

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

**“Identificación de comunidades bacterianas establecidas en un
biofilm de un reactor aerobio de lecho fijo con soporte PET”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y
Tecnología Ambiental

Presenta:

QFB. Erandy Mirelle Zúñiga Hernández

Dirigido por:

Dr. José Alberto Rodríguez Morales

Dr. José Alberto Rodríguez Morales
Presidente

Dr. Juan Campos Guillén
Secretario

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo
Vocal

Dr. Víctor Pérez Moreno
Suplente

Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre, 2019 México

DEDICATORIA

A mi abuelita que es mi gran ángel, anhelo que desde el cielo está orgullosa de mí.

A mis padres Francisco J. Zúñiga Santiago y María Hernández Ángeles al igual que a mi hermano Francisco Javier Zúñiga Hernández por ser los principales motivadores de realizar mis sueños, y que me han apoyado a cumplir un objetivo más.

A mi primo Francisco Zúñiga Terán que siempre me ha ayudado a mantener un balance entre las responsabilidades y la diversión.

A mi novio J. Antonio Ramírez por siempre ver y esperar lo mejor de mí, y aun así alentarme a seguir mejorando.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme en mi camino, por ser mi fortaleza en momentos de dificultad y llenar mi vida de bendiciones.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental por poder hacer posible llevar a cabo la realización del presente proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para realizar esta investigación.

Al Dr. José Alberto Rodríguez Morales por haberme permitido trabajar a su lado, por orientarme y guiarme en el desarrollo de esta investigación. Así mismo por brindarme su amistad y apoyo en todo momento.

A los miembros de mi comité por compartir sus conocimientos a lo largo de la maestría y por el apoyo para realizar este proyecto. En especial al Dr. Juan Campos Guillén por su valioso aporte para la investigación y motivación personal.

A mis padres, quienes me han enseñado que un pequeño esfuerzo hace la gran diferencia, que siempre me han apoyado, motivado y creído en mí. Que, si bien durante este periodo hemos pasado grandes dificultades, fueron unos guerreros y nunca me faltaron sus oraciones, palabras de aliento, amor y sonrisas. Solo me queda ofrecerles mi amor y gratitud.

A mis compañeros y amigos de generación: Alexa, Fernanda, Natanahel, Carmen y Edwin por compartir cada momento bueno o malo durante esta etapa. Así como a mis compañeras de laboratorio Mónica, Xóchilt, Carolina y Yessenia por su asesoría en el laboratorio y por brindarme su amistad.

Finalmente, a mi mejor amigo, compañero y novio J. Antonio Ramírez Zúñiga por el amor y apoyo incondicional. Por siempre buscar mi bien estar y motivarme a crecer personal, académica y profesionalmente. Gracias por acompañarme en cada uno de mis sueños. Gracias por hacerme mejor persona.

RESUMEN

El tratamiento biológico es el más factible y utilizado para tratar descargas domésticas, siendo su variación de lecho fijo (FBBR) una alternativa eficiente ya que presenta ventajas con respecto a sistemas tradicionales en suspensión, se conforma un biofilm con microorganismos capaces de degradar materia orgánica, así procesos con un menor tiempo de retención hidráulico. El presente trabajo de investigación alude sobre la adaptación de un lodo activado (suspensión) implementado como inóculo para la formación de biofilm en un biorreactor de FBBR para el tratamiento de afluentes domésticos con un soporte PET, material que ha demostrado ser factible para ser implementado como medio de soporte.

El sistema estuvo en operación por 150 días utilizando agua residual domestica como sustrato y evaluando la eficiencia del reactor por medio de parámetros de calidad de agua y coeficientes biocinéticos, se reportan eficiencias de remoción de DQO y DBO >90%. Disminución en otros parámetros de calidad de agua como: SDT (25%), Color (60%), Turbidez (90%), así como neutralización del afluente con características alcalinas. Disminuyendo un tiempo de residencia de 4h.

La caracterización de las comunidades bacterianas asociada a la biopelícula se llevó a cabo mediante herramientas metagenómicas donde se evaluó la diversidad por medio del análisis del biomarcador ARNr 16S logrando identificar 11 phylum bacterianos correspondientes para biofilm y 8 en suspensión, donde las principales bacterias fueron *Proteobacterias*, *Bacteroidates* y *Firmicutes*, información que permite comprender mejor la complejidad de las estructuras bacterianas en aguas residuales y como interviene en la eficiencia de los procesos.

Palabras clave: Tratamiento de agua, biopelícula, comunidades bacterianas, caracterización metagenómica bacterias, biomarcador 16S ARNr

ABSTRACT

The biological process is the most feasible and used to treat domestic discharges, being its fixed bed variation (FBBR) an efficient alternative since it has advantages such as a shorter hydraulic retention time, it has a great variety of microorganisms in the biofilm capable of Degrade organic matter with little generation of biological waste. This research work deals with the adaptation of an activated sludge (suspension) implemented as an inoculum for the biofilm formation of a FBBR bioreactor for the treatment of domestic tributaries with a PET support, material that has proven to be a viable technology.

The system was in operation for 150 days using domestic wastewater as a substrate and assessing the efficiency of the reactor by means of water quality parameters and biokinetic coefficients, COD and BOD removal efficiencies > 90% are reported. Decrease in other water quality parameters such as: SDT (25%), Color (60%), Turbidity (90%), as well as neutralization of the tributary with alkaline characteristics. Decreasing a residence time of 4h.

The characterization of the bacterial communities associated with the biofilm was carried out using metagenomic tools where diversity was assessed through. The analysis of the 16S rRNA biomarker, identifying 11 corresponding bacterial phylum for biofilm and 8 in suspension, where the main bacteria were *Proteobacteria*, *Bacteroidates* and *Firmicutes*, information that allows us to better understand the complexity of bacterial structures in wastewater and how it intervenes in the efficiency of processes

CONTENIDO GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	11
II.	JUSTIFICACIÓN	14
III.	ANTECEDENTES	15
3.1	Agua residual	15
3.2	Tratamiento de agua residual	15
3.3	Procesos biológicos	16
3.3.1	Aerobio	18
3.3.2	Lecho fijo	19
3.4	Materiales de soporte	20
3.4.1	Polietileno Tereftalato – PET	21
3.5	Ingeniería de bioprocesos	22
3.6	Biofilm	24
3.7	Caracterización por técnicas moleculares	35
IV.	HIPÓTESIS	40
V.	OBJETIVOS	41
5.1	Objetivo general	41
5.2	Objetivos específicos	41
VI.	METODOLOGÍA	42
6.1	Desarrollo de reactor biológico aerobio de lecho fijo	42
6.1.1	Reactor (Sistema de lecho fijo FBBR)	43
6.1.2	Medio de soporte PET	44
6.1.3	Inóculo y sustrato	46
6.1.3	Biomasa adherida	46
6.1.4	Determinación de microorganismos presentes en el biofilm	47
6.1.6	Características físicas del biofilm	48
6.1.7	Caracterización morfológica del biofilm	48
6.2	Evaluación de la eficiencia del reactor	50
6.2.1	Parámetros físico-químicos de la calidad del agua	51
6.2.2	Coeficientes biocinéticos	52
6.3	Identificación de comunidades bacterianas	54

6.3.1	Muestreo y almacenamiento	55
6.3.2	Extracción de DNA	55
6.3.3	Verificación de productos de la extracción de ADN.....	55
6.3.4	Amplificación y Secuenciación.....	56
6.3.5	Análisis Bioinformático.....	56
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
7	Desarrollo de reactor biológico.....	57
7.1.1	Área de contacto soporte PET	57
7.1.2	Biomasa adherida al soporte	58
7.1.3	Determinación de microorganismos en biofilm por cm ² (SVTi).....	60
7.1.4	Caracterización física del biofilm.....	60
7.1.5	Caracterización morfológica del biofilm.....	61
7.2	Evaluar la eficiencia del proceso biológico	63
7.2.1	Caracterización físico-química del efluente.....	63
7.2.2	Monitoreo de efluente y afluente las fases de adaptación y estabilización ..	64
7.2.4	Evaluación del reactor en 24 horas.....	71
7.2.5	Coeficientes biocinéticas	75
7.3	Identificar bacterias en el biofilm en las diferentes etapas de los procesos mediante el biomarcador ARNr 16S	78
7.3.1	Extracción de DNA.....	78
7.3.2	Amplificación.....	78
7.3.3	Secuenciación y Análisis bioinformático	79
7.3.4	Estructura de la comunidad microbiana en diferentes fases del biorreactor. ..	80
VIII.	CONCLUSIONES	91
IX.	REFERENCIAS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema etapas de tratamiento de agua	16
Figura 2. Sistema de lecho fijo	19
Figura 3. Tipos de sólidos en aguas.....	24
Figura 4. Mecanismos de adhesión bacteriana	26
Figura 5. Ensamblado bacteriano para la formación de biofilm	28
Figura 6. Formación de la biopelícula.....	29
Figura 7. Microscopia Electrónica de Barrido de un biofilm	30
Figura 8. Curva de crecimiento de microorganismos en función del tiempo	34
Figura 9. Representación esquemática del gen 16S ARNr, indicando las regiones variables (V1-V9), conservadas (C1-C9) e invariable.....	37
Figura 10. Esquema etapas de PCR (Desnaturalización, Hibridación, Extensión).....	38
Figura 11. Esquema de un reactor aerobio con lecho fijo.....	43
Figura 12. Ensamblado del medio de soporte PET	45
Figura 13. Esquema cono trunco y cilindro para obtención de área	45
Figura 14. Fijación del biofilm al soporte	59
Figura 15. (A) Microfotografía a 2,500x correspondiente al biofilm formado al interior del soporte (B) MEB a 5000x de biofilm formado sobre material PET a 60 días de operación del reactor.....	62
Figura 16. Monitoreo de color afluente vs. efluente durante 150 días.....	66
Figura 17. Monitoreo de turbidez afluente vs. efluente durante 150 días.....	66
Figura 18. Monitoreo de Sólidos Disueltos Totales afluente vs. efluente durante 150 días	67
Figura 19. Valores DQO obtenidos afluentes vs. efluente tratamiento biológico.....	68
Figura 20. Valores DBO5 obtenidos afluentes vs. efluente tratamiento biológico	69
Figura 21. Gráfico comparativo de las cinéticas disminución de DQO.....	74
Figura 22. Comparación del agua residual doméstica durante 24 horas de tratamiento. 74	
Figura 23. Tasa máxima de crecimiento (k) y Velocidad media de crecimiento (K_s)	76
Figura 24. . Rendimiento celular máximo (Y) y el coeficiente de decaimiento endógeno (k_d)	77
Figura 25. Aislamiento de DNA genómico. Se muestra la corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	78

Figura 26. Estructura de la comunidad bacteriana del inocuo en suspensión. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en la muestra.	80
Figura 27. Estructura de la comunidad bacteriana durante la formación del biofilm. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en la muestra.	82
Figura 28. Estructura de la comunidad bacteriana biofilm irreversible. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en la muestra.....	83
Figura 29. Estructura de comunidades bacterianas a nivel phylum en diferentes fases del biorreactor para el tratamiento de aguas residuales domésticas. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en cada muestra.....	86
Figura 30. Estructura de comunidades bacterianas a nivel clase en diferentes fases del biorreactor para el tratamiento de aguas residuales domésticas. La abundancia se resenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en cada muestra.....	87
Figura 31. Estructura de comunidades bacterianas a nivel familia en diferentes fases del biorreactor para el tratamiento de aguas residuales domésticas. La abundancia se resenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en cada muestra.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de bacterias involucradas en el tratamiento de agua aerobio	32
Tabla 2. Características físicas del reactor	44
Tabla 3. Parámetros de calidad del agua en base a la NOM-127-SSA1-1991	51
Tabla 4. Parámetros de calidad de agua en base a NOM-c.....	51
Tabla 5. Parámetros de calidad de agua en base a NOM-003-SEMARNAT-1997.....	51
Tabla 6. Coeficientes biocinéticos para lodos activados	53
Tabla 7. Días de muestreo biomasa	55
Tabla 8. Condiciones de operación del reactor.....	57
Tabla 9. SVTi cm ⁻¹	60
Tabla 10. Propiedades físicas de la biomasa.....	60
Tabla 11. Rangos de operación del reactor	63
Tabla 12. Resultados de análisis fisicoquímicos y biológicos del afluente	64
Tabla 13. Promedios semanales de pH afluente vs. efluente	65
Tabla 14. Determinación de biodegradabilidad efluente por medio de la relación QBO5/ QBO.....	69
Tabla 15. Reducción porcentual en fase de adaptación y estabilización.....	70
Tabla 16. Cinéticas de reacción a 24h a 60 días de operación	71
Tabla 17. Cinéticas de reacción a 24h a 90 días de operación	72
Tabla 18. Cinéticas de reacción a 24h a 120 días de operación	72
Tabla 19. Cinéticas de reacción a 24h a 150 días de operación.....	72
Tabla 20. Eficiencia promedio de reducciones de parámetros de calidad de agua	73
Tabla 21. Valores de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (S) y Sólidos Suspendidos Volátiles (X) asociadas al cálculo de los coeficientes biocinéticos	75
Tabla 22. Variables asociadas al cálculo de k y K _s	75
Tabla 23. Variables asociadas al cálculo de Y y k _d	76
Tabla 24. Coeficientes biocinéticos	77
Tabla 25. Concentraciones de ADN obtenido por muestra	78
Tabla 26. Concentraciones obtenidas por muestra en amplificación.....	78

I. INTRODUCCIÓN

El agua es indispensable para la vida misma, es el recurso más importante debido a su escala en todos los sectores: doméstico (14%), industrial (17%) y agropecuario (69%). Sin embargo, es un recurso escaso, agua es indispensable a nivel global y menos del 0.1 por ciento únicamente está disponible, de ahí se dispone para su consumo humano y la ejecución de las actividades antes señaladas (ONU, 2014). En la actualidad nos enfrentamos a una gran cantidad de problemas como son: un consumo inadecuado, escases de los recursos hídricos, dificultad para su disponibilidad, contaminación, así como la ausencia de una cultura de cuidado, tratamiento y reúso.

Para el 2015, fueron destinados 12.48 miles de millones de m³ para uso público en México (CONAGUA, 2016). Generando una gran cantidad de afluentes domésticos de los cuales se estima que el 80% no recibieron ningún tipo de tratamiento. Es importante que las aguas residuales provenientes de usos domésticos e industriales sean tratadas con el fin de minimizar su impacto ambiental. Las aguas no tratadas son un riesgo para la salud humana por los agentes infecciosos que contienen (Velasco-Pérez *et al*, 2014), al igual que contaminan mantos acuíferos, propician otros problemas ambientales como la contaminación de suelo, aire, emisiones de gases de efecto invernadero, así como cambio climático.

En los últimos años se ha incrementado el interés por la eliminación de estos contaminantes mediante nuevas y mejores tecnologías que permitan el tratamiento a un bajo costo y con buenos resultados (Crombet *et al*, 2016). Existen varios métodos para el tratamiento de aguas residuales como es el tratamiento biológico aerobio, dentro de esta técnica se encuentra los reactores de lecho fijo, cuyo objetivo es la formación de la biopelícula o biofilm para que se pueda llevar a cabo el tratamiento del afluente.

Los reactores de lecho fijo por sus siglas en inglés FBBR (fixed bed biofilm reactor) presentan ventajas en comparación a sistemas en suspensión como son: menos generación de residuos y mayor eficiencia del proceso (Gullicks *et al.*, 2011).

Uno de los componentes fundamentales que está involucrado en la eficiencia de estos reactores es el soporte, que en los últimos años se ha investigado ampliamente el tipo de material que se puede utilizar (González-Brambila & López-Insunza, 2008) como cerámicos, plásticos, espumas, esferas de polietileno, entre otros (Nava-Urrego *et al.*, 2014). El PET (Polietileno Tereftalato) como material de soporte ha demostrado tener buena adherencia por sus características de dureza, inerte, lo que conlleva a una buena y rápida formación de la biopelícula, reduciendo el tiempo de retención en más de un 50% (Mendoza-Burguete, 2016).

La biopelícula de un reactor biológico está mayormente constituida por bacterias (95%), sus capacidades metabólicas permiten el funcionamiento del sistema (Vigueras-Carmona *et al.*, 2013). La estructura bacteriana de la biomasa depende del tipo de sistema, por ello las comunidades microbianas respaldan la estabilidad y eficiencia del proceso (Cyzdik-Kwiatkowska & Zielińska, 2016). La elección de estos microorganismos se origina como resultado de condiciones ambientales, bióticas; como las interacciones de los microorganismos entre sí; y condiciones abióticas como son pH, temperatura, cantidad de nutrientes, tipos de contaminantes, tiempos de retención, así como el tipo de material de soporte donde se pueda generar el biofilm (Mahendran *et al.*, 2012).

Los sistemas de tratamiento biológicos de lecho fijo son sistemas complejos con una gran diversidad de bacterias (Cyzdik-Kwiatkowska & Zielińska, 2016). Sin embargo, por sus características habrá géneros de bacterias que tengan una mayor facilidad para la adherencia al soporte y se pueda llevar a cabo la formación de la biopelícula (Bou *et al.*, 2011).

Estudios para caracterizaciones bacterianas se han realizado mediante técnicas moleculares basadas en el biomarcador ARNr 16S, permitiendo diferenciar especies en su propio grupo taxonómico y filogenético (Xia *et al.*, 2014) generando una ventaja ya que no necesitan ser aislados a diferencia de los métodos tradicionales basados en cultivos en placa que tienden a favorecer el crecimiento de solo algunos grupos bacterianos (Wang *et al.*, 2012).

Se ha establecido que los reactores de lecho fijo con soporte PET tienen un rendimiento óptimo en el tratamiento de aguas residuales, sin embargo, el conocimiento actual de las comunidades bacterianas que conforman la biopelícula dentro de estos reactores está incompleto. Por lo que esta investigación se fundamenta en ampliar el conocimiento sobre qué comunidades bacterianas conforman la estructura de la biopelícula y así entender mejor el proceso. Así como una contribución en el estudio de tecnologías encargadas de la conservación del medio ambiente, generando un bienestar a la salud humana.

II. JUSTIFICACIÓN

El interés del tratamiento de afluentes radica en minimizar un impacto negativo al ambiente y poder ser empleadas para su reúso. Hasta el 2015 las plantas de tratamiento de agua residual municipales en México tenían la capacidad de procesar el 57% de descargas domésticas (CONAGUA, 2016). Sin embargo, se ha determinado que el efluente en muchos casos no cumple con las especificaciones señaladas en la normativa. Generando una problemática debido a que la población en México y en el estado de Querétaro crece considerablemente. Lo que generará un mayor consumo de agua y por ende se necesitará mayor infraestructura para su tratamiento, así como una mejora en el proceso más habitual de tratamiento (depuración biológica).

Se ha modificado tecnología buscando tener procesos más eficientes y amigables con el medio ambiente. Ejemplo de esto es reúso de botellas o láminas PET como material de soporte en sistemas de tratamiento de agua de lecho fijo, concluyendo que es una buena alternativa, debido a que se ha obtenido una buena adherencia de microorganismos formando una biopelícula estable, aumenta la superficie de contacto y reduce tiempos de retención hidráulicos (Mendoza Burguete, 2016; Espinosa Arzate, 2018). Este medio de soporte ha demostrado ser factible no solo por cumplir con los objetivos del proceso; si no también ser una alternativa para la reutilización de residuos plásticos y ser de bajo costo.

Sin embargo, este tipo de reactores ya establecidos es considerado como una caja negra, ya que no se ha indagado en qué especies bacterianas tienen la capacidad de resistir el medio, adherirse al PET, reproducirse y ser las encargadas de llevar a cabo el tratamiento de afluentes (Sanz & Köchling, 2007).

La principal motivación de este proyecto es que por medio de técnicas moleculares identificar las comunidades bacterianas involucradas en la biopelícula formada en el PET ya que es un amplio campo de investigación cuyo objetivo es entender la diversidad en distintos nichos conformados por microorganismos cultivables y no cultivables (Xia *et al.*, 2014). Y en base a esto proporcionar un mayor conocimiento sobre el funcionamiento de los reactores biológicos.

