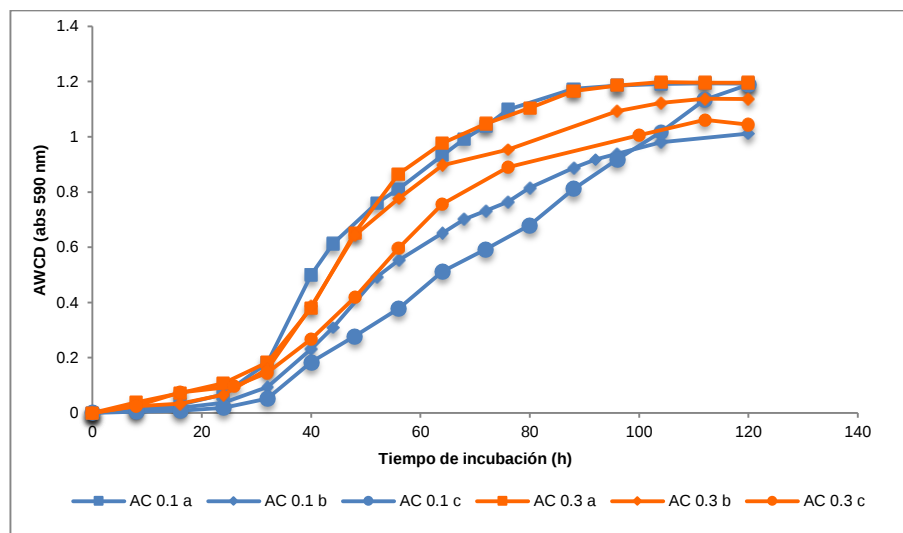
|           |                |            |                   |          |                                                                                       |
|-----------|----------------|------------|-------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>H3</b> | Ácido málico   | Carboxílo  | $C_4H_6O_5$       | 134.09   |    |
| <b>A4</b> | L-Arginina     | Aminoácido | $C_6H_{14}N_4O_2$ | 174.2    |    |
| <b>B4</b> | L-Asparagina   | Aminoácido | $C_4H_8N_2O_3$    | 132.1179 |    |
| <b>C4</b> | L-Fenilalanina | Aminoácido | $C_9H_{11}NO_2$   | 165.19   |  |

---

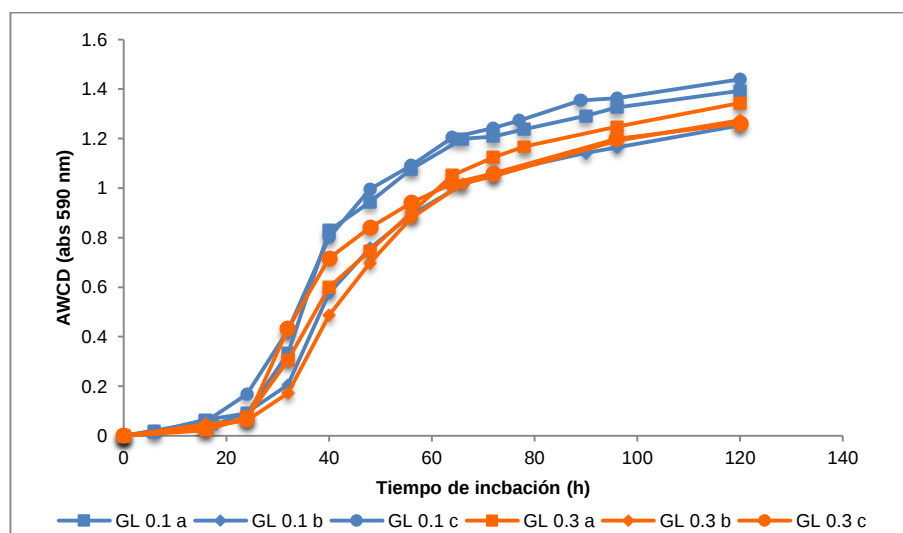
|           |                          |            |                   |        |                                                                                       |
|-----------|--------------------------|------------|-------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>D4</b> | L-Serina                 | Aminoácido | $C_3H_7NO_3$      | 105.09 |    |
| <b>E4</b> | L-Treonina               | Aminoácido | $C_4H_9NO_3$      | 119.12 |    |
| <b>F4</b> | ácido Glicil-L glutámico | Aminoácido | $C_7H_{12}N_2O_5$ | 147.13 |    |
| <b>G4</b> | Feni-Etil-Amina          | Amina      | $C_8H_{11}N$      | 121.18 |  |
| <b>H4</b> | Putrescina               | Amina      | $C_4H_{12}N_2$    | 88,15  |  |