III. ANTECEDENTES

3.1 Agua residual

Se denomina agua residual a todas aquellas aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos múltiples, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, agropecuarios, domésticos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas. (NOM-003-SEMARNAT-1997)

Aguas negras se les conoce a las aguas residuales que provienen de inodoros, caracterizadas por tener una gran cantidad de sólidos en suspensión, nitrógeno y coliformes fecales. Y a las aguas residuales que provienen de duchas, lavamanos, lavadoras, se conocen como aguas grises las cuales presentan cantidades considerables de DBO, sólidos suspendidos, fósforo, grasa y coliformes fecales. (Vigueras-Carmona *et al.*, 2013)

En agua residual doméstica, el principal objetivo es la reducción de la materia orgánica presente y, en muchos casos, la eliminación de nutrientes (como el nitrógeno y el fósforo). A menudo, la depuración de compuestos a nivel traza que puedan resultar tóxicos, también constituyen un objetivo de importancia en el tratamiento. (Crombet *et al.*, 2014)

3.2 Tratamiento de agua residual

El tratamiento de agua residual es un conjunto de operaciones cuya finalidad es la reducción o eliminación de contaminantes en el agua para su reutilización (Velasco-Pérez *et al.*, 2014). Dependiendo del tipo de afluente, existen métodos físicos, químicos y biológicos para su tratamiento. (Metcalf & Eddy, 2013)

El proceso de tratamiento se lleva a cabo en 4 etapas principalmente:

- Pretratamiento: tiene como fin la eliminación de sólidos grandes. Consiste en un filtrado grueso por un sistema de rejas y/o mallas.

- Tratamiento primario: la materia orgánica de mayor tamaño es separado por el líquido, así como grasas. Se lleva a cabo principalmente por procesos físicos como sedimentación.
- Tratamiento secundario: su finalidad es la remoción de materia orgánica. La principal técnica es la depuración biológica, en la cual microorganismos llevan a cabo la degradación.
- Tratamiento terciario: su objetivo es la remoción de materiales disueltos orgánicos e inorgánicos. Se emplean técnicas como osmosis inversa, UV, cloración, carbón activado y filtración por membrana (Ibarbalz, 2016).

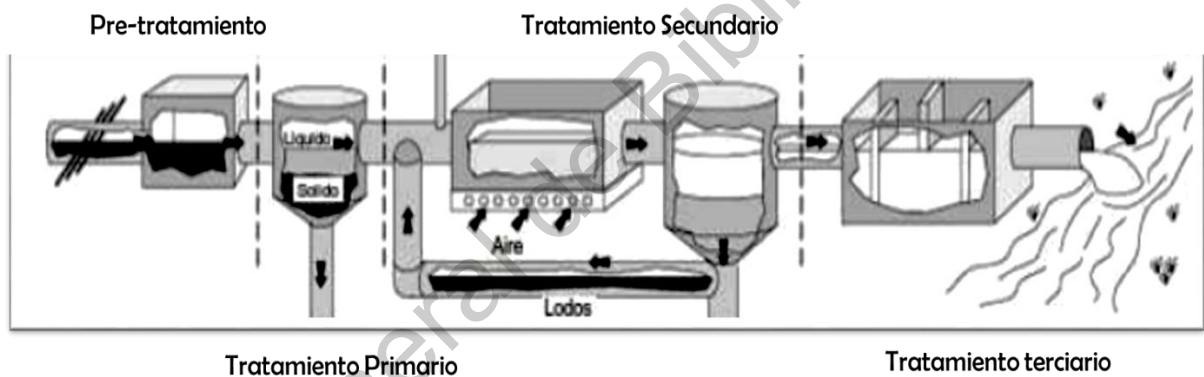


Figura 1. Esquema etapas de tratamiento de agua

Fuente: Ibarbalz 2016

3.3 Procesos biológicos

Los procesos biológicos tales como el sistema de lodos activados, lagunas de aireación y filtros percoladores, son los más empleados para el tratamiento de aguas residuales industriales debido a su aplicación a gran escala, fácil operación, mejor control de variables y porque representan menores costos con respecto a los tratamientos fisicoquímicos.

Estos procesos se lleva a cabo mediante la acción de microorganismos aerobios que tienen la capacidad de oxidar la materia orgánica presente en el afluente y degradarla a una forma más estable, disminuyendo así la carga de materia orgánica y otros contaminantes (Vigueras-Carmona *et al.*, 2013; Varila & Díaz, 2008) Los microorganismos aprovechan también los componentes del agua a tratar, como son nitrógeno, fósforo, azufre, potasio, calcio y magnesio para la síntesis celular, este proceso se llama anabolismo. Al conjunto de los procesos de catabolismo y anabolismo se le denomina metabolismo (Metcalf & Eddy, 2013).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria (transportadora de electrones de las células) se producen una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico que es externo a la célula y que actúa como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia. Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Varila & Díaz, 2008).

La biomasa está formada por una población de microorganismos, que cambian continuamente en función de las variaciones de la composición de las aguas residuales y de las condiciones ambientales. Los microorganismos presentes son bacterias, hongos, microalgas, protozoos y rotíferos. De éstos, las bacterias son las más importantes.

3.3.1 Aerobio

La descomposición de la materia orgánica por vía aerobia se divide en tres fases principales: la hidrólisis de las moléculas orgánicas complejas en sus respectivos monómeros, la descomposición de estos monómeros en intermediarios comunes y la final en la que se realiza el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, en donde el aceptor final de electrones es el oxígeno molecular, para formar agua como producto agua y dióxido de carbono (Sandoval et al., 2007; Rivas-Lucero, 2003).

Balance de carbono en el tratamiento aerobio:



Las actividades de síntesis y respiración que se producen se representan a continuación:

Oxidación y síntesis:



Respiración Endógena:



Todos estos sistemas se basan en los siguientes procesos:

1. Nitrificación: proceso de oxidación prolongada, en condiciones aerobias, del líquido en mezcla después de la eliminación de la materia orgánica. Este proceso es llevado a cabo por las bacterias autótrofas.
2. Desnitrificación: eliminación del nitrógeno en forma de gas en presencia de materia carbonosa (agua residual) y en condiciones anóxicas
3. Acumulación potenciada de fósforo: acumulación de fósforo en el interior de las células con condiciones aerobias.

4. Redisolución de fósforo: proceso en el que se lleva a una liberación de fósforo soluble en el líquido de la mezcla a partir de fósforo polimérico acumulada en el interior de las células. Asimilación celular de compuestos orgánicos para almacenarlos como sustancias de reserva. Se realiza en condiciones anaerobias.

3.3.2 Lecho fijo

Reactor de lecho fijo, por sus siglas en inglés FBBR (fixed bed biofilm reactor). En este tipo de procesos los microorganismos se encuentran adheridos sobre superficies inertes formando una biopelícula. Dentro de la biopelícula los sustratos se transportan por difusión dentro de conglomerados celulares, sin embargo, también existen poros y canales con líquido donde el transporte de masa se lleva a cabo por convección y difusión.

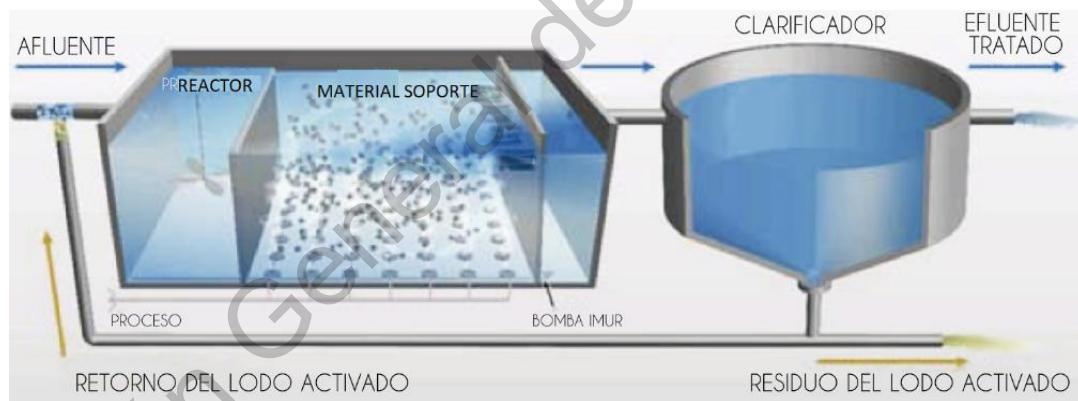


Figura 2. Sistema de lecho fijo

Fuente: ISA, 2018

Los procesos de biomasa fija han sido utilizados desde 1870, donde se empleaban rocas como medio de soporte (Rivas *et al.*, 2003). En la actualidad se han implementado más tipos de materiales como polímeros, cerámicas, etc (Gullicks *et al.*, 2011). Estudios han demostrado que este tipo de proceso presenta ventajas en comparación con lodos activados, tales como: mejor transferencia de

oxígeno, cortos tiempos de residencia y menor tiempo de retención hidráulica, mayor área de contacto para transferencia de masa, así como alto índice de nitrificación. (Nava-Urrego *et al.*, 2014).

3.4 Materiales de soporte

El soporte de los biorreactores permite la formación de la biopelícula mediante la adsorción de sólidos. Las principales finalidades del soporte son (Calderón *et al.*, 2011): aumentar la superficie de contacto y la formación de biomasa, facilitar el flujo uniforme en el reactor, mejorar el contacto entre sustrato y la biomasa, formar una barrera para separación del efluente.

Existen diversos materiales empleados como medio de soporte. En los que se encuentran: rocas, carbón activado, cerámicos, plásticos, espumas, esferas de polietileno, granito entre muchas otras (Tejero-Monzón *et al.*, 2012; Nava-Urrego *et al.*, 2014).

El material implementado debe cumplir algunas características como son: estructuras inertes y resistentes, con el objetivo de soportar la formación de la biopelícula y generar poca interacción con los microorganismos (R.-Boles *et al.*, 2004). Tener una porosidad adecuada que permita la adherencia de los microorganismos, así como permitir la rápida formación de la biopelícula para una operación rápida del reactor. Otro aspecto importante es un bajo costo, para ser viable el proceso (Gagliano *et al.*, 2017).

Las características del medio de soporte son relevantes durante las primeras etapas de formación del biofilm ya que influyen, tanto en la velocidad de formación, como en la distribución de las especies dentro de la biopelícula. La importancia del material de soporte adecuado radica que la concentración de biomasa en la biopelícula puede llegar a ser diez veces mayor que la concentración en sistemas de suspensión (González-Brambila M. & López-Insunza F., 2008).

Otras funciones del material del soporte son: mejorar el contacto entre el sustrato y los sólidos biológicos contenidos en el reactor, facilitar un flujo uniforme en el reactor, permitir la acumulación de gran cantidad de biomasa, actuar como una barrera física, evitando que los sólidos sean arrastrados por fuera del sistema de tratamiento, así actuar como un dispositivo para separar los sólidos de los gases.

3.4.1 Polietileno Tereftalato – PET

PET es un material polimérico obtenido mediante una reacción de policondensación entre el ácido tereftálico y el etilenglicol. Con un gran grado de cristalinidad. Es sumamente usado para la fabricación de botellas de plásticos para diferentes industrias, alimenticia principalmente, debido a sus grandes resistencias a diferentes soluciones y condiciones y al bajo costo que genera su producción, aunque el PET puede ser reciclado sigue siendo un problema ambiental debido a la gran generación de desechos que se crean y al largo tiempo de lleva su degradación.

En los últimos años se ha investigado en implementado como soporte en reactores de lecho fijo, debido a propiedades como resistencia química, resistencia eléctrica y a la formación de la biomasa, rigidez, dureza, adecuada barrera a humedad, a agentes químicos, así como que es reciclable y de bajo costo (Mendoza-Burguete, 2016).

Estudios han demostrado que los microorganismos se incorporan con mayor facilidad a superficies hidrófobas como es el caso de plásticos o teflón con respecto a los soportes hidrófilos.

3.5 Ingeniería de bioprocesos

Para determinar que un reactor es eficiente se deben considerar diferentes parámetros como son:

- **Afluente:** las características que presente afectarán el desarrollo de microorganismos. Si la carga de materia orgánica es deficiente la tasa de crecimiento será bajo, por lo contrario, si el sustrato incrementa la reproducción será mayor generando biomasa joven propiciando una sedimentación baja (Vigueras-Carmona *et al.*, 2013).
- **Tiempo de retención:** Es el tiempo que permanece cierta cantidad de agua en reactor. Debe ser el suficiente para remover la materia orgánica presente si no la calidad del efluente se verá alterada.
- **pH:** Afecta el crecimiento de los microorganismos, la reproducción bacteriana se lleva entre un pH de 6.5 a 8, mientras que a pH ácidos predominan los hongos sobre las bacterias, dando como resultado una baja remoción de DBO.
- **Oxígeno disuelto:** Es indispensable para la mantener la vida de la biomasa. Se busca que la concentración de oxígeno disuelto sea entre 1,5 mg/L y 4 mg/L. La tasa de nitrificación depende en gran medida del suministro de éste (Giustinianovich-Campos, 2011)
- **Temperatura:** El rango óptimo para el crecimiento es de 25 a 32°C. La temperatura es directamente proporcional al crecimiento bacteriano.
- **Nutrientes:** Afecta directamente el desarrollo de los microorganismos.

Eficiencia y estabilidad del proceso: La calidad del agua residual, está determinada por sus características y parámetros físicos, químicos y biológicos a partir de los cuales se determinan si son aceptables para su reúso (Álvarez-Torrellas, 2014). Estas características del efluente determinaran la eficiencia del proceso.

El monitoreo de la eficiencia busca establecer el comportamiento del reactor y su desempeño frente a las especificaciones de diseño (Torres & Pérez, 2010).

- **Color:** Indicador de la edad del agua.
- **DBO 5:** Es la medida de oxígeno disuelto utilizado por los microorganismos en la oxidación bioquímica de materia orgánica a 20° durante 5 días. Determina la cantidad de oxígeno necesario para estabilizar biológicamente la PTAR (González & Saldarriega, 2008).
- **DQO:** Determina la cantidad de sustancias ya sean orgánicas o inorgánicas que pueden ser oxidadas por medios químicos presentes.
- **Grasas y aceites:** Si no se elimina el contenido de grasas en aguas residuales antes del vertido, puede interferir con la vida biológica en aguas superficiales y crear acumulación de materia flotante.
- **Organismos patógenos:** Microorganismos causantes de enfermedades.
- **Oxígeno disuelto:** Son indispensables para la conservación de seres vivos. Depende de la temperatura, presión y presencia de sustancias químicas oxidables en condiciones acuáticas específicas.
- **pH:** Se refiere a la actividad de H⁺. Una concentración inadecuada indica que es difícil su tratamiento por procesos biológicos.
- **Sólidos totales:** suma de los sólidos disueltos y en suspensión que la muestra de agua pueda contener
- **Sólidos suspendidos totales:** Incluyen materiales particulados que pueden ser sedimentables fácilmente.

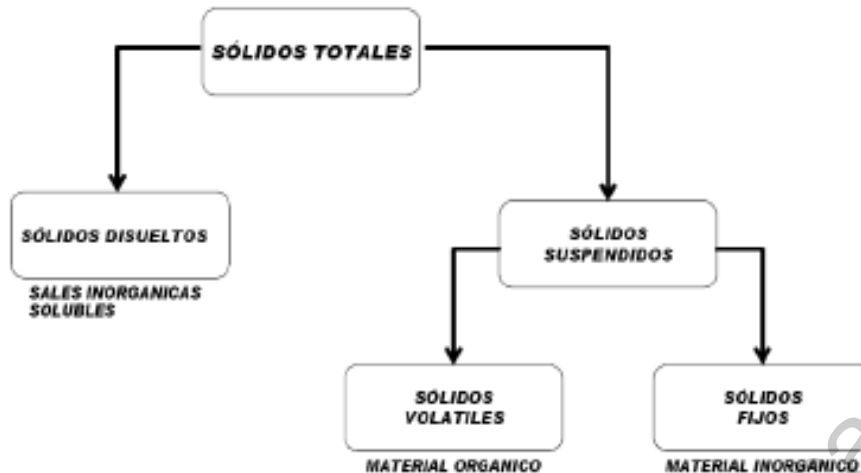


Figura 3. Tipos de sólidos en aguas

Fuente: Sancha-Atuña, 2013

- **Turbiedad:** es causada por finas partículas de mineral en suspensión o de biomasa.
- **Temperatura:** la temperatura de aguas residuales es mayor debido a la energía liberada durante las reacciones bioquímicas que se presentan en la degradación de materia orgánica (Metcalf & Eddy, 2003).

3.6 Biofilm

Se denomina biopelícula o biofilm a la estructura multicapa y tridimensional de microorganismos heterogéneos adheridos a un soporte por interacciones electroestáticas o hidrofóbicas (fuerzas de London – Van der Waals, interacciones estéricas y puentes poliméricos) (Gagliano et al., 2017). Es una estrategia de supervivencia de los microorganismos que les permite establecerse en condiciones hostiles en diversos ambientes.

La formación de la biopelícula está conformada por canales constituidos por polisacaridos extracelulares que permiten el transporte de nutrientes, oxígeno y agua, excreción de sustancias y facilita la comunicación con otras colonias. Permitiendo el desarrollo de nichos bacterianos (Gullicks et al., 2011).

La formación de ésta ofrece a los microorganismos beneficios como: protección ante cambios drásticos en el ambiente, agentes bactericidas y bacteriostáticos u organismos depredadores, escases de alimento, presencia de metales pesados, diferencia de temperatura y pH; así como un medio adecuado para reproducirse (Wojnowska-Baryła et al., 2010).

La composición de una biopelícula está determinada por tres factores principalmente: por la composición del medio, se ha observado que hay una mejor adherencia en superficies ásperas hidrofóbicas, la expansión volumétrica de la biomasa y por el transporte de sustratos hacia el interior de la biopelícula (Gullicks et al., 2011).

Mecanismos intervinientes en la adhesión

- Fuerzas de atracción y repulsión: Cuando hay una distancia entre la bacteria y la célula (10-20nm) se produce una repulsión electroestática que evita la aproximación entre estas y por tanto impide la adhesión. La presencia de estructuras en la superficie de la bacteria ayuda a adherirse a la superficie superando así las fuerzas de repulsión
- Adhesinas y receptores: Adhesina: molécula de la superficie bacteriana que media la adhesión a un receptor ubicado sobre un sustrato. Químicamente estas adhesinas pueden ser: lípidos, ácidos teicoicos o proteínas, por lo general lectinas (proteínas con afinidad por los azúcares). Se encuentran sobre la superficie de las bacterias, y su función es la adherencia ubicándose sobre las fimbrias, fibrillas, pared celular o membrana exterior. La mayoría de las bacterias expresan más de un tipo de adhesinas.
- Fimbrias: Son apéndices que consisten en subunidades de proteínas que están anclados ya sea en la membrana externa de las gram (-) o en la pared de celular de las gram (+). Su principal función es servir como

soporte a las adhesinas encargadas de reconocer a su receptor en la célula hospedera.

- Movilidad bacteriana: Capacidad que tienen las bacterias de desplazarse de un lugar a otro por medio de flagelos con apéndices largos los cuales se encuentran fijos a la célula por uno de sus extremos y libre por el otro. El filamento del flagelo bacteriano está compuesto por subunidades de una proteína denominada flagelina.

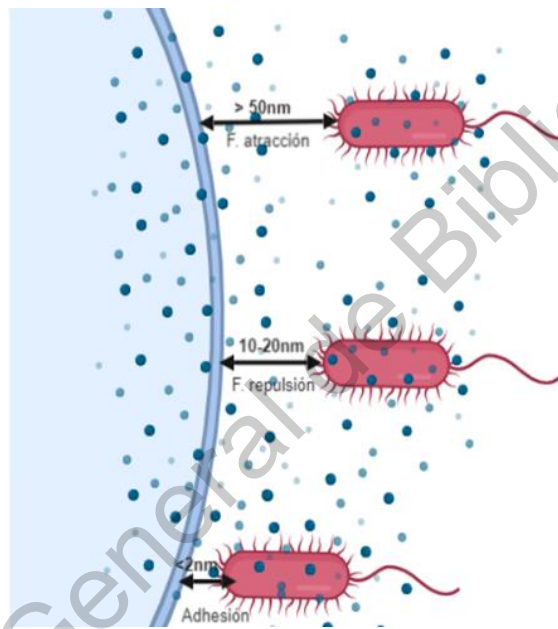


Figura 4. Mecanismos de adhesión bacteriana

Fuente: propia

Mecanismos de adhesión bacteriana

- Adsorción: indica la interacción irreversible entre la superficie de las bacterias y de la superficie de las células.
- Adhesión: forma la unión cerrada estable e irreversible de las bacterias con una superficie de la adhesión bacteriana ocurre cuando moléculas

especializadas que se encuentran en la superficie de las bacterias interactúan o se combinan con otras moléculas presentes.

- Agregación: proceso en el que las células bacterianas se reúnen en estrecho contacto como en la formación de una microcolonia.

3.6.1 Formación de la biopelícula

La formación del biofilm empieza con la acumulación de nutrientes en una superficie debido a la porosidad del material de soporte, interacciones electrostáticas, fenómenos de adsorción y a factores electroquímicos ya mencionados, que permiten un aumento en la concentración de nutrientes.

El desarrollo de una biopelícula comienza con la adherencia; en la cual los microorganismos tienen una percepción de una superficie y se presenta una coagregación de microorganismos asociados y genéticamente diferentes (Bou et al., 2011). Mediante factores externos de su pared celular pueden adherirse a la superficie permitiendo la agregación de diferentes microorganismos a una superficie (Olarde & Cristiano, 2012).

Los microorganismos iniciales que se adhieren son denominados colonizadores primarios encargados de cubrir la superficie totalmente para facilitar la llegada de colonizadores secundarios promoviendo así el desarrollo de los consorcios multiespecies (Loera et al., 2012).

La adherencia será influenciada por el tipo de carga que tenga la matriz de acuerdo al tipo de polisacárido que la conforme.

Posterior a la adhesión se lleva la etapa de unión irreversible; mediante el aumento considerable de microorganismos y la expresión de genes se lleva la elaboración de la matriz de polisacáridos extracelulares la cual contiene proteínas, minerales y ADN que recubren colonias que refuerzan la adhesión celular.

La última etapa es el desprendimiento de la biopelícula. En el cual hay una liberación de células la cual permite la propagación hacia nuevos espacios.

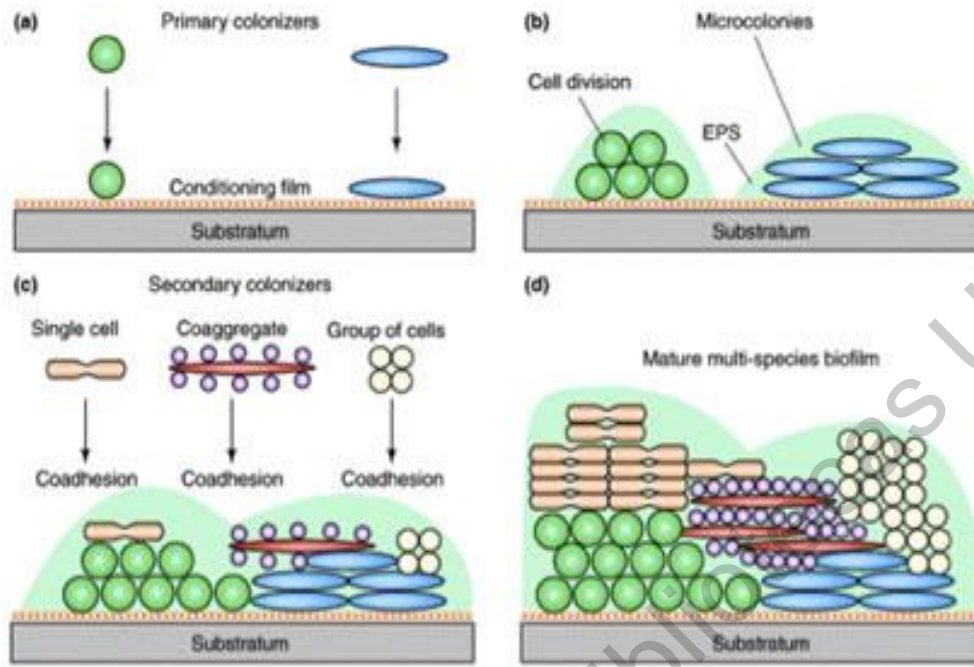


Figura 5. Ensamblado bacteriano para la formación de biofilm

Kaplan et al., 2003 considera la formación de la biomasa en el soporte se lleva a cabo mediante cinco etapas:

- a. Adaptación de la superficie por adsorción de materia orgánica
- b. Transferencia de nutrientes al sitio de adherencia
- c. Inicio del proceso de adhesión de los microorganismos
- d. Crecimiento celular y colonización
- e. Liberación de células localizadas en la periferia

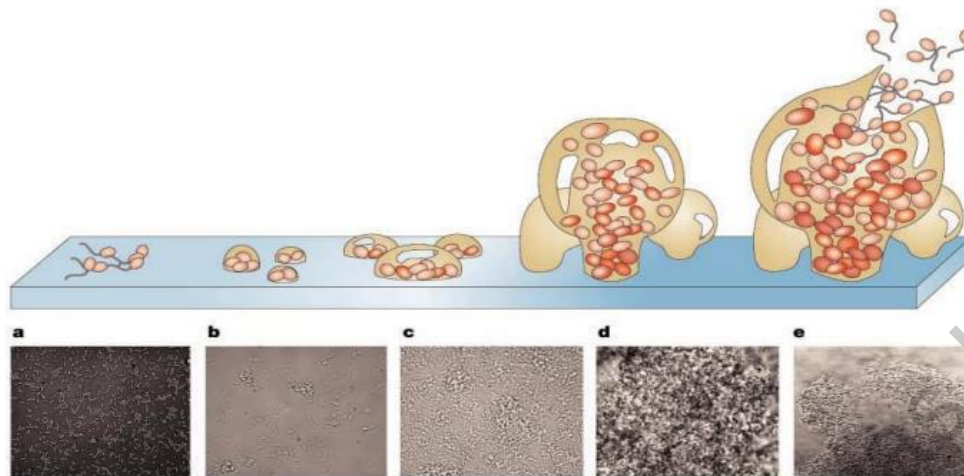


Figura 6. Formación de la biopelícula

Fuente: Kaplan et al., 2003

3.6.2 Formación de Matriz extracelular

Es constituida por polisacáridos sintetizados por microorganismos asociados a la biopelícula. Una biopelícula está constituida por 10% bacterias y 90 % matriz polisacárida.

El crecimiento de la matriz está regulado por distintas vías. Como es Quorum Sensing (QS) que coordina la expresión de genes encargados del comportamiento de las comunidades bacterianas a través de moléculas de señalización, dando paso al proceso de formación de canales, accesos de nutrientes, eliminación de sustancias, comunicación con otras colonias y maduración de la biopelícula.

Estas comunidades microbianas pueden formarse albergando un conjunto de microorganismos de distintos géneros, gracias a dos tipos de comunicación regulados por QS. Siendo el primero de estos diferente para las gram (-) y (+) donde los autoinductores serán moléculas de señalización denominadas AHL (acil homoserina lactona) para las gram (-), mientras que las gram (+) emplearán oligopéptidos. Estos autoinductores permiten censar la población bacteriana y establecer fenómenos dependientes de la densidad celular. El segundo sistema es

para la comunicación interespecífica; que permite a distintas especies bacterianas trabajar en comunidades para realizar una función establecida por medio de la molécula Ar^2 . Así como la contribución de otros mecanismos TCS y ECF, utilizados por las bacterias para el monitoreo de nutrientes, iones, temperatura y adaptabilidad (Loera et al., 2012).

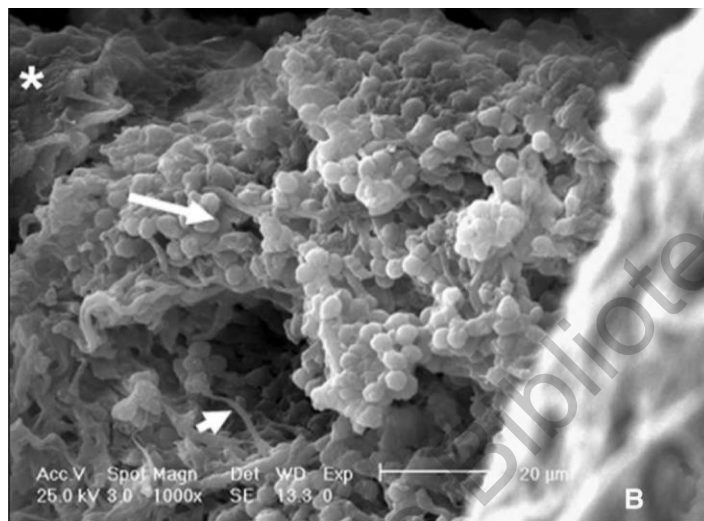


Figura 7. Microscopia Electrónica de Barrido de un biofilm

Fuente: Ramírez-Camacho *et al*; 2007

3.6.3 Composición microbiana del biofilm

La elección de microorganismos se origina como resultado de condiciones ambientales, bióticas; como las interacciones de los microorganismos entre si y condiciones abióticas como son pH, temperatura, cantidad de nutrientes, tipos de contaminantes y tiempos de retención (Torres & Pérez, 2010; Cydzik-Kwiatkowska & Zielin´ska, 2016).

La formación de consorcios microbianos varía en función que el afluente fluye a través del reactor con afluentes con una alta carga orgánica, hay una proporción entre gram positivas y gram negativas, cuando la carga orgánica decrece predominan las gram negativas. En etapas iniciales del proceso se desarrollan poblaciones de bacterias del tipo filamentosas y no filamentosas, en

etapas subsiguientes crecen poblaciones de bacterias nitrificantes junto a protozoos y rotíferos (Carreón-González, 2008).

Mediante un quorum regula los procesos de comunicación y logra coordinar un comportamiento a través de moléculas de señalización regula cambios para dar paso a la maduración mediante el control de la formación de canales y estructuras que permiten el transporte y garantizan la entrega eficiente de nutrientes a los microorganismos.

De acuerdo a las propiedades metabólicas estas se pueden clasificar en (Kim *et al.*, 2013):

- **Bacterias nitrificantes:** La nitrificación es un proceso biológico en dos etapas, que comprende nitrificación y nitratación, llevados a cabo por bacterias oxidantes de amonio (ABO) y bacterias oxidantes de nitrito (NBO) respectivamente (Hubaux & Wells, 2015). Estudios han determinado que los principales géneros son: *Nitrosomas* y *Nitrobacter* (Cyzdik-Kwiatkowska & Zielińska, 2016). en estudios moleculares de cuantificación se han encontrado especies como *Nitrosococcus mobilis*, *Nitrosomas europea*, *Nitrosoma oligotropha* (Sancha-Antuña, 2013) en plantas de tratamiento de agua residual.
- **Bacterias desnitrificantes:** La desnitrificación es la reducción de nitrato o nitrito a compuestos de nitrógeno gaseoso tales como NO, N₂O y N₂. Las bacterias desnitrificantes generalmente se extienden a través de varios géneros de *Protobacterias* (Kim *et al.*, 2013), incluyendo *Alcaligenes*, *Pseudomonas* (Huijie *et al.*, 2014)
- **Bacterias heterótrofas aerobias:** Encargadas de la degradación y la mineralización de compuestos orgánicos. Los principales géneros presentes en PTAR *Zoogloea*, *Bacillus*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas* (Erijman *et al.*, 2011; Ferrera 2016).

- **Bacterias acumuladoras de fósforo:** Tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de fósforo se lleva a cabo mediante. Principal género *Acinobacter* (Erijman et al., 2011. (Cyzdik-Kwiatkowska & Zielińska, 2016))
- **Bacterias oxidantes de sulfuro:** son bacterias filamentosas como *Thiobacillus*, *Beggiota*, *Thiothrix* (Ma et al., 2013).

Tabla 1. Géneros de bacterias involucradas en el tratamiento de agua aerobio

Género de bacterias	Función
Pseudomonas	Eliminación de carbohidratos, producción de lodo y desnitrificación
Zooglea	Formación de flóculos
Bacillus	Degradación de proteínas
Arthrobacter	Degradación de carbohidratos
Microthrix	Degradación de grasas, crecimiento de filamentos
Nocardia	Crecimiento de filamentos y formación de espumas
Acinetobacter	Eliminación de fósforo
Nitrosomas	Nitrificación
Nitrobacter	Nitrificación
Achromobacter	Desnitrificación

Fuente: Ferrera 2016

3.6.4 Crecimiento bacteriano

Las bacterias se pueden reproducir por fisión binaria, en forma sexual, o por expansión. Generalmente estas bacterias se reproducen por fisión, estos son, por división la célula viene a ser dos nuevos organismos. El tiempo requerido para cada fisión, que es llamado el tiempo de generación, puede variar desde varios días hasta menos de 20 minutos. El crecimiento de estas se lleva por medio de cuatro fases que se describen a continuación:

1. La fase de aclimatación: durante este periodo las bacterias crecen lentamente, debido a que éstas inicialmente deben aclimatarse a las condiciones del medio de cultivo.
2. Fase de aclimatación con crecimiento: En este tiempo las células se dividen y multiplican en función del tiempo de generación de esta especie y en función de su capacidad para procesar alimento.
3. Fase estacionaria: En esta fase la población permanece más o menos estacionaria y constante. Esto se debe a: (a) las bacterias han consumido el sustrato y/o los nutrientes que se encontraban inicialmente; (b) el crecimiento de nuevas células es contrarrestado por la muerte de las células existentes.
4. Fase de extinción o fase endógena: Los microorganismos son obligados a metabolizar su propio protoplasma. No hay reposición de la materia empleada dado que el alimento es escaso. En esta fase ocurre un fenómeno que se conoce como lisis; este consiste en la liberación de las células muertas de los nutrientes que ellas contienen. Estos nutrientes son empleados por las células que sobreviven y durante esta fase la razón de incremento de nuevas células es mucho menor a la velocidad de muerte y desactivación de las células originales. La curva presentada en esta fase es inversa a la que se observa en la fase 2.

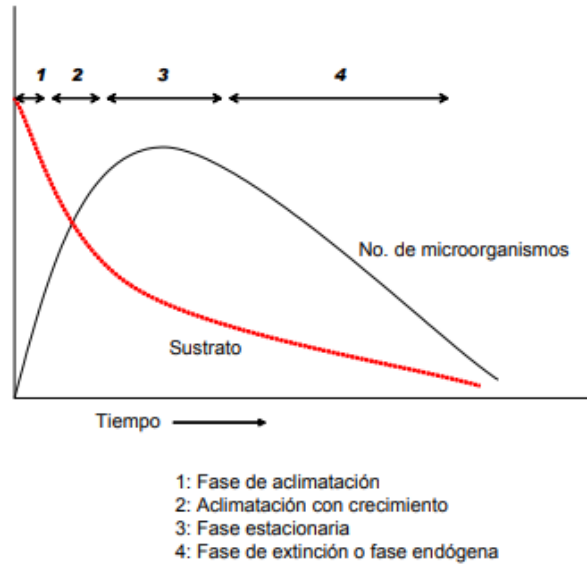


Figura 8. Curva de crecimiento de microorganismos en función del tiempo

Fuente: Metcalf & Eddy, 2013

Reproducción de microorganismos

- Crecimiento logarítmico en cultivo por lotes: la velocidad de crecimiento es directamente proporcional a la concentración de células.
- Crecimiento con sustrato limitado: Cuando el sustrato comienza a escasear el cultivo de microorganismos termina de crecer.

En los sistemas biológicos reales se encuentran consorcios microbianos mixtos, compuesto de diversas especies bacterianas, así como de otros microorganismos. Todas y cada una de ellas están íntimamente relacionadas y cada organismo en el sistema tiene su particular curva de crecimiento. La forma y posición de la curva de crecimiento depende además de la especie, de factores tales como: tipo de sustrato, pH, temperatura, y si el sistema es aeróbico o anaeróbico. Sin embargo, se considera a las bacterias como el componente más importante en la estabilización de aguas residuales, así como las encargadas de la formación de la biopelícula.

3.7 Caracterización por técnicas moleculares

Los estudios microbiológicos tradicionales se basan en función de sus características metabólicas, bioquímicas y morfológicas. Aproximadamente el 1% de las bacterias en un hábitat dado crecerán en cultivo por lo tanto es necesario nuevas técnicas para la clasificación de estas. Es donde las técnicas moleculares son esenciales para definir especie para su caracterización genotípica y fenotípica.

Desde el desarrollo de la Metagenómica, también conocida como genómica ambiental se ha ampliado el conocimiento sobre el número de nuevas especies en diferentes hábitats (Ma *et al.*, 2013). Estudios sobre estimaciones ecológicas y moleculares proponen que las especies conocidas de organismos procariontes son solo una pequeña parte de la diversidad que realmente existe (Erijman *et al.*, 2011).

A mediados de la década de 1980 comenzaron los estudios filogenéticos en microbiología, basados en ARNr que en la actualidad nos permiten la identificación bacteriana (Wang *et al.*, 2007)

El uso de técnicas moleculares ha permitido la identificación de numerosos microorganismos potencialmente relevantes para el tratamiento de efluentes sin la necesidad de aislarlos (Sanz & Köchling 2007).

El aplicar de técnicas moleculares se ha utilizado para evaluar el impacto de los consorcios bacterianos en distintos factores físicos y químicos, como correlación de la estructura bacteriana con la intensidad de aireación reactor (Ma *et al.*; 2012). Los efectos de la temperatura en comunidades bacterianas de biorreactores en el estudio de Mieczkowski *et al.*; 2016. Así como el impacto de del amoníaco y carga de carbono orgánico en comunidades oxidantes de amoníaco en la investigación de Cydzik-Kwiatkowska *et al.*; 2016.

También es posible controlar la actividad de los microorganismos introducidos en los sistemas de lodo activado a fin de eliminar contaminantes específicos (Valeriano-Zapana & Gonzales-Limache, 2016) como eliminación de fenoles (Moreno-Andrade & Buitrón, 2008)

Ventajas:

- Estudios taxonómicos muy precisos y arboles filogenéticos de alta resolución.
- Gran especificidad. La utilización de primers que reconocen una secuencia propia de cada organismo.
- Identificación de microorganismos que aún no han sido cultivados o identificados.

Desventajas:

- Requiere mucho tiempo y es laborioso.
- La extracción de un grupo de ADN representativo de la comunidad microbiana puede ser difícil cuando se trabaja con ciertos tipos de muestra.
- Muchos clones deben secuenciarse para garantizar que la mayoría de las especies individuales de la muestra estén cubiertas (Bou *et al.*, 2011. Xiuheng *et al.*, 2009).

3.7.1 Biomarcador ARNr 16S

La mayoría de las técnicas moleculares usadas para estudios de diversidad microbiana están basados en la amplificación de una secuencia blanco. La caracterización de los genes codificantes de proteínas permite el seguimiento del estado del proceso de tratamiento. La comprensión de las distribuciones de genes funcionales de los microorganismos información más precisa de la biomasa basándose en el gen ARNr 16S (Xia *et al.*, 2014; Torres & Pérez, 2010)

ARNr 16S es un polirribonucleotido de aproximadamente 1500 nucleótidos, codificado por el gen ADN ribosomal 16S incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Valenzuela *et al.*, 2015). Se encuentra en todos los procariontes, con regiones conservadas y regiones variables, contiene nueve regiones (V1-V9). Regiones conservadas aportan información para la amplificación de las diversas regiones hipervariables (Munawar *et al.*, 2013).

Lo anterior permite que el ARNs 16S contenga la suficiente variabilidad para diferenciar entre especies, cepas o variedades. Esta característica permite ser utilizado como biomarcador. Permite obtener información filogenética y taxonómica de la diversidad bacteriana de muestras ambientales (Xiuheng *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2014).