### C. Cinéticas AWCD vs tiempo de incubación

Se obtuvo una cinética diferente en cada semana experimental de la fase estabilizada del desarrollo promedio de color (AWCD) con respecto al tiempo de incubación. En las figuras siguientes se muestran agrupadas por sustrato de alimentación, la nomenclatura sigue el formato descrito en el apartado 5.2, Tabla 4.5



**Figura C.1** Cinéticas de degradación global (AWCD vs tiempo de incubación) mostradas por las comunidad bacteriana durante la fase experimental de alimentación con acetato



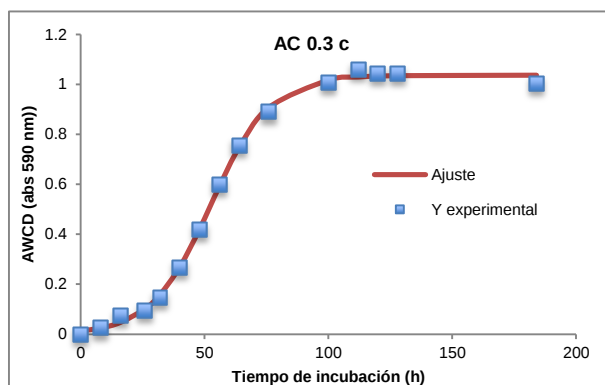
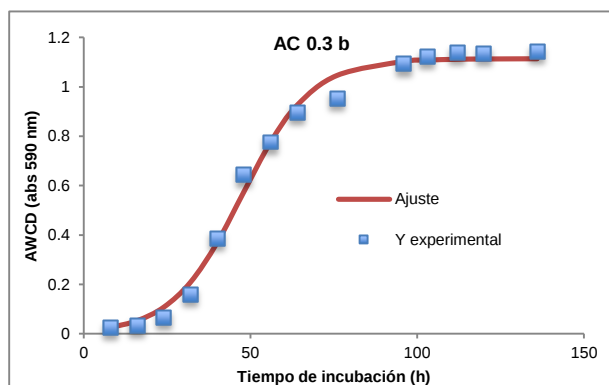
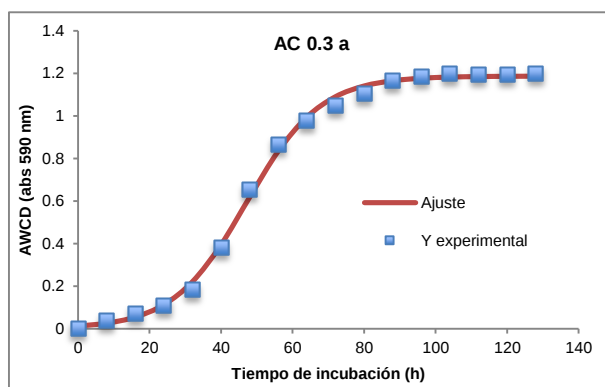
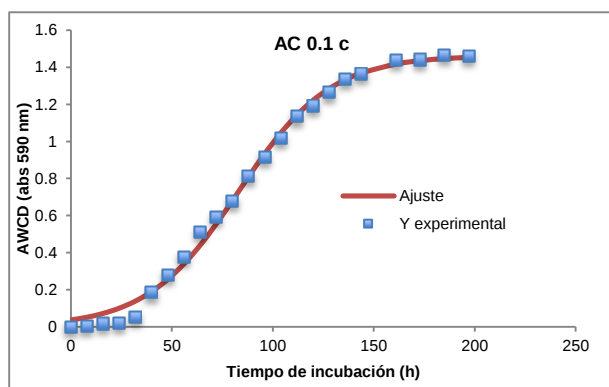
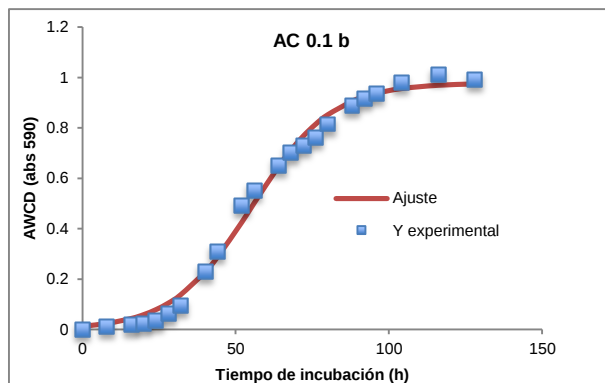
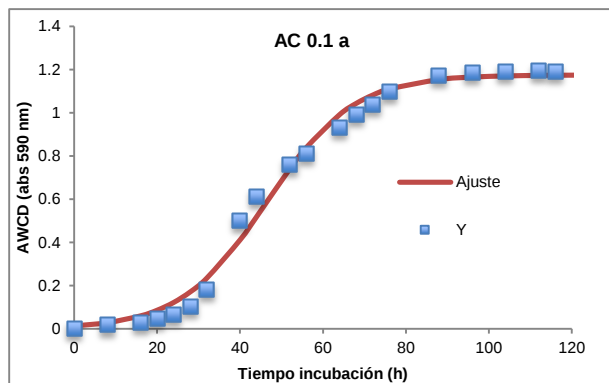
**Figura C.2** Cinéticas de degradación global (AWCD vs tiempo de incubación) mostradas por la comunidad bacteriana durante la fase experimental de alimentación con acetato