Este marcador ha sido extensamente usado dado que está presente y tiene la misma función es los microorganismos bacterianos, mantiene una transferencia de genes vertical, la longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado para proporcionar suficiente información.

El análisis de biodiversidad basado en amplificaciones ARNr 16S se puede llevar a cabo por dos estrategias: analizar el perfil de la diversidad de la comunidad y/o analizar su composición taxonómica.

Suele utilizarse el 97% de similitud entre secuencias nucleótidas para definir un OTU, para agrupar secuencias OTU se utilizan métodos aglomerativos, divisivos y de partición.

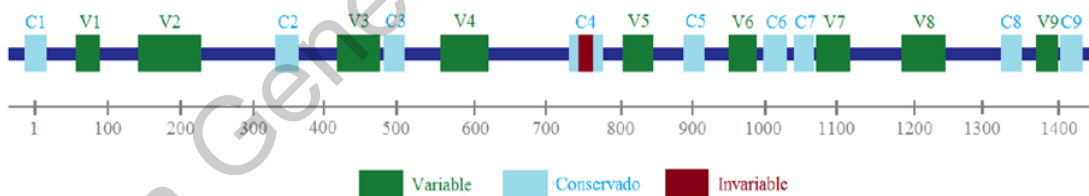


Figura 9. Representación esquemática del gen 16S ARNr, indicando las regiones variables (V1-V9), conservadas (C1-C9) e invariable.

Fuente: Izquiero-Altarejo, 2015

Permite la detección de fragmentos de DN que se encuentran en poca cantidad en muestras ambientales (amplificación).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica ca de ADN

durante varios ciclos repetidos (Man *et al.*, 2012), la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Wang *et al.*, 2012)

Esta técnica se lleva a cabo en tres etapas principalmente (Ibarbalz, 2016):

- Desnaturalización: Las cadenas de DNA son calentadas para ser separadas y obtener una hebra sencilla de DNA.
- Hibridación: DNA polimerasa utiliza a la cadena sencilla de DNA para sintetizar una nueva cadena, los primers previamente diseñados se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria
- Extensión: Mediante ciclos repetitivos de calentamiento y enfriamiento, se sintetizan las secuencias complementarias del DNA, obteniendo un elevado número de copias (Prado-Carrascal, 2016).

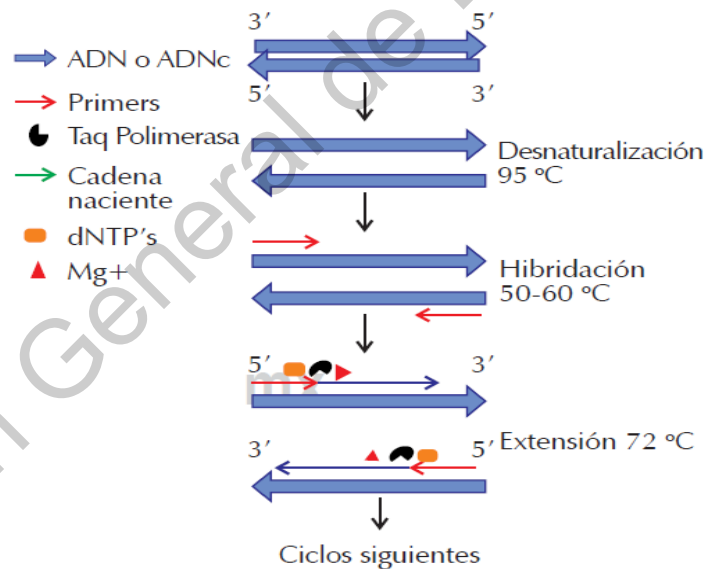


Figura 10. Esquema etapas de PCR (Desnaturalización, Hibridación, Extensión)

Fuente: Sancha-Antuña, 2013

Para la elección de primers se deben considerar criterios como: el tamaño (20-25 nucleótidos), temperatura de fusión, similitud para aparearse con el molde

de DNA El resultado de la PCR es una mezcla de los genes de 16S ARNr presentes en la muestra. La secuenciación consiste en la determinación del orden preciso de los nucleótidos de los 16S ARNr (Sancha-Antuña, 2013) Para el análisis de OTU's se utilizan bases de datos (Erijman *et al*, 2011).

3.7.3 Secuenciación y Amplificación

Las secuencias obtenidas pueden ser clasificadas taxonómicamente o para reconstrucciones filogenéticas Se requiere hacer la secuenciación de los ADN 16S, para esto es necesario multiplicar el número de copias de ADN de dicha molécula y comparar las secuencias obtenidas con unas ya conocidas de los mismos genes presentes en base de datos, obteniendo así la huella génica de la comunidad microbiana.

Una vez obtenida la secuencia se introduce a bases de datos con el objetivo de identificar las especies bacterianas mediante la comparación con otras secuencias depositadas en estas bases. Para lo cual el proceso cuenta de tres secciones principales:

1. Control de calidad: Se busca comprobar si hay errores en la secuencia, eliminar bandas dobles y la formación de quimeras.
2. Alineación y análisis de la similitud de las secuencias: agrupar las secuencias en OTU (Unidad Taxonómicas Operativas) se completa con la comparación con secuencias conocidas y la determinación del índice de similitud.
3. Determinación de la posición taxonómica: las secuencias se introducen en bases de datos que permiten clasificar dentro de unos de los grupos en base a las secuencias del gen ARNr 16S. herramientas bioinformáticas también permiten obtener una representación gráfica donde se visualizan las relaciones evolutivas entre los organismos presentes según el grado de similitud y sus distancias taxonómicas.

IV. HIPÓTESIS

La presencia del soporte PET en un reactor de lecho fijo aerobio permitirá la formación de un biofilm a partir de un inocuo en suspensión y esto afectará la estructura poblacional teniendo un efecto en la eficiencia del reactor.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar las comunidades bacterianas establecidas en un biofilm de un reactor aerobio de lecho fijo con soporte PET.

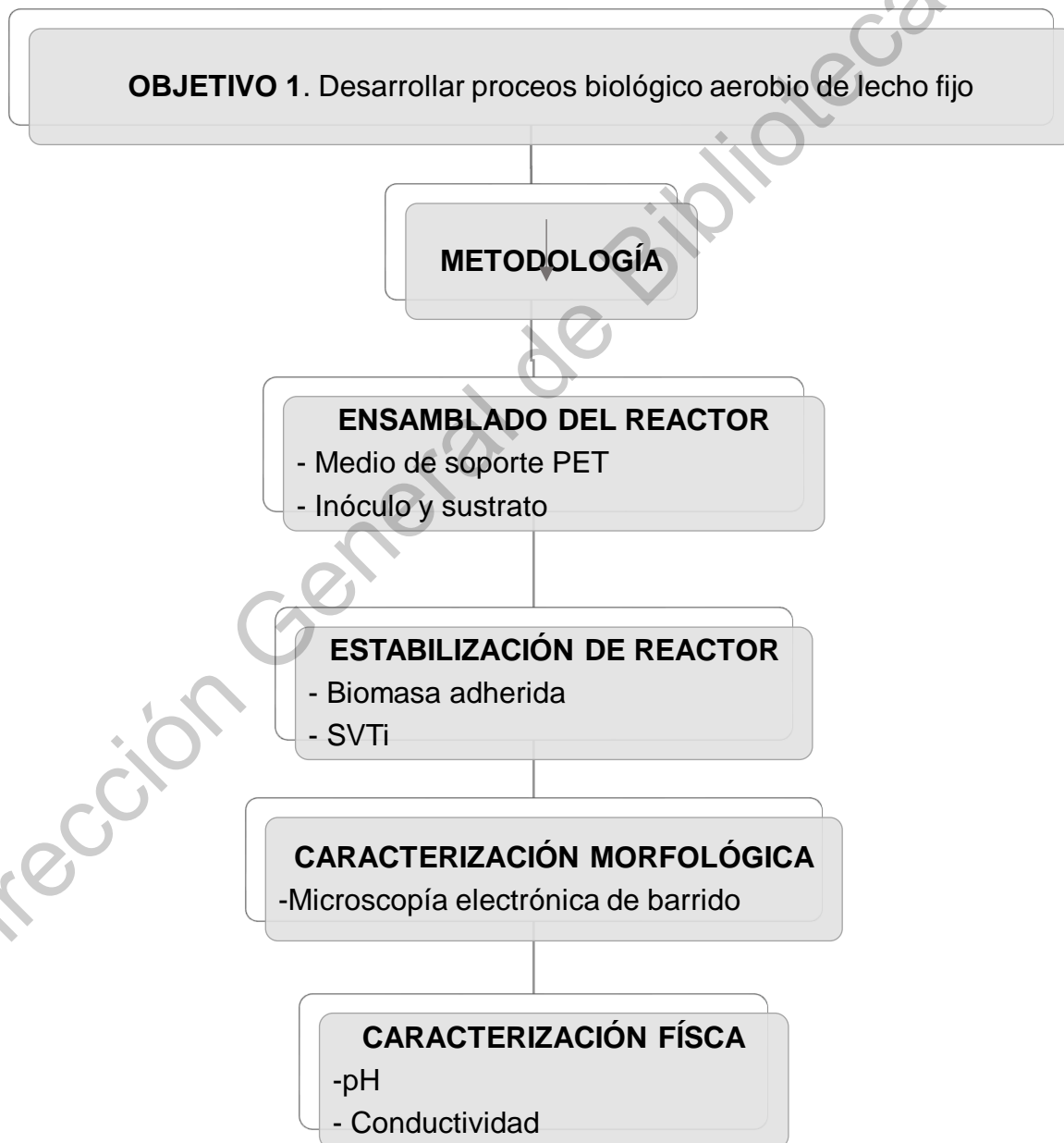
5.2 Objetivos específicos

- Desarrollar proceso biológico aerobio de lecho fijo.
- Evaluar la eficiencia del proceso biológico mediante parámetros de calidad de agua y factores biocinéticos.
- Identificar bacterias en el biofilm en las diferentes etapas de los procesos mediante el biomarcador ARNr 16S

VI. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos marcados, la metodología se dividió en tres etapas: desarrollo del reactor biológico, evaluación de la eficiencia del proceso e identificación de comunidades bacterianas.

6.1 Desarrollo de reactor biológico aerobio de lecho fijo



6.1.1 Reactor (Sistema de lecho fijo FBBR)

Se utilizó un reactor aerobio de lecho fijo acorde a la figura 11. El cual estuvo compuesto por un tanque de acrílico con un volumen de 73.4litros, tres válvulas: para entrada del afluente, salida de efluente y purga de biomasa, cuatro difusores con dos bombas de aireación en el fondo del tanque para suministrar oxígeno, así como una rejilla de pretratamiento. Las características y manejo del reactor se muestran en la tabla 2.

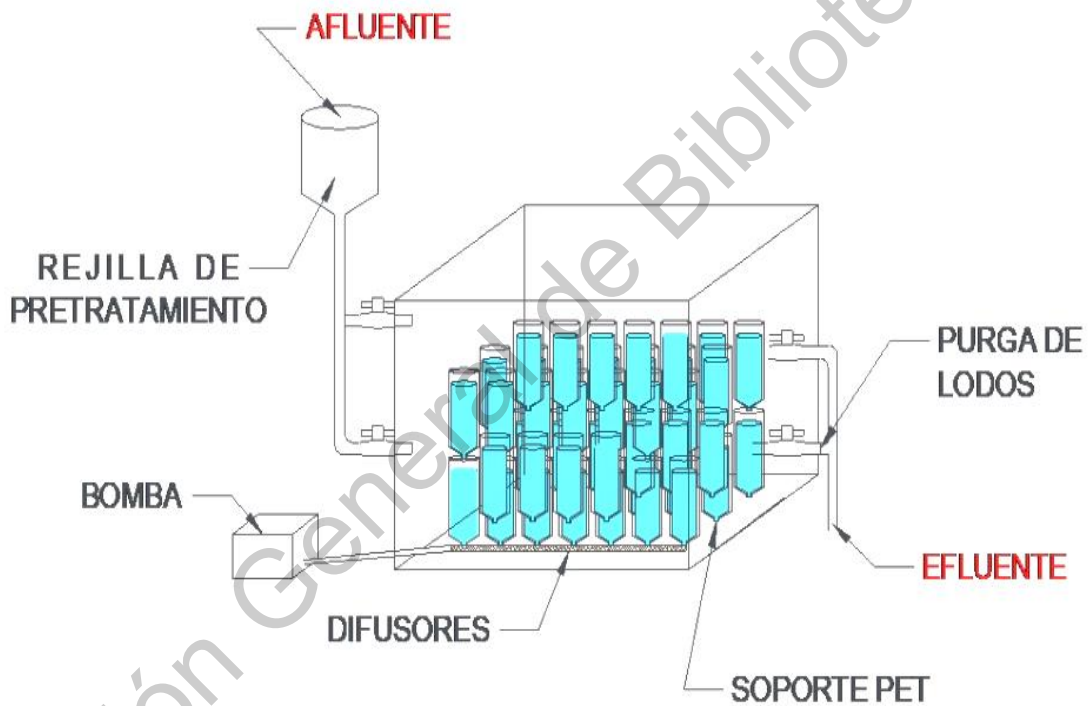


Figura 11. Esquema de un reactor aerobio con lecho fijo

Tabla 2. Características físicas del reactor

	Características
Rejilla pretratamiento	Malla: 100 Apertura: 0.149mm
Tanque	Material: Acrílico Dimensiones: 59cm x 42cm x 30cm Volumen: 73.4 l Volumen de trabajo: 60l
Aireación	Difusores tipo pecera Oxígeno disuelto: 3-4 mg l ⁻¹
Válvula de bola	Diámetro: 1.5 in Flujo: 3.95 seg l ⁻¹
Soporte	Material: Botellas PET Área de contacto: 84 botellas

6.1.2 Medio de soporte PET

El crecimiento de la biopelícula se estudió en un soporte de Polietileno Tereftalato (PET) provenientes de botellas de agua embotellada para consumo humano de volumen de 1000 ml y 500ml. Cada una fue lavada, para posteriormente lijarlas para modificar las características de la superficie para facilitar la adherencia y por último perforadas para permitir el flujo del afluente y la bomasa.

Se ensamblo el soporte constituido por 22 columnas unidas entre sí, para lo cual se colocó una botella de 500m dentro de una botella de 1000ml, teniendo un total de 42 botellas de 1000ml y 42 de 500ml como se puede observar en la figura 8.



Figura 12. Ensamblado del medio de soporte PET

El área de contacto del soporte se determinó mediante las siguientes fórmulas:

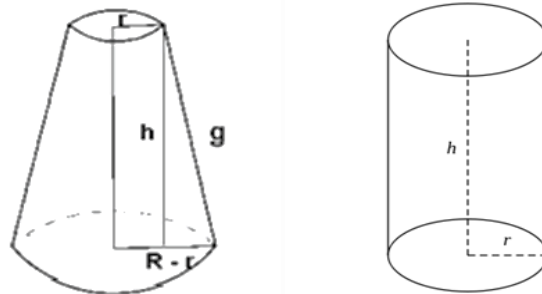


Figura 13. Esquema cono trunco y cilindro para obtención de área

a. área de contacto de un cilindro:

$$A_c = b x h = (2\pi r) (h) \quad \text{Ec. 2}$$

b. área de contacto en cono trunco:

$$A_{\text{Total}} = [g [R+r] + R^2 + r^2] \quad \text{Ec. 3}$$

$$A_{\text{Lateral}} = \pi [R+r] g \quad \text{Ec. 4}$$

$$g = \sqrt{h^2 + (R-r)^2} \quad \text{Ec. 5}$$

$$g^2 = h^2 + (R-r)^2 \quad \text{Ec. 6}$$

6.1.3 Inocuo y sustrato

El inóculo inicial fue 6 litros de lodos activados nativos de la planta de tratamiento de agua residual (PTAR) del edificio de Laboratorios de UAQ campus AEROPUERTO.

El sustrato empleado fue agua residual doméstica de la misma PTAR. La fase aclimatación de la biomasa consistió en adicionar 10 litros al reactor hasta obtener un volumen de 60 litros. Posterior a esto comenzó la fase de adaptación y estabilización: donde el sistema fue operado de manera batch, alimentado con 60 litros de sustrato. Tomando parámetros de calidad de agua, monitoreándolo durante 150 días.

6.1.3 Biomasa adherida

Mediante la superficie específica se determinó la cantidad de biomasa adherida al soporte PET de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S_e = A_c / V \quad \text{Ec. 5}$$

Donde:

S_e = superficie específica

A_c = área de contacto (m^2)

V = volumen útil del reactor (m^3)

6.1.4 Determinación de microorganismos presentes en el biofilm

Los sólidos volátiles inmovilizados (STVi) establecen indirectamente la cantidad de microorganismos presentes en la biomasa (Metcalf y Eddy, 2003).

SVTi fueron determinados acuerdo al protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos (2007) el cual se describe a continuación:

Muestreo: se tomaron 3 muestras del biofilm de un área de 1cm^2 . La biomasa recolectada fue colocada en capsulas de porcelana a peso constante y secadas en horno a una temperatura de $105\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5h, una vez se enfrió la capsula se registró su peso. Las capsulas de colocaron en la mufla por 5 h a $550\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ y una vez frías de registro nuevamente el peso.

Para determinar la cantidad de ST y STVi se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$STT = \frac{W_2 - W_1}{m}$$

Ec. 6

Dónde:

$W_2 =$ Peso capsula más lodo seco a $105\text{ }^\circ\text{C}$

$W_1 =$ Peso capsula vacía

$m =$ peso lodo húmedo

$$STV = \frac{W_3 - W_2}{m}$$

Ec. 10

Dónde:

$W_2 =$ Peso capsula más lodo calcinado a $550\text{ }^\circ\text{C}$

$W_1 =$ Peso capsula vacía

$m =$ peso lodo

6.1.6 Características físicas del biofilm

Para monitorear las propiedades físicas el inocuo inicial al biofilm se determinó pH y conductividad eléctrica en las tres etapas del reactor. Siguiendo el protocolo de suelos y lodos 2007. Los cuales se citan a continuación.

a. pH

En un vaso de precipitado se pesó 10g de la biomasa, se adicionó 50ml de agua destilada a una temperatura entre 20°C y 25°C. Se agitó vigorosamente la suspensión durante 5 minutos usando un agitador magnético y se dejó reposar 2h. Se introdujo el electrodo ya calibrado para leer el pH y temperatura una vez ya estabilizada la lectura.

b. Conductividad eléctrica

Se pesó 10g de muestra en un vaso de precipitado de plástico y se le adicionó 50ml de agua destilada a una temperatura de 20°C±1°C, se mantuvo en agitación durante 30 min. Posterior a esto se filtró, al filtrado por medio de electrodo calibrado se obtuvo la conductividad eléctrica.

6.1.7 Caracterización morfológica del biofilm

Para comprobar la formación del biofilm al soporte y conocer la morfología se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido, el cual se realizó en el Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), Laboratorio de Microscopía electrónica de la UNAM Juriquilla Querétaro.

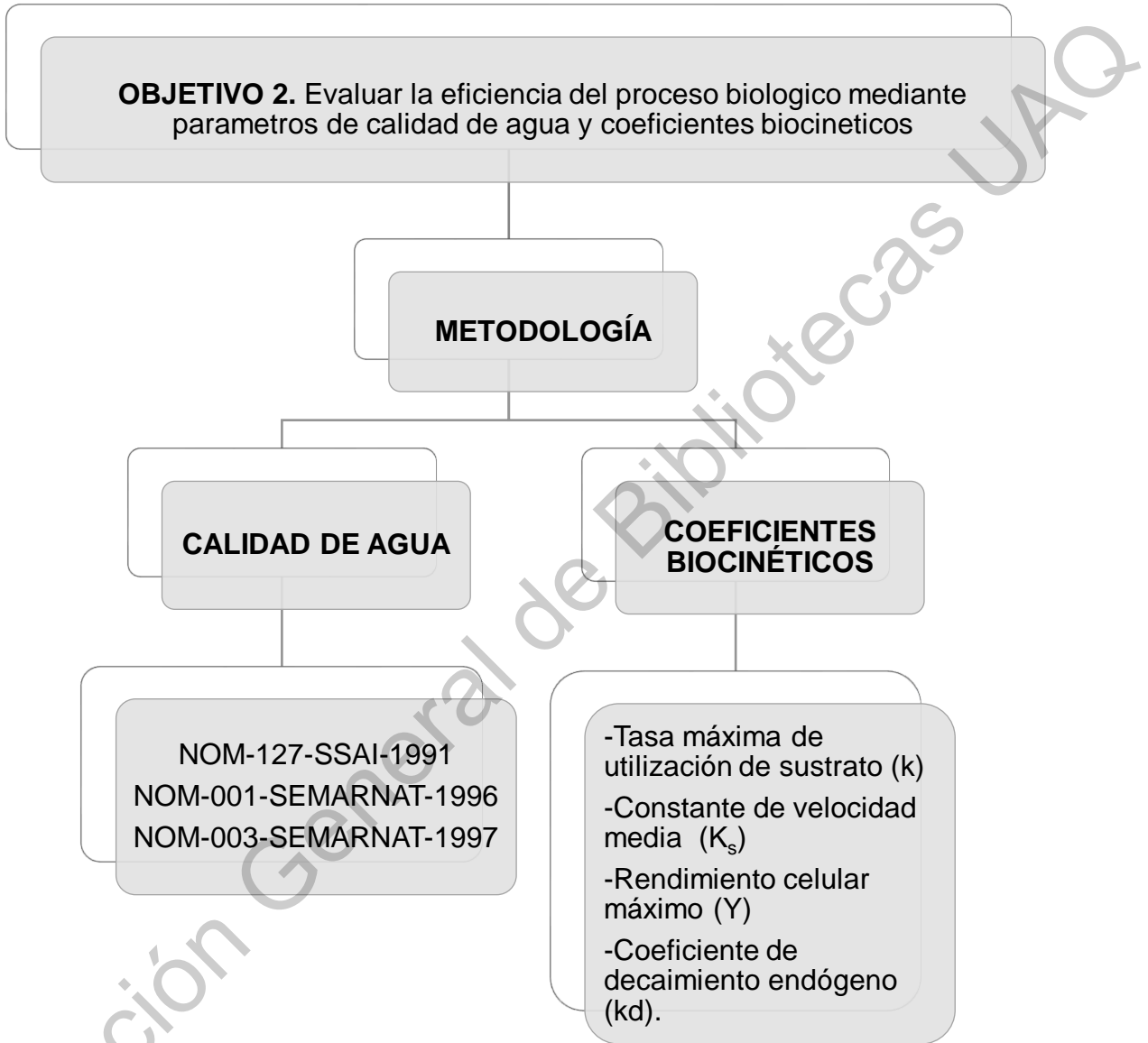
La recolección de la muestra fue la siguiente: Se cortó un trozo del soporte de superficie 1cm² el cual se colocó en un portaobjeto y fue asperjado con agua etanol y agua proporción 1:1 y se dejó secar en una campana de extracción para su posterior análisis.

Para el análisis se empleó un Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6060 LV. La muestra se montó sobre un soporte de aluminio adherido con cinta doble cara carbón, se recubrió con oro en un EMS 550 Sputter coater, 2 ciclos de 5 minutos.

La prueba se llevó bajo las siguientes condiciones: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de electrones secundarios con voltaje de aceleración 10 y 20 kV, alto vacío.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6.2 Evaluación de la eficiencia del reactor



6.2.1 Parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua

La eficiencia del reactor fue evaluada mediante parámetros de la calidad del agua (afluente vs efluente) monitoreando el reactor durante 150 días. Los parámetros evaluados fueron los establecidos en las NOM 003 SEMARNAT 1997, NOM 001 SEMARNAT 1996 y NOM 127 SSAI 1994 siguiendo la norma correspondiente (tabla 3, 4 y 5).

Tabla 3. Parámetros de calidad del agua en base a la NOM-127-SSA1-1991

PARÁMETRO	METODOLOGÍA	NORMA
Color	Platino cobalto	NMX-AA-045
Turbidez	Dispersión	NMX-AA-038
pH	Potencioeléctrico	NMX-AA-008
Coliformes totales	Número más probable	NMX-AA-042

Tabla 4. Parámetros de calidad de agua en base a NOM-c

PARÁMETRO	METODOLOGÍA	NORMA
Temperatura	Visual	NMX-AA-007-SCFI-2013
Sólidos Disueltos Totales	Gravimétrico	NMX-AA-034
Demanda Química de Oxígeno	Reflujo abierto	NMX-AA-030
Demanda Bioquímica de Oxígeno	Inoculación por diluciones	NMX-AA-028
Oxígeno Disuelto	Electrométrico	NMX-AA-012-SCFI-2001

Tabla 5. Parámetros de calidad de agua en base a NOM-003-SEMARNAT-1997

PARÁMETRO	METODOLOGÍA	NORMA
Coliformes fecales	Número más probable	NMX-AA-042
Huevos de Helminto	Observación	NMX-AA-113-SCFI-1999
Grasas y aceites	Soxhlet	NMX-AA-005-SCFI-2000

6.2.2 Coeficientes biocinéticos

Para evaluar la estabilización de la biomasa, se determinaron los coeficientes biocinéticos, los cuales indican el crecimiento de la biomasa, la tasa de utilización del sustrato, la relación alimento-microorganismos y el tiempo medio de retención celular.

- Tasa máxima de utilización de sustrato (k) y la constante de velocidad media (K_s)

Ecuación para calcular K_s :

$$\frac{\theta X}{S_0 - S} = \frac{K_s}{kS} + \frac{1}{k}$$

Ec. 7

Donde:

θ = tiempo de retención hidráulico (h)

X = mg SSVML/L/h

S_0 = concentración de DQO soluble en afluente, mg/L

S = concentración de DQO soluble en efluente, mg/L

k = tasa máxima de utilización de sustrato, (h)

K_s = constante de velocidad media (mg/L)

- Rendimiento celular máximo (Y) y el coeficiente de decaimiento endógeno (k_d).

Ecuaciones para calcular Y y k_d :

$$\frac{1}{\theta_c} = Y \frac{S_0 - S}{X\theta} - k_d$$

Ec. 8

Donde:

Y = rendimiento celular máximo

k_d = coeficiente de decaimiento endógeno, h^{-1}

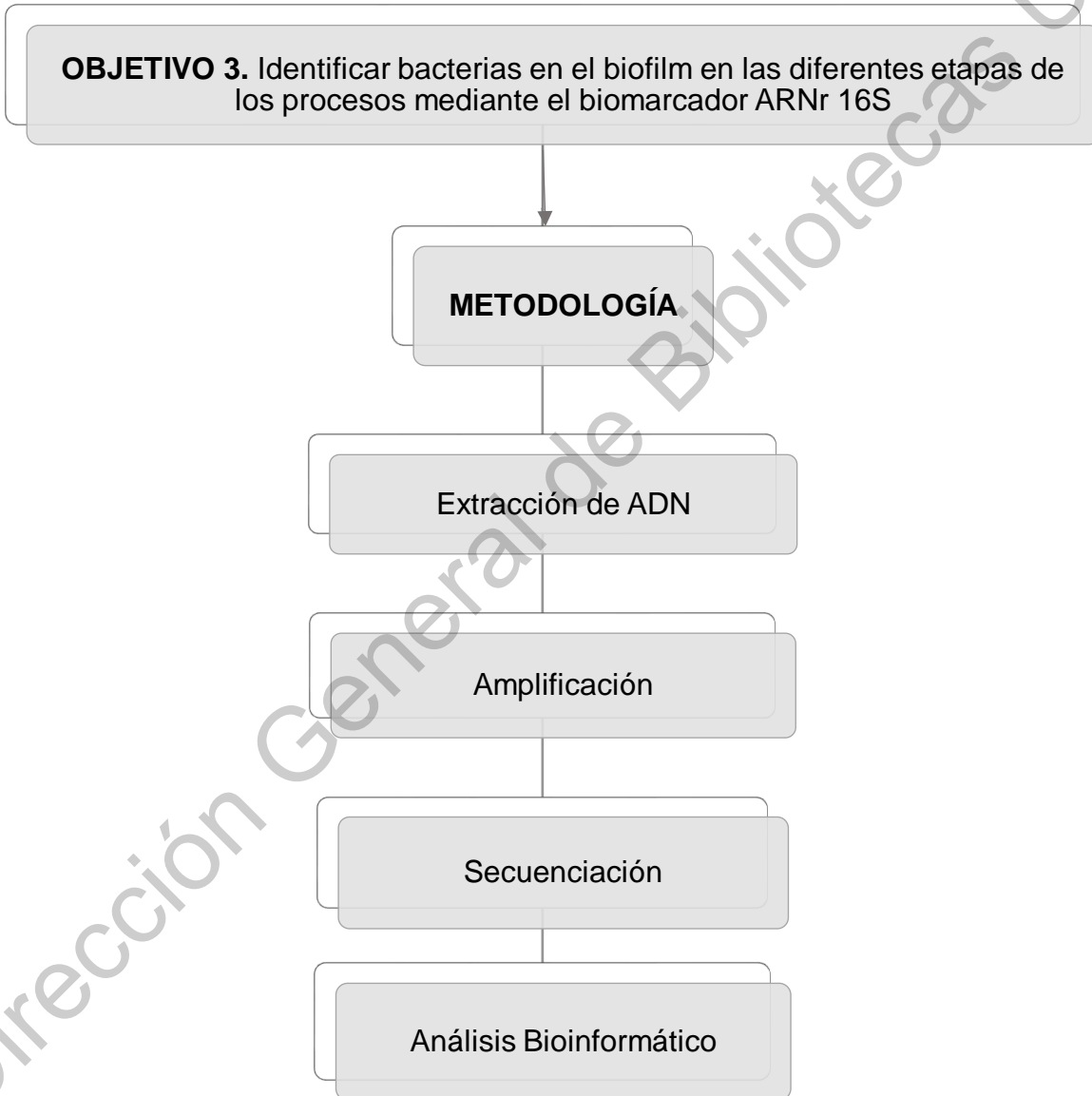
Tabla 6. Coeficientes biocinéticos para lodos activados

Coeficiente	Unidades	Rango	Valor típico
K	g bsDQO/gSSV*d	4-12	6.0
K_s	mg/L bsDQO	5.0-30.0	15.0
Y	mg SSV/ mg DQO	0.40-0.80	0.45
K_d	g SSV/g SSV*d	0.02-0.15	0.10

Fuente: Crites, 2000

6.3 Identificación de comunidades bacterianas

Para caracterizar la variación de la estructura de las comunidades bacterianas partiendo de un inóculo en suspensión hasta llegar a la formación del biofilm se realizó en base al biomarcador ARNr 16S.



6.3.1 Muestreo y almacenamiento

Se realizaron 3 muestreos, para cada uno se tomó 3 soportes (3 muestras biológicas) del centro y los costados del reactor. Las especificaciones del muestreo se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 7. Días de muestreo biomasa

Fase	Día
Inóculo inicial	1
Adaptación	20
Estabilización	120

El biofilm fue desprendido y homogenizado con una espátula estéril. Las muestras fueron almacenadas en frascos estériles libres de RNAasas y DNAasas. Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su posterior análisis.

6.3.2 Extracción de DNA

La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras obtenidas descritas anteriormente, utilizando el kit DNA Power Soil (MO BIO Laboratories, Inc.) siguiendo el protocolo del fabricante.

6.3.3 Verificación de productos de la extracción de ADN

La verificación de purificación de ADN se realizó mediante electroforesis, utilizando 3µL de ADN en gel de agarosa al 1%, la electroforesis se realizó a 90V durante 60min. El gel se visualizó en un transluminador de UV.

6.3.4 Amplificación y Secuenciación

El análisis metagenómico fue dirigido al biomarcador ARN ribosómico 16S para procariontes. Por lo cual posterior a la extracción de ADN las muestras se enviaron al Instituto MacroGen de Corea (Seoul, en la República de Corea) para amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación del ADN genómico. La construcción de la biblioteca se realizó utilizando los cebadores predeterminados de MacroGen para 16S (V3-V4): CCTACGGGNGGCWGCAG y GACTACHVGGGTATCTAATCC. Las secuencias obtenidas se procesaron mediante la plataforma Illumina MiSeq.

6.3.5 Análisis Bioinformático

El análisis por muestra se realizó mediante Geneious Prime. Cada archivo contenía secuencias de lectura directa (F) y reversa (R), por ende, se empleó Trimm using BBDuk” versión 37.64 para ser emparejadas y sometidas a un filtro de calidad.

Las secuencias generadas de control de calidad fueron fusionadas con “Merge Paired Reads” con una velocidad de fusión baja para evitar los falsos positivos, Los archivos generados del proceso anterior se sometieron a UCHIIME con la base de referencia RDP-Gold para la eliminación de lecturas quiméricas y se redujo más el número de secuencias.

Las secuencias finales se subieron a la nube de Geneious con la herramienta “16S Biodiversity”, donde se realizó la agrupación de las secuencias y la asignación de la taxonomía utilizando el RDP classifier v2.12. En esta herramienta se generaron gráficas de jerarquía en Krona,

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7 Desarrollo de reactor biológico

El reactor fue operado acorde a los tiempos de la tabla 8. Obteniendo menor tiempo de inactividad en comparación a reactores en suspensión bajo las mismas condiciones (Espinoza Arzate, 2017) disminuyendo el tiempo de sedimentación 33%, ya que la mayor cantidad de biomasa está adherida, el lodo flotando es menor teniendo así un proceso de sedimentación menor, facilitando la extracción del agua ya tratada, así como la purga de lodos en menor tiempo. Al disminuir tiempo en todas estas etapas el tiempo de retención hidráulica disminuye.

Tabla 8. Condiciones de operación del reactor

Etapas	Tiempo (min)
Llenado	30
Tiempo de retención hidráulica	Variable
Sedimentación	10
Vaciado	20
Purga de biomasa	5

7.1.1 Área de contacto soporte PET

Se calculó el área de contacto total de la biopelícula dentro del sistema (Figura 7) por medio de la fórmula cono trunco y cilindro (figura 9), obteniendo un área de contacto de 7.537 m². Aumentando la superficie de contacto en comparación a los reactores en suspensión. Favoreciendo así un sistema con menor tiempo de tratamiento, disminución de costos y menos generación de residuos.

7.1.2 Biomasa adherida al soporte

Al paso de una semana se observó adherencia de microorganismos al soporte cubriendo una superficie del 30% de la columna, a la semana 4 ya se tenía una cobertura del 75% y la semana 6 del 100% (figura 10) a lo reportado por Nava-Urrego *et al*; 2014 el tiempo de formación del biofilm se lleva a cabo en el primer mes de funcionamiento del reactor (fase de estabilización), sin embargo es indispensable un mayor crecimiento de éste para obtener una formación irreversible.

De acuerdo con Olarte-Avellaneda *et al*; 2012 existen distintos factores que indican a una mayor fijación y desarrollo de microorganismos, alguno de estos factores son concentración de nutrientes, temperatura, cantidad de oxígeno y soportes con propiedades hidrófobas.

El soporte demostró ser factible para una buena, formación y fijación del biofilm y no generando interferencia con la biomasa corroborando lo señalado por Romero y Lapo, 2016.



A) Semana 1. 30% de cobertura



B) Semana 2. 50% de cobertura



C) Semana 3. 60% de cobertura



D) Semana 4. 75% de cobertura



E) Semana 6. 100% de cobertura



F) Semana 8. Aumento de grosor

Figura 14. Fijación del biofilm al soporte

7.1.3 Determinación de microorganismos en biofilm por cm² (SVTi)

Tabla 9. SVTi cm⁻¹

Semana	8	10	12	14	17	19
SVTi (g/cm ²)	1.2	0.8	1.62	1.74	1.88	1.72

Una vez teniendo una cobertura del 100% de del soporte a la semana 8 se tiene una densidad propicia de SVTi a lo reportado por bibliografía. Sin embargo, a la semana 10 se ve una disminución de este, asociado con una débil cantidad de oxígeno disuelto (>3mg/l). A la semana 12 se obtiene 1.62 g/cm² de SVTi, obteniendo una mayor cantidad de microorganismo de acuerdo a lo reportado por Romero y Lapo, 2014 en soporte PET. Al paso de las semanas el volumen de microorganismos se mantuvo prácticamente estable sin tener diferencias significativas. Por lo tanto, los microorganismos desarrollados en el biofilm son los necesarios para poder llevar a cabo la degradación de materia orgánica en al agua residual doméstica (Tabla 9).

7.1.4 Caracterización física del biofilm

Tabla 10. Propiedades físicas de la biomasa

Parámetro	Fase		
	Aclimatación	Adaptación	Estabilización
pH	7.97 ± 0.28	7.30 ± 0.48	7.45 ± 2.23
Cond. Elec. (µS)	80 - 101 µS	101 µS	94 - 101 µS

El rango de pH en el cual el desarrollo microbiano es óptimo se encuentra entre 6.5 – 8.5.

Cuando el afluente a tratar presenta un pH fuera del rango mencionado, se puede producir alteraciones en el metabolismo y crecimiento de los cultivos microbianos. Lo que afecta al biofilm y por ende al tratamiento del agua residual. Valores fuera del rango de pH hay una producción de algas, lo que no es perjudicial para el tratamiento, sin embargo, el aspecto del agua cambia (agua verdosa).

7.1.5 Caracterización morfológica del biofilm

Por medio de microscopía electrónica de barrido de electrones secundarios se determinó la presencia de bacterias, así como la agrupación y colonización de estos microorganismos al medio de soporte; para dar lugar a la formación de una matriz donde se aprecia un aglomerado tridimensional de microorganismos, canales de comunicación muy bien definidos, así como fibras.

En la figura 14 se puede observar la presencia de un biofilm maduro formado por una matriz exopolisacárida y aglomerados bacterianos.

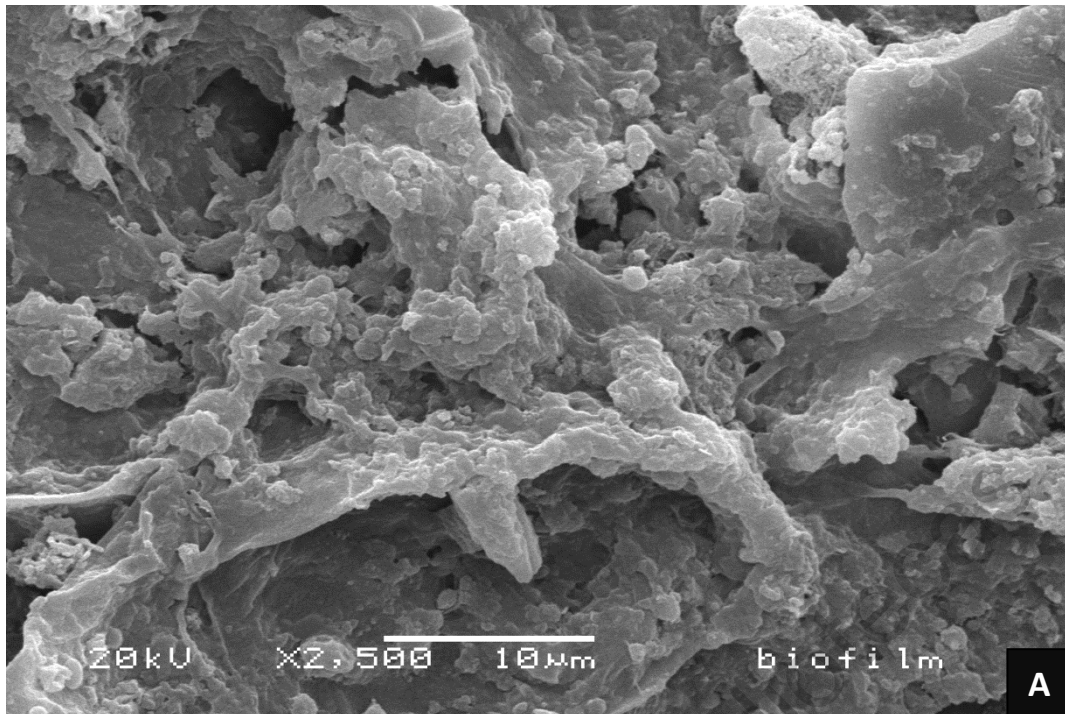


Figura 15. **(A)** Microfotografía a 2,500x correspondiente al biofilm formado al interior del soporte **(B)** MEB a 5000x de biofilm formado sobre material PET a 60 días de operación del reactor.