#### D. Aplicación del modelo logístico de crecimiento

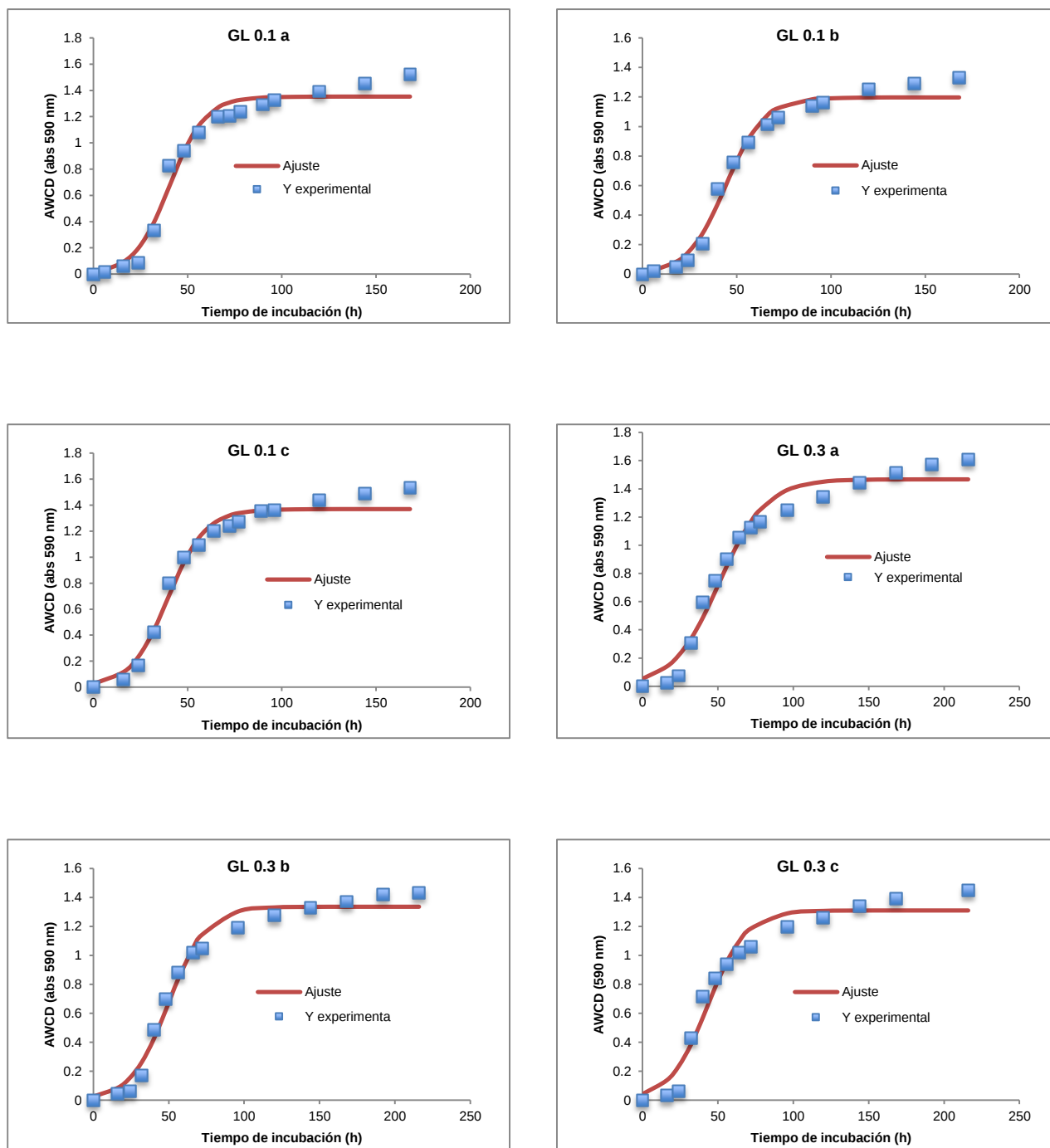
Las cinéticas obtenidas del AWCD contra el tiempo de incubación de las placas BIOLOG Ecoplate, se ajustaron a un modelo de crecimiento logístico, y se obtuvieron tres parámetros cinéticos, descritos en el apartado 4.3.1. En la tabla se muestran los valores de cada parámetro cinético para cada semana experimental en fase estabilizada. En las figuras siguientes ilustran el ajuste para cada corrida experimental. La nomenclatura sigue el formato descrito en el apartado 5.2, Tabla 4.5

**Tabla D.1** Parámetros cinéticos obtenidos mediante el ajuste al modelo logístico de crecimiento

| Condición experimental | K (AWCD) | P     | S (h)  | r <sup>2</sup> |
|------------------------|----------|-------|--------|----------------|
| AC 0.1 a               | 1.175    | 0.096 | 46.442 | 0.992          |
| AC 0.1 b               | 0.978    | 0.078 | 55.354 | 0.993          |
| AC 0.1 c               | 1.463    | 0.044 | 83.160 | 0.992          |
| AC 0.3 a               | 1.187    | 0.097 | 47.156 | 0.992          |
| AC 0.3 b               | 1.114    | 0.096 | 47.351 | 0.993          |
| AC 0.3 c               | 1.036    | 0.083 | 52.590 | 0.998          |
| GL 0.1 a               | 1.353    | 0.106 | 40.512 | 0.977          |
| GL 0.1 b               | 1.197    | 0.098 | 44.131 | 0.984          |
| GL 0.1 c               | 1.370    | 0.101 | 39.583 | 0.981          |
| GL 0.3 a               | 1.467    | 0.065 | 50.847 | 0.974          |
| GL 0.3 b               | 1.336    | 0.080 | 49.759 | 0.983          |
| GL 0.3 c               | 1.310    | 0.079 | 43.303 | 0.965          |



**Figura D.1** Ajustes al modelo logístico de las cinéticas AWCD vs tiempo de incubación, para la comunidad alimentada con acetato. Los cuadros azules nos muestran los puntos experimentales y la línea roja el ajuste hecho mediante el modelo matemático



**Figura D.2** Ajustes al modelo logístico de las cinéticas AWCD vs tiempo de incubación, para comunidad bacteriana con glucosa. Los cuadros azules nos muestran los puntos experimentales y la línea roja el ajuste hecho mediante el modelo matemático