7.2 Evaluar la eficiencia del proceso biológico

Durante los 150 días de monitoreo de operación. El sistema se evaluó durante 3 fases. Siendo la primera de ella la aclimatación donde la finalidad es que el inóculo en suspensión se acople a su nuevo medio, este periodo constó de 10 días. Para pasar a la fase de adaptación cuyo objetivo es el desarrollo de microorganismos capaces de colonizar la superficie del soporte y formar una biopelícula y llevar a cabo el tratamiento de afluentes domésticos, el tiempo de esta fase fue de 30 días, para dar paso así a la fase de adaptación, donde ya se tiene un biofilm estable e irreversible, un reactor eficiente y el efluente cumplía con todos los límites máximos permisibles. Estas fases fueron determinadas de acuerdo a la medición de parámetros de calidad de agua a lo largo de los 150 días de monitoreo. Durante este lapso reactor se trabajó bajo los rangos señalados en la tabla 11.

Tabla 11. Rangos de operación del reactor

	Rango
Oxígeno Disuelto	3-4 mg/L
Temperatura	19- 25.5 °C

7.2.1 Caracterización fisicoquímica del efluente

La caracterización inicial del agua residual doméstica determinó la concentración de los contaminantes presentes. Con base a esto fue posible determinar que el agua residual era viable para un tratamiento biológico de acuerdo con la relación de $(\text{DBO}_5/\text{DQO}) = 0.54$, donde de acuerdo con literatura si esta relación es >0.2 es un afluente biodegradable. De igual manera se seleccionó los parámetros a monitorear: color, turbidez, sólidos disueltos totales, DBO, DQO y pH.

Tabla 12. Resultados de análisis fisicoquímicos y biológicos del afluente

Parámetro	Valor obtenido	Límite máximo permisible referenciado
Ph	8.7	6.5-8.5
Color	487	15 Pt/Co
Turbidez	204	3 NTU
Coliformes totales		1,000 NMP/100 ml
Coliformes fecales	>2,400,000 NMP	1,000 NMP/100 ml
Huevos de Helminto	<1	≤ 5 hl ⁻¹
Sólidos Disueltos Totales	1340	1000 ppm
Sólidos Suspendidos totales	299	40 mgL ⁻¹
Demanda Química de Oxígeno	491	N.E. mgL ⁻¹
Demanda Bioquímica de Oxígeno	270	30 mgL ⁻¹
Grasas y aceites	3.3	25 mgL ⁻¹
Arsénico	N.D.	0.1 mgL ⁻¹
Cadmio	N.D.	0.2 mgL ⁻¹
Cianuro	N.D.	2 mgL ⁻¹
Cobre	N.D.	6 mgL ⁻¹
Plomo	N.D.	0.2 mgL ⁻¹

Máximos Permisibles de acuerdo a la NOM-003-SEMARNAT-97, NOM-127-SSA1-1994, NOM-001-SEMARNAT-96 Uso en servicio al público con contacto directo. N.D. No Detectable

7.2.2 Monitoreo de efluente y afluente las fases de adaptación y estabilización

La adaptación microbiana (fase de inducción o latencia) es una fase importante en la cual la población microbiana que va a actuar sobre los afluentes a tratar se consolida para dar paso a la fase de estabilización donde esta población ya es capaz de estabilizar las condiciones iniciales del afluente en cuanto a parámetros como: estabilización de pH, dilución de nutrientes, degradación de DBO/DQO, competencia por nutrientes y metabolismo.

Disminución de estos parámetros indican una remoción y/o degradación de contaminantes por ende una mejor calidad de agua.

a. Monitoreo de pH

La tabla 13 puntea los valores promedios de pH obtenidos durante las 19 semanas de funcionamiento del reactor aerobio de lecho fijo. Donde se aprecia la diferencia entre los valores de afluente y efluente. El afluente contenía características alcalinas, después del tratamiento en el reactor se observó una neutralización del afluente. Manteniendo el pH estable.

Otro factor importante es que el rango óptimo de pH para el desarrollo de bacterias es entre 6-8 (Metcalf & Eddy, 2014). Que también corresponde con el obtenido en el biofilm (Tabla 10) permitiendo el desarrollo de la biopelícula y el tratamiento eficiente del agua residual.

Tabla 13. Promedios semanales de pH afluente vs. efluente

	Tiempo (semana)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Afluente	8.8	8.8	8.6	8.6	8.81	8.52	8.77	8.34	8.76	8.71	8.42	8.48	8.47	7.49	8.50	8.64	8.12	7.95	8.13
	±0.1	±0.19	±0.18	±0.19	±0.10	±0.23	±0.04	±0.25	±0.16	±0.07	±0.07	±0.10	±0.12	±0.19	±0.38	±0.39	±0.50	±0.16	±0.17
Efluente	8.5	7.88	7.75	7.68	7.76	7.6	7.52	7.515	7.68	7.6	7.53	7.51	8.54	8.08	7.83	7.78	7.48	7.64	7.69
	±0.25	±0.22	±0.12	±0.13	±0.23	±0.16	±0.57	±0.08	±0.15	±0.16	±0.23	±0.12	±0.30	±0.33	±0.18	±0.47	±0.20	±0.05	±0.08

b. Remoción de turbidez, color y sólidos disueltos totales

Los datos de la disminución de color posterior al tratamiento biológico durante los 150 días de operación se presentan en la figura 15. A pesar de que las características de color del afluente oscilaban entre 700 - 400 Pt_{Co}, la eficiencia del reactor fue eficiente desde los primeros días de operación, llegando a una remoción > 86% ya estable el proceso.

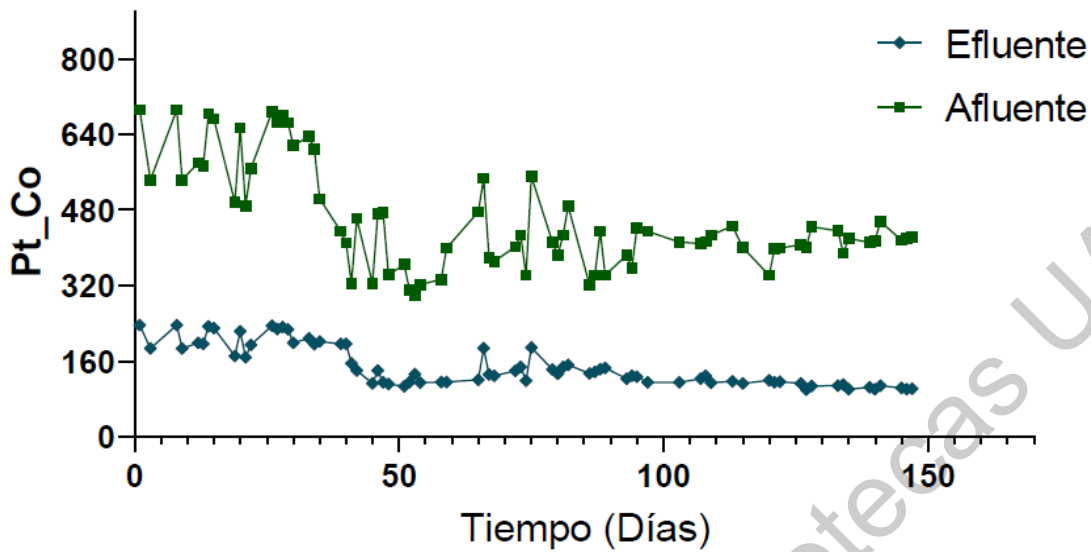


Figura 16. Monitoreo de color afluente vs. efluente durante 150 días

La figura 17 muestra la disminución en el parámetro de turbidez del efluente en comparación con el agua residual de entrada. Se puede observar un proceso inestable durante los primeros 30 días, los cuales corresponden a la fase de aclimatación y adaptación, posterior a esto se denota un reactor estable con una porcentaje de disminución >90%

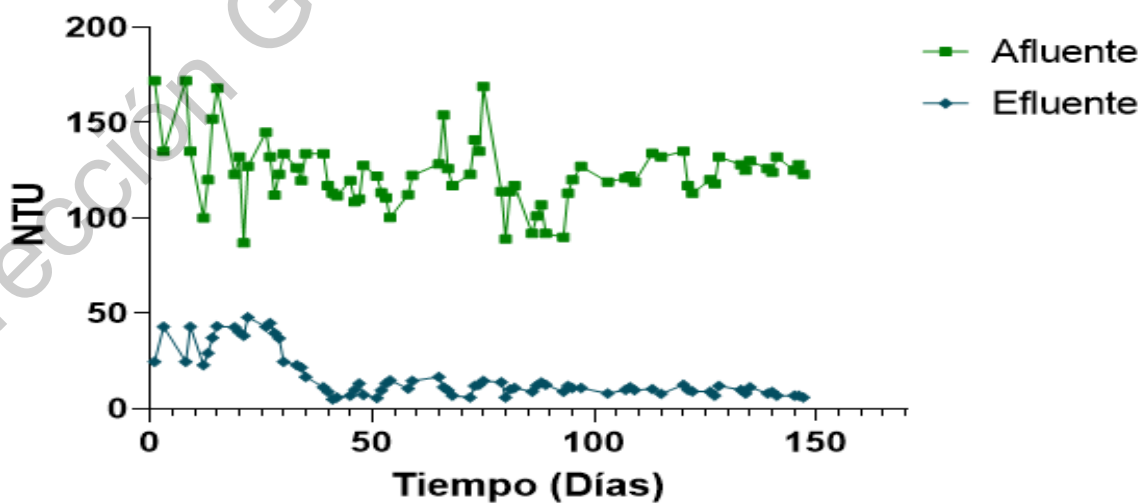


Figura 17. Monitoreo de turbidez afluente vs. efluente durante 150 días

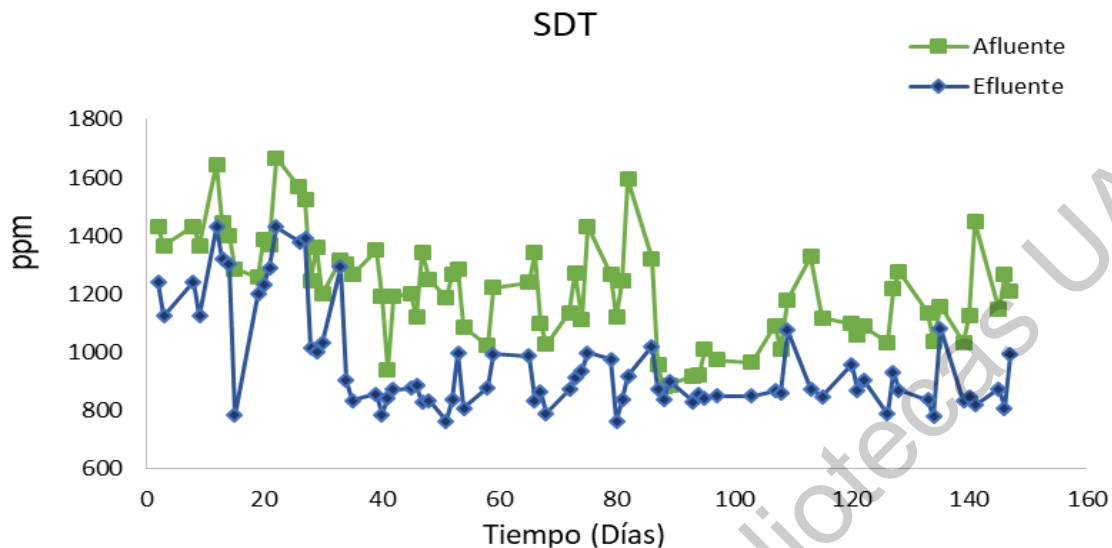


Figura 18. Monitoreo de Sólidos Disueltos Totales afluente vs. efluente durante 150 días

Parámetros como Turbidez está directamente relacionado con la presencia de sólidos en la muestra (sólidos: sedimentables, disueltos, volátiles, totales) y estos a su vez con los contaminantes en agua. Ciertos sólidos son más difíciles de eliminar como son los disueltos asociados con compuestos inorgánicos en su mayoría no muy viables para la degradación con tratamientos biológicos. En la figura 17 se muestra las concentraciones de sólidos disueltos totales en agua residual y posterior al tiempo de residencia en el reactor. Como se puede observar no hay una tendencia como en los parámetros de color y turbidez. La disminución de la concentración fue poca durante los 150 días (<15%), sin embargo, cumplen con el límite máximo permisible de 1000ppm señalado en NOM-001-SEMARNAt-1996.

c. Monitoreo Demanda Química de Oxígeno y Demanda Biológica de Oxígeno

El afluente presentó un valor promedio de DQO de 640.34mg/l con un rango máximo de 748.33 mg/l y un mínimo de 481mg/l contra un valor promedio de 136 mg/l con un rango máximo de 459 mg/l y un mínimo de 68 mg/l para el efluente.

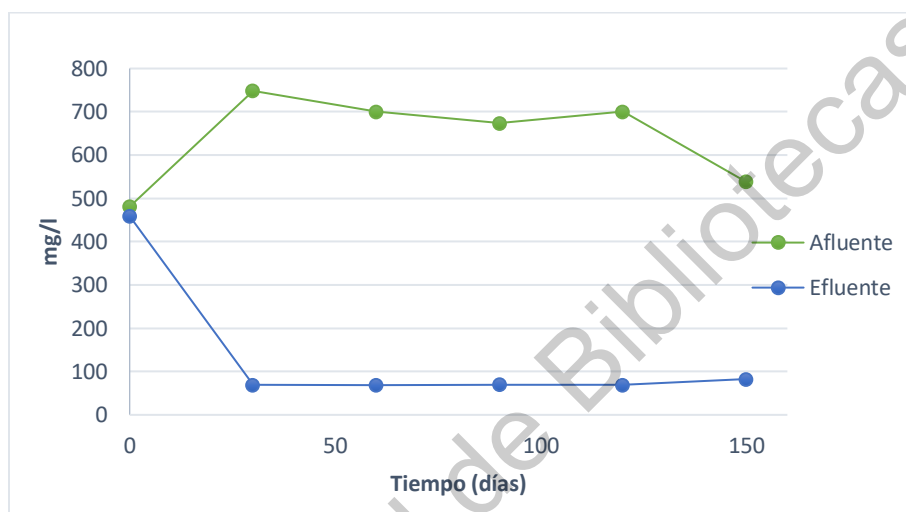


Figura 19. Valores DQO obtenidos afluentes vs. efluente tratamiento biológico

En lo que se refiere a DBO5 los valores obtenidos fueron los siguientes: El afluente presentó un valor promedio de DQO de 360.67 mg/L con un rango máximo de 481 y un mínimo de 270 mg/L contra un valor promedio de 73.44mg/L con un rango máximo de 260 mg/L y un mínimo de 25 mg/L para el efluente.

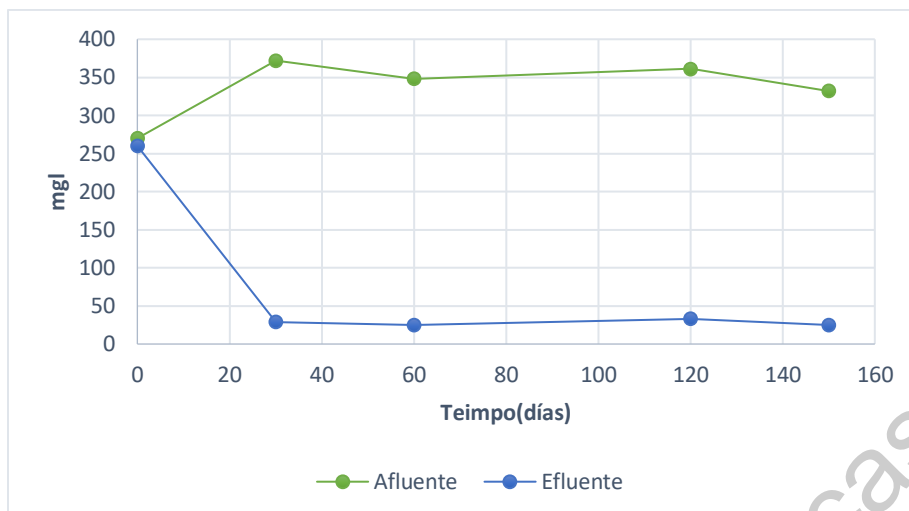


Figura 20. Valores DBO5 obtenidos afluentes vs. efluente tratamiento biológico

En las figuras 19 y 20 se puede apreciar como la eficiencia de la degradación desde el día 0 al día 30 incrementó, manteniendo una remoción de contaminantes constante con una remoción >90% para ambos parámetros.

En base a la relación (DBO_5/DQO) se puede reiterar que es viable un tratamiento biológico para el afluente doméstico

Tabla 14, Determinación de biodegradabilidad efluente por medio de la relación QBO_5/ QBO

Día	(DBO_5/DQO)	BIODEGRADABILIDAD
0	0.56	X
30	0.50	X
60	0.50	X
120	0.54	X
150	0.47	X

d. Reducción porcentual de contaminantes en fase de adaptación y estabilización

Se puede percibir en las imágenes 15,16 las fases del reactor (aclimatación, adaptación y estabilización). Durante los primeros 30 días la disminución de estos parámetros era poca (fase de aclimatación y adaptación) la eficiencia del reactor no era la óptima ya que es inestable y la remoción de contaminantes es menor en comparación con los días posteriores donde la variación del efluente es menor con una mayor remoción y cumpliendo con los límites máximos permisibles.

Los porcentajes de disminución del proceso se muestran en la tabla 14. Durante los primeros 30 días (Fase adaptación) ya hay una alta remoción de contaminantes al estar estable hay una remoción hasta del 90 % de contaminantes.

Tabla 15 Reducción porcentual en fase de adaptación y estabilización

Parámetro	% DISMINUCIÓN	
	Adaptación	Estabilización
Color (Pt_Co)	49	60
Turbidez (NTU)	70	90
SDT (mg/L)	14	25
pH	6	13
DQO (mg/L)	68	90

7.2.4 Evaluación del reactor en 24 horas

Una vez el proceso biológico estable fue capaz de cumplir con todos los límites máximos permisibles estipulados con las normas.

Cada 30 días se realizó cinéticas de reacción de los parámetros de calidad de agua para evaluar la eficiencia del reactor a 24 horas, así como para determinar el tiempo de residencia, los resultados obtenidos se muestran en las tablas 15-18.

Tabla 16. Cinéticas de reacción a 24h a 60 días de operación

Parámetro	Tiempo (h)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
pH	8.77	8.70	8.68	8.65	8.57	8.54	8.11	8.37	8.31	8.16	7.52
Color (Pt_Co)	472.0	253.0	186.3	212.7	183.3	136.3	121.7	143.3	119.0	118.7	115.0
Turbidez (NTU)	300.0	65.0	54.0	47.0	43.3	40.7	32.3	33.3	31.3	27.7	9.7
SDT (ppm)	1200.7	1133.7	1117.3	1105.7	1093.0	1091.7	1080.0	1115.7	1074.3	1010.7	874.7
DQO (mg/l)	748.33	204.00	141.67	104.00	83.00	69.00	68.33	87.67	74.67	82.67	69.00

Se puede observar que a las 24 horas se cumple con todos los parámetros de calidad de agua, sin embargo, a las 6 horas se lleva a cabo la mayor remoción de DQO. (PABON, 2009)

En las cinéticas posteriores de 90, 120 y 150 días de operación el tiempo de residencia se mantiene en 4horas.

Tabla 17. Cinéticas de reacción a 24h a 90 días de operación

Parámetro	Tiempo (horas)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
pH	8.8	8.77	8.87	8.83	8.83	8.57	8.43	8.43	8.17	8.1	7.57
Color (Pt_Co)	462	169.7	153	119	117.3	112	109.7	127.3	132	126.7	113.3
Turbidez (NTU)	146.7	37	24.33	18	11	13.33	10	16.7	11	10	6
SDT (ppm)	937.7	955.6	940.3	934.6	924.6	915	895.3	905.7	885.7	877	841.7
DQO (mg/l)	674	89.66	110.3	90.66	68.66	63.66	51.66	99.33	77.33	57.33	70

Tabla 18. Cinéticas de reacción a 24h a 120 días de operación

Parámetro	Tiempo (horas)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
pH	8.8	8.77	8.87	8.83	8.83	8.57	8.43	8.43	8.17	8.1	7.57
Color (Pt_Co)	462	169.7	153	119	117.3	112	109.7	127.3	132	126.7	113.3
Turbidez (NTU)	146.7	37	24.33	18	11	13.33	10	16.7	11	10	6
SDT (ppm)	937.7	955.6	940.3	934.6	924.6	915	895.33	905.66	885.66	877	841.67
DQO (mg/l)	700	89.66	110.3	90.66	68.66	63.66	51.66	99.33	77.33	57.33	68.67

Tabla 19. Cinéticas de reacción a 24h a 150 días de operación

Parámetro	Tiempo (horas)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24
pH	8.66	8.54	8.59	8.38	8.29	8.27	7.87	7.38	7.4	7.33	7.54
Color (Pt_Co)	423	169.7	153	119	108	107.3	101	109.8	110.5	111	102
Turbidez (NTU)	123.5	31.33	14	19	13	10.5	14	12	13	15	6
SDT (ppm)	1224	1284	1147.5	1011.8	989.3	967.4	931.6	959	989.1	978.3	991.3
DQO (mg/l)	538.7	146.7	99.33	90	89.33	86.6	80.21	88.14	86	86	82.33

Como se señala en la siguiente tabla 19 los porcentajes de disminución fueron constantes una vez estable el proceso. Relacionándolo con la cantidad de microorganismo determinados en el biofilm mediante SVTi (Tabla 9) corresponde que no se presenta diferencia significativa en el aumento o disminución de la biopelícula.

Tabla 20. Eficiencia promedio de reducciones de parámetros de calidad de agua

Parámetro	% de Disminución																								
	30 días					60 días					90 días					120 días					150 días				
	2h	4h	6h	8h	24h	2h	4h	6h	8h	24h	2h	4h	6h	8h	24h	2h	4h	6h	8h	24h	2h	4h	6h	8h	24h
Color (Pt_Co)	60.5	61.2	74.2	74.8	75.6	60.5	61.2	74.2	74.8	75.6	66.9	74.6	76.3	71.4	75.5	73.3	68.0	66.9	65.7	65.1	63.8	76.1	76.1	73.9	75.9
Turbidez (NTU)	82.0	85.6	89.2	89.2	96.8	82.0	85.6	89.2	89.6	96.8	83.4	92.5	93.2	92.5	95.9	59.3	85.2	99.3	84.4	90.4	88.7	88.7	88.7	89.5	95.1
SDT (ppm)	6.9	9.0	10.1	10.5	11.2	6.9	9.0	10.0	10.5	27.2	-0.3	1.4	4.5	5.5	10.2	5.4	10.8	11.9	16.7	12.8	6.3	23.9	23.9	19.2	19.0
DQO (mg/l)	81.1	90.0	90.9	90.0	90.8	81.1	88.9	90.9	90.0	90.8	84.2	90.2	92.6	89.0	90.2	75.3	84.7	87.4	90.1	90.3	81.6	85.1	85.1	84.0	84.7

Durante las cinéticas se observó que la mayor remoción de contaminantes se presenta en las primeras 2 horas. Parámetros como QBO lleva una remoción del 90%. Parámetros como sólidos disueltos son los más difíciles de remover, lo cual el tiempo de residencia se posterga a 4 horas. A pesar de esto el tiempo de residencia se reduce un 50% en comparación de los sistemas convencionales en suspensión (Ramalho, 1996).

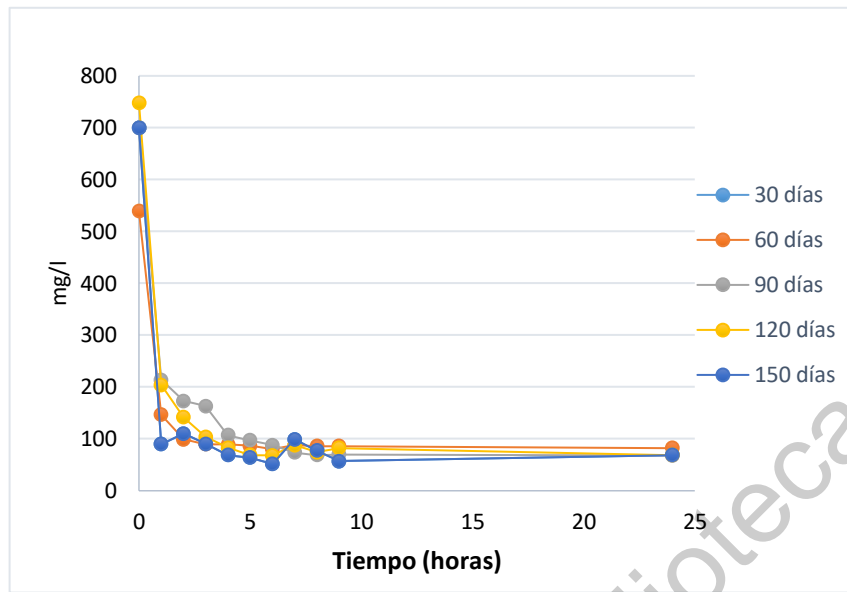


Figura 21. Gráfico comparativo de las cinéticas disminución de DQO



Figura 22. Comparación del agua residual doméstica durante 24 horas de tratamiento

7.2.5 Coeficientes biocinéticas

- **Obtención de la Demanda Química de Oxígeno (S) y Sólidos Suspendidos Volátiles (X).**

En la tabla 20 se muestran los valores obtenidos de S y X asociadas al cálculo de los coeficientes biocinéticos. La obtención de estas variables se realizó, como se indicó en la sección 6.2.2

Tabla 21. Valores de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (S) y Sólidos Suspendidos Volátiles (X) asociadas al cálculo de los coeficientes biocinéticos

Ciclo	S ₀ g/L DQO	S g/L DQO	$\theta = \theta_c$ h	X g SSV/L
1	0.748	--	0	2.20
2	--	0.204	1	1.13
3	--	0.141	2	1.11
4	--	0.083	4	1.09
5	--	0.074	8	0.94

- **Cálculo de los coeficientes biocinéticos: Tasa máxima de utilización de sustrato (k) y la constante de velocidad media (K_s)**

Para la obtención de los coeficientes biocinéticos: Tasa máxima de utilización de sustrato (k) y la constante de velocidad media (K_s) primero se graficó los datos obtenido de la tabla 20 con cálculos de la ecuación 11.

Tabla 22. Variables asociadas al cálculo de k y K_s

X θ g SSV/h*L	1/S (g/L) ⁻¹	X θ /(S ₀ - S) h ⁻¹
4.867	4.902	8.947
9.067	7.092	14.937
14.000	12.048	21.053
18.433	13.514	27.344

La figura 21 es el gráfico de $X\theta/(S_0 - S)$ de acuerdo a $1/S$. En este gráfico la ordenada al origen es $1/k$, y la pendiente es igual a K_s/k . Obteniendo así k y K_s fueron 5.6 h^{-1} y 10.64 g/l respectivamente.

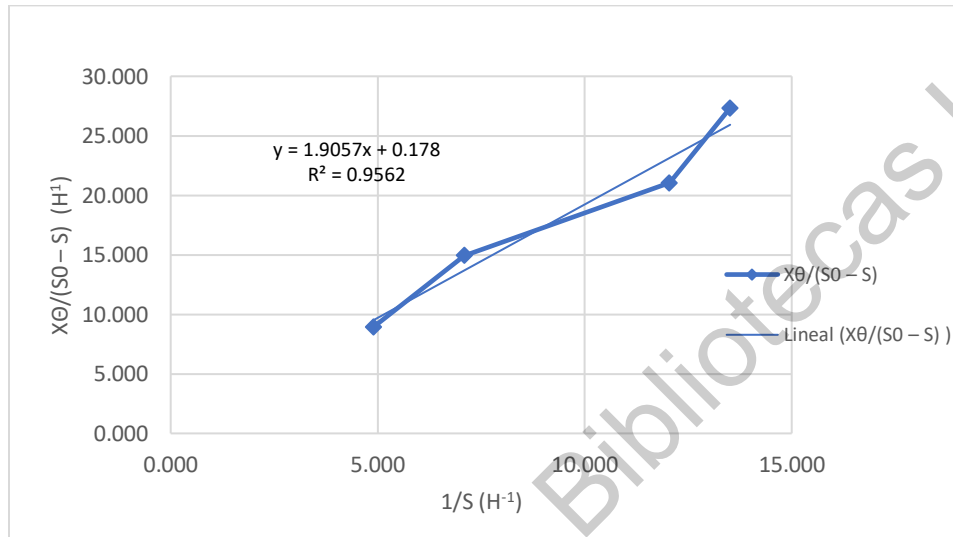


Figura 23. Tasa máxima de crecimiento (k) y Velocidad media de crecimiento (K_s)

- **Cálculo de los coeficientes biocinéticos: Rendimiento celular máximo (Y) y el coeficiente de decaimiento endógeno (k_d)**

Las variables $1/\theta_c$ y $(S_0 - S)/X\theta$ se obtuvieron en base a los datos mostrados en la tabla 22. El gráfico de estos resultados para obtener los coeficientes biocinéticos: Rendimiento celular máximo (Y) y el coeficiente de decaimiento endógeno (k_d) se muestra en figura 22.

Tabla 23. Variables asociadas al cálculo de Y y k_d

$1/\theta_c$ h^{-1}	$(S_0 - S)/X\theta$ h^{-1}
1	0.112
0.5	0.067
0.25	0.048
0.125	0.037

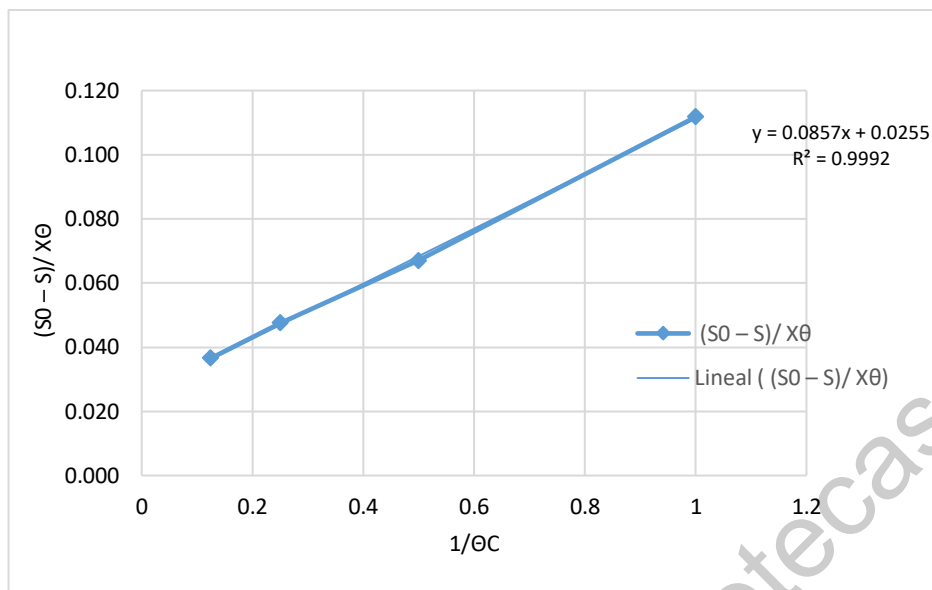


Figura 24. . Rendimiento celular máximo (Y) y el coeficiente de decaimiento endógeno (k_d)

Una vez que se graficó $1/\theta_c$ respecto a $(S_0 - S) / X\theta$, se obtuvo la ordenada al origen k_d y la pendiente es Y. En consecuencia, los valores de Y y k_d que se obtuvieron fueron 0.085 y 0.025 h^{-1} respectivamente.

Tabla 24. Coeficientes biocinéticos

Coeficiente	Valor obtenido	Rango	Unidades
k	5.6	4- 12	g bsDQO/gSSV*d
K_s	1.90	5.0- 30.0	mg/L bsDQO
Y	0.085	0.40-0.80	mg SSV/ mg DQO
K_d	0.025	0.02-0.15	g SSV/g SSV*d

7.3 Identificar bacterias en el biofilm en las diferentes etapas de los procesos mediante el biomarcador ARNr 16S

7.3.1 Extracción de DNA

Las concentraciones DNA obtenidas de cada muestra se observan en la tabla 25. La figura 16 puntea el resultado obtenido tras la electroforesis que se realizó para la verificación del producto de DNA genómico, a partir de la extracción con el kit.

Tabla 25. Concentraciones de ADN obtenido por muestra

Día de muestreo	Fase	Muestra	[ng/ μ l]
0	Suspensión	Inóculo inicial	42.519
20	Biofilm	Adaptación	115.3
120	Biofilm	Estabilización	112.002

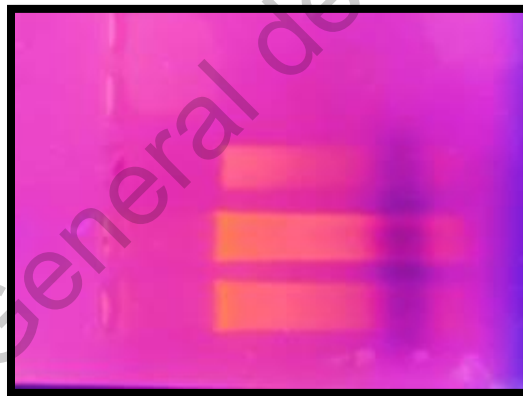


Figura 25. Aislamiento de DNA genómico. Se muestra la corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%

7.3.2 Amplificación

Tabla 26. Concentraciones obtenidas por muestra en amplificación

Muestra	[ng/ μ L]
Inóculo inicial	54.82
Adaptación	51.08

Estabilización	53.63
----------------	-------

7.3.3 Secuenciación y Análisis bioinformático

El análisis por muestra de manera general se realizó mediante el software Geneious Prime. Las secuencias obtenidas de cada muestra contenían secuencias de lectura directa (F) y reversa (R) con un número diferente de secuencias: Inóculo inicial: 297,348, Adaptación: 360526 y Estabilización 320,964. Las secuencias de lectura directa y reversa por archivo fueron emparejadas y posteriormente sometidas a un filtro de calidad con “Trimm using BBDuk” versión 37.64, aquí se eliminan adaptadores y bases con una calidad inferior a Q30 en los extremos y lecturas que sean menores a 100 pb después del recorte final. El número de secuencias generadas por archivo de este proceso fue Adaptación con 226, 202 secuencias, Estabilización con 198, 506 secuencias e Inóculo inicial con 185,546 secuencias.

Las secuencias generadas del control de calidad fueron fusionadas con “Merge Paired Reads” con una velocidad de fusión baja para evitar los falsos positivos. El número de secuencias generadas en este proceso fue: 10,870 para Adaptación, 9,047 para Estabilización y 12,367 para Inóculo inicial. Los archivos generados del proceso anterior se sometieron a UCHIIME con la base de referencia RDP-Gold para la eliminación de lecturas quiméricas y se redujo más el número de secuencias, Adaptación (8,545), Estabilización (7,776) e Inoculo inicial (9,766).

Las secuencias finales se subieron a la nube de Geneious con la herramienta “16S Biodiversity”, donde se realizó la agrupación de las secuencias y la asignación de la taxonomía utilizando el RDP classifier v2.12. En esta herramienta se generan gráficas de jerarquía en Krona,

7.3.4 Estructura de la comunidad microbiana en diferentes fases del biorreactor.

- Caracterización estructura comunidad bacteriana inóculo en suspensión día cero operación del reactor

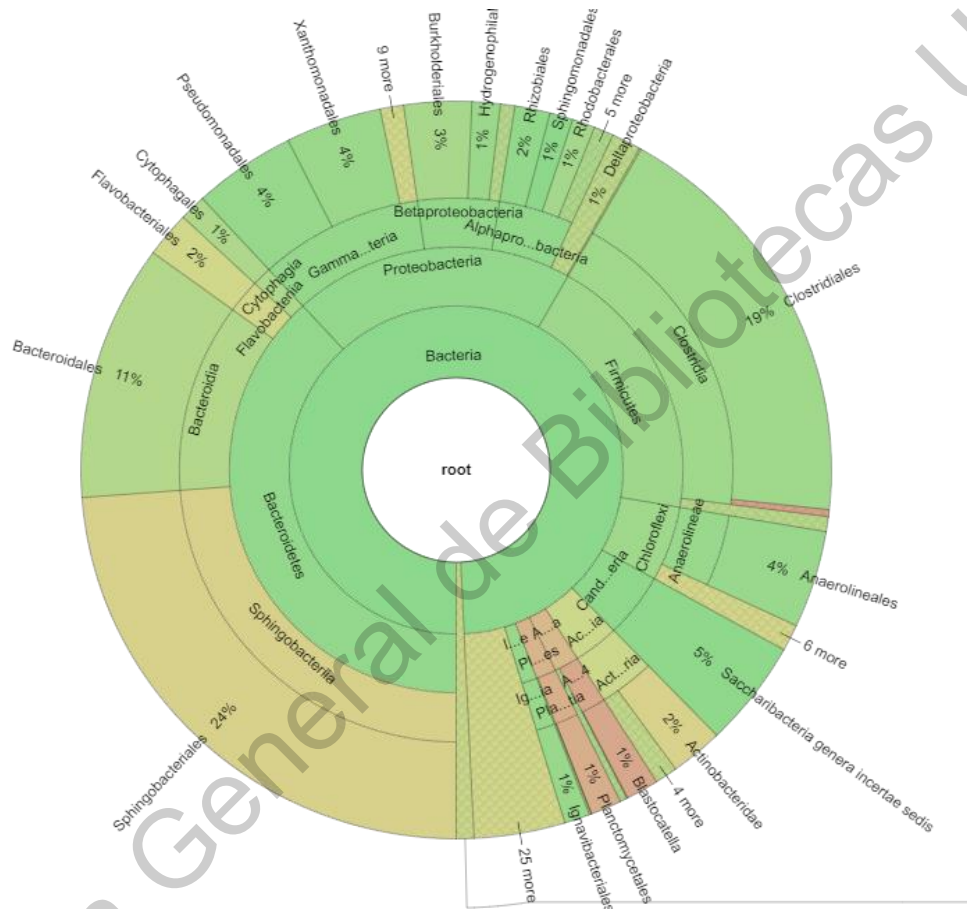


Figura 26. Estructura de la comunidad bacteriana del inóculo en suspensión. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en la muestra.

La caracterización molecular del inóculo en suspensión al día 0 (Figura 26) indican que las secuencias pertenecen a 8 phylum, donde los grupos dominantes fueron *Bacteroidetes* (38%), *Proteobacterias* (20%) y *Firmicutes* (19%) consistentes con otros estudios de biomasa en suspensión (Arévalo-Arbeláez *et al*; 2017). Los otros phylum corresponden *Chloroflexi* (5%), *Candidatus s.* (5%), *Actino bacteria* (3%), *Acidobacteria* (2%) y *Pantomycetes* (2%).

De los cuales, a nivel de clase, la comunidad bacterianas estuvo constituido por: *Gammaproteobacteria* (10%), *Alphaproteobacteria* (4%), *Betaproteobacteria* (5%), *Deltaproteobacteria* (1%) que corresponden al phylum proteobacterias. Para los *Bacteroidates* encontramos clases dominantes como: *Sphingobacterias* (24%), *Bacteroidia* (11%), *Flavobacteriia* (2%), *Cytophagía* (1%). En lo que se refiere a *Candidatus* s. la clase que se encontró fue *Clostridia* (19%); así como *Anaerolineae* (19%) correspondiente al phylum *Chloroflexi*.

De la tipificación anterior se generó la clasificación a nivel familia donde los predominantes fueron: *Saprosiraceae* (20%), *Clostridiaceae* (13%), *Prolixibacteriaceae* (6%), *Xanthomonadaceae* (4%), *Marinilabiliaceae* (4%) y *Anoelineaceae* (4%) entre otras en porcentajes más bajos.

- **Caracterización estructura comunidad bacteriana formación del biofilm día 20 operación del reactor**

Durante las primeras semanas de la formación de la biopelícula se encuentra en fase reversible, donde solo algunas especies bacterianas tienen la capacidad de sobrevivir y/o reproducirse en este medio ambiente modificado. De acuerdo a su metabolismo estas especies tienen la capacidad de formar el biofilm por medio de la matriz de exopolisacáridos.

La caracterización de las comunidades bacterianas durante esta etapa mostró a nivel phylum 9 grupos siendo el grupo dominante *Bacteroidates* (43%), *Proteobacteria* (37%), y en menor proporción *Firmicutes* (3%), *Chloroflexi* (4%), *Candidatus* s. (2%), *Actino bacteria* (1%), *Ignavibactariae* (1%), *Parcubacteria* (1%), *Verrucomicroba* (1%).

La clasificación de los phylum dominantes a nivel de clase estuvo constituida por: *Proteobacterias*: *Gammaproteobacteria* (11%), *Alphaproteobacteria* (5%), *Betaproteobacteria* (14%) y *Deltaproteobacteria* (6%). *Bacteroidates*: *Sphingobacterias* (21%) *Bacteroidia* (8%), *Flavobacteriia* (6%),

Cytophagia (8%) además de *Candidatus* s: *Clostridia* (2%) y *Chloroflexi*: *Anaerolineae* (2%).

Las clases se agruparon en orden taxonómico de clase encontrando obteniendo las siguientes abundancias relativas para: *Xanthomonadaceae* (5%), *Rhodocyclaceae* (6%), *Prolixibacteriaceae* (3%), *Marinilabiliaceae* (4%), *Cystobacterieae* (7%), *Saprospiraceae* (18%), *Chrysedinea* (6%), *Anoelineaceae* (3%).

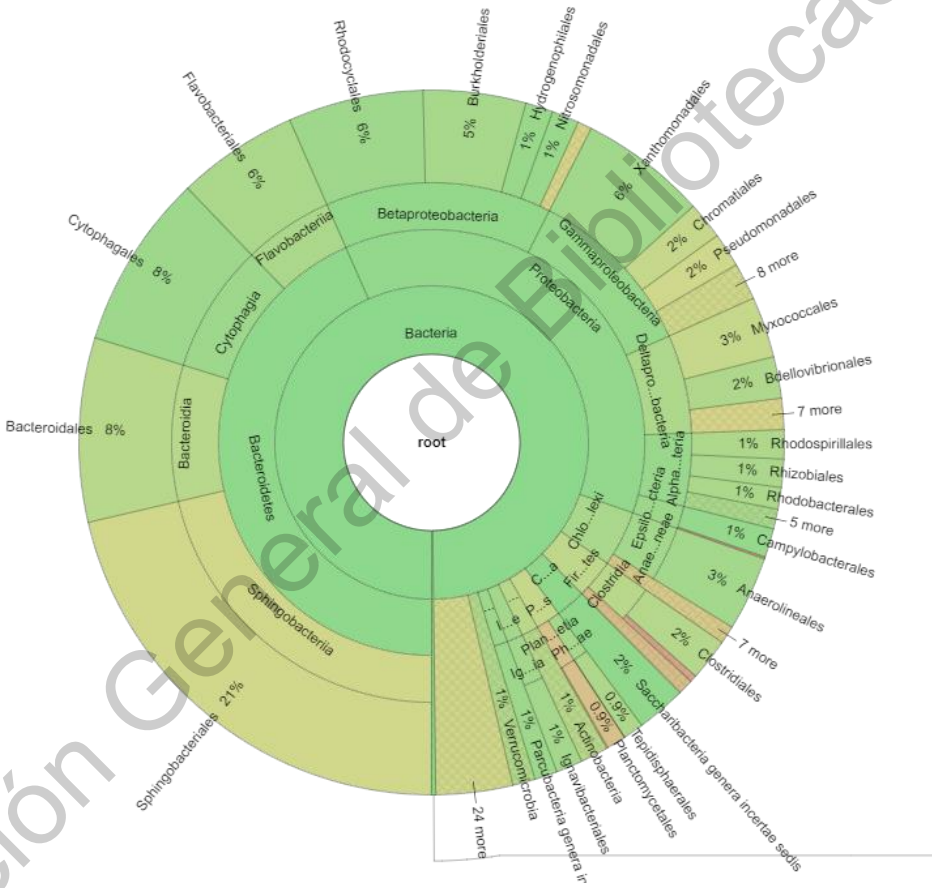


Figura 27. Estructura de la comunidad bacteriana durante la formación del biofilm. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en la muestra.

- Caracterización estructura comunidad bacteriana biofilm fase irreversible al día 120 de operación del reactor

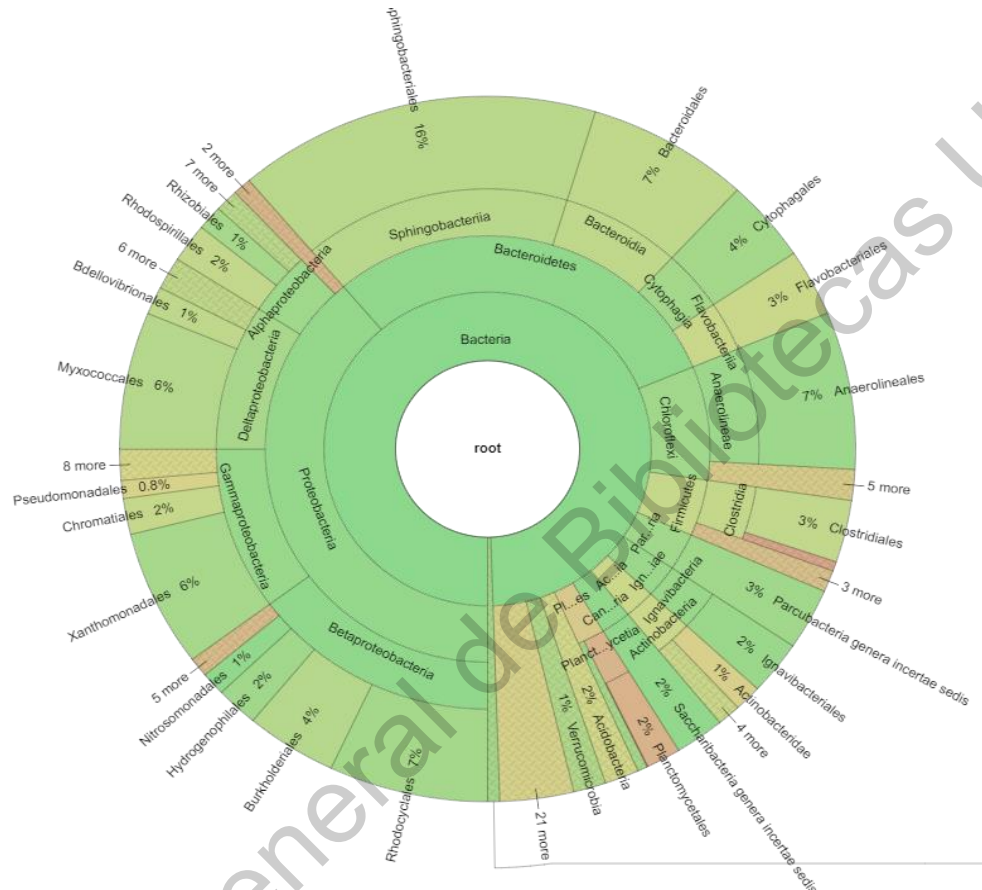


Figura 28. Estructura de la comunidad bacteriana biofilm irreversible. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en la muestra.

La identificación de consorcios bacterianos durante la fase irreversible del biofilm equivalentes a la muestra del día 120 (figura 28) determinó el desarrollo de 11 phylum con las siguientes abundancias relativas: *Bacteroidates* (30%), *Proteobacterias* (39%), *Firmicutes* (4%), *Chloroflexi* (9%), *Candidatus s.* (2%), *Actinobacteria* (2%), *Acidobacteria* (2%), *Ignavibacteriae* (2%), *Parcubacteria* (3%), *Verrucomicroba* (1%). Así como *Plantomomycetes* (2%).

En la agrupación jerárquica a nivel clase se encontraron los siguientes grupos: *Gammaproteobacteria* (10%), *Alphaproteobacteria* (4%), *Betaproteobacteria* (15%), *Deltaproteobacteria* (9%) que corresponden al phylum *Proteobacterias*. De acuerdo a investigaciones señaladas por Arévalo-Arbeláez *et al*, 2017 estos tienden a ser los grupos más representativos para las *Proteobacterias* corresponde en distintas investigaciones en biomasa para tratamiento de agua.

Para los bacteroidates encontramos clases dominantes como: *Sphingobacterias* (16%), *Bacteroidia* (7%), *Flavobacteriia* (3%), *Cytophagía* (4%). En lo que se refiere a *Candidatus* s. la clase que se encontró fue *Clostridia* (3%); así como *Anaerolineae* (3%) correspondiente al phylum *Chloroflexi*.

La caracterización a nivel familia muestra la abundancia relativa de los grupos de la siguiente manera: *Xanthomonadaceae* (5%), *Rhodocyclaceae* (7%), *Soranglineae* (4%), *Prolixibacteriaceae* (4%) *Saprosiraceae* (16%), *Anoelineaeceae* (7%) y alrededor de otras 20 familias con menor porcentaje.

7.3.5 Comparación de la diversidad taxonómica de comunidades bacteriana en las diferentes etapas del biorreactor para el tratamiento de aguas residuales domésticas.

La figura 29 muestra el gráfico comparativo de la diversidad de comunidades bacterianas en las distintas etapas del sistema FBBR en base a la caracterización de la sección pasada.

Como se puede observar en las tres fases los grupos dominantes son: *Bacteroidetes*, *Proteobacterias*; presentando un incremento durante la formación del biofilm, y *Firmicutes*; el cual su abundancia disminuyó a conforme al paso de tiempo de operación del sistema.

También se denota en el biofilm el desarrollo de 3 phylum más que en suspensión que corresponde a *Ignavibacteriae*, *Parcubacteria* y *Verrucomicrobia*. Si bien su porcentaje es bajo, pueden considerarse como grupos clave. Debido a que estos phylum presentan especies asociadas con la secreción de exopolisacáridos, permitiendo así la matriz para la formación del biofilm. Por tanto, estos grupos tienen un impacto no proporcional a su abundancia, teniendo consecuencias en cambios de la estructura bacteriana, adecuando o modificando el hábitat o bien influyendo en las interacciones del consorcio bacteriano.

Al igual que otros phylum que presentan poca abundancia, pero son de mucha importancia para la degradación de materia orgánica como es *Actinobacteria*, también importantes acumuladores de fosfato (Erijman *et al*; 2011) al igual que géneros en clases pertenecientes a la clase de las *Alfaproteobacterias* y *Betaproteobacterias* estos si con una alta abundancia presentes en este estudio. *Candidatus* s. es otro ejemplo de especies clave, asociadas a la reducción de niveles de fosfato en los afluentes (Zhang *et al*; 2011).

Los miembros de *Chloroflexi* juegan un papel ecológico en la degradación de carbohidratos y materiales celulares, por lo que son importantes en el tratamiento biológico (Hu *et al*; 2012) de aquí su presencia en todas las fases del sistema.

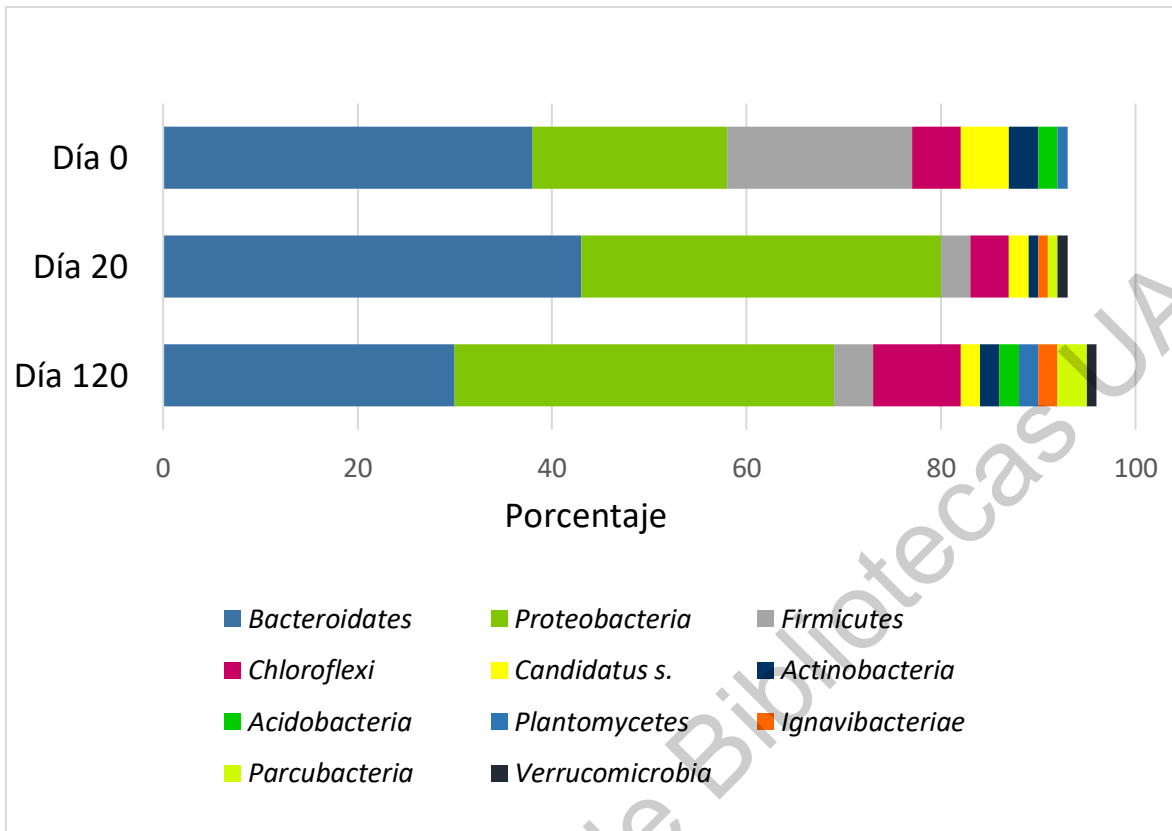


Figura 29. Estructura de comunidades bacterianas a nivel phylum en diferentes fases del biorreactor para el tratamiento de aguas residuales domésticas. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en cada muestra.

En cuanto la comparación taxonómica a nivel clase la mayoría de los porcentajes de abundancia relativa se mantuvieron constantes para la mayoría (figura 30). Se presentaron grupos con mayor variabilidad; como el incremento de la clase *Deltaproteobacteria* en la biopelícula con respecto de la población en suspensión, la cual es una tendencia que ha sido reportada en biofilm formadas en otros procesos para el tratamiento de aguas residuales y continentales, así como sedimentos marinos (Loera Muro *et al*; 2012). Mismo caso de las *Betaproteobacteria* importantes en la biorremediación por fijar nitrógeno, oxidar amonio y producción de nitritos haciendo simbiosis con *Alphaproteobacteria*. Otro grupo importante presente con una abundancia relativa fuerte y constante fueron

las *Gammaproteobacteria*, cuya presencia no solo se asocia con géneros formadores de polisacáridos y glicocalix, sino también por ser biosurfactantes (Valeriano-Zapana & Gonzales-Limache, 2016).

Así mismo se denota un aumento *Sphingobacteria* y *Bacteroidia*; reportadas como clases degradadoras de compuestos orgánicos tanto en ambientes acuáticos como terrestres. Y una disminución de *Clostridia* y *Anaeralineae* (Lahera, 2010).

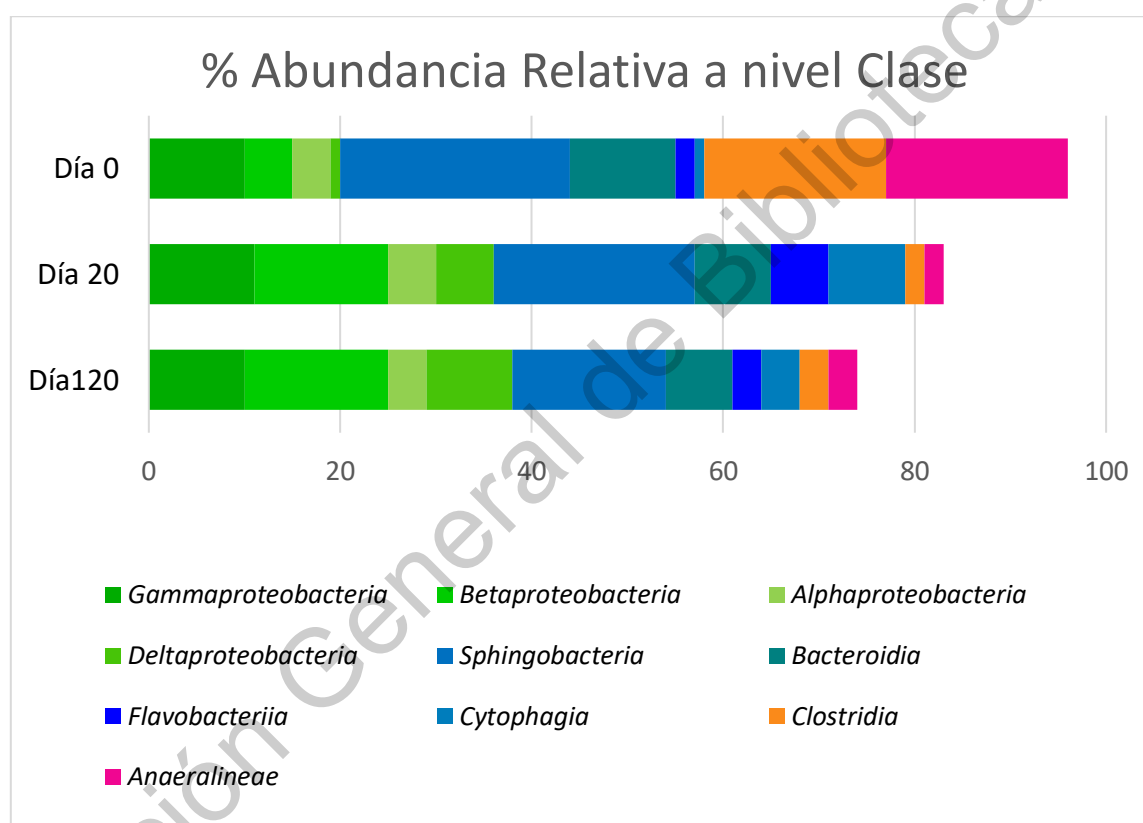


Figura 30. Estructura de comunidades bacterianas a nivel clase en diferentes fases del biorreactor para el tratamiento de aguas residuales domésticas. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en cada muestra.

La comparación a nivel familia es más específica, se pudo determinar que las familias dominantes y asociarlos con la formación del biofilm, en las que

encontramos: *Porphyromonadaceae*: que presenta dos géneros de bacterias formadoras de biofilm; *Porphyromonas* y *Disgonomomas*

Se observó que *Hydrogenophiceae* presentó un aumento en el biofilm, dentro de esta familia encontramos géneros como *Triobacillus* importantes fijadores de sulfuro importantes para el tratamiento de aguas residuales, el incremento de otras familias como *Rhodomyclacea*, *Comomoncdacea* y *Nitrosomonadaceae* no se encuentran en el inóculo inicial sin embargo se observa un incremento en las siguientes etapas. Relacionado la presencia de géneros como *Zooglogea*, involucrados en la formación de flóculos y procesos de desnitrificación, así como *Nitrobacter* y *Nitrosomas* encargadas de procesos de nitrificación. Altos niveles de nitrificación son característicos de procesos de lecho fijo (Bonilla *et al*; 2008).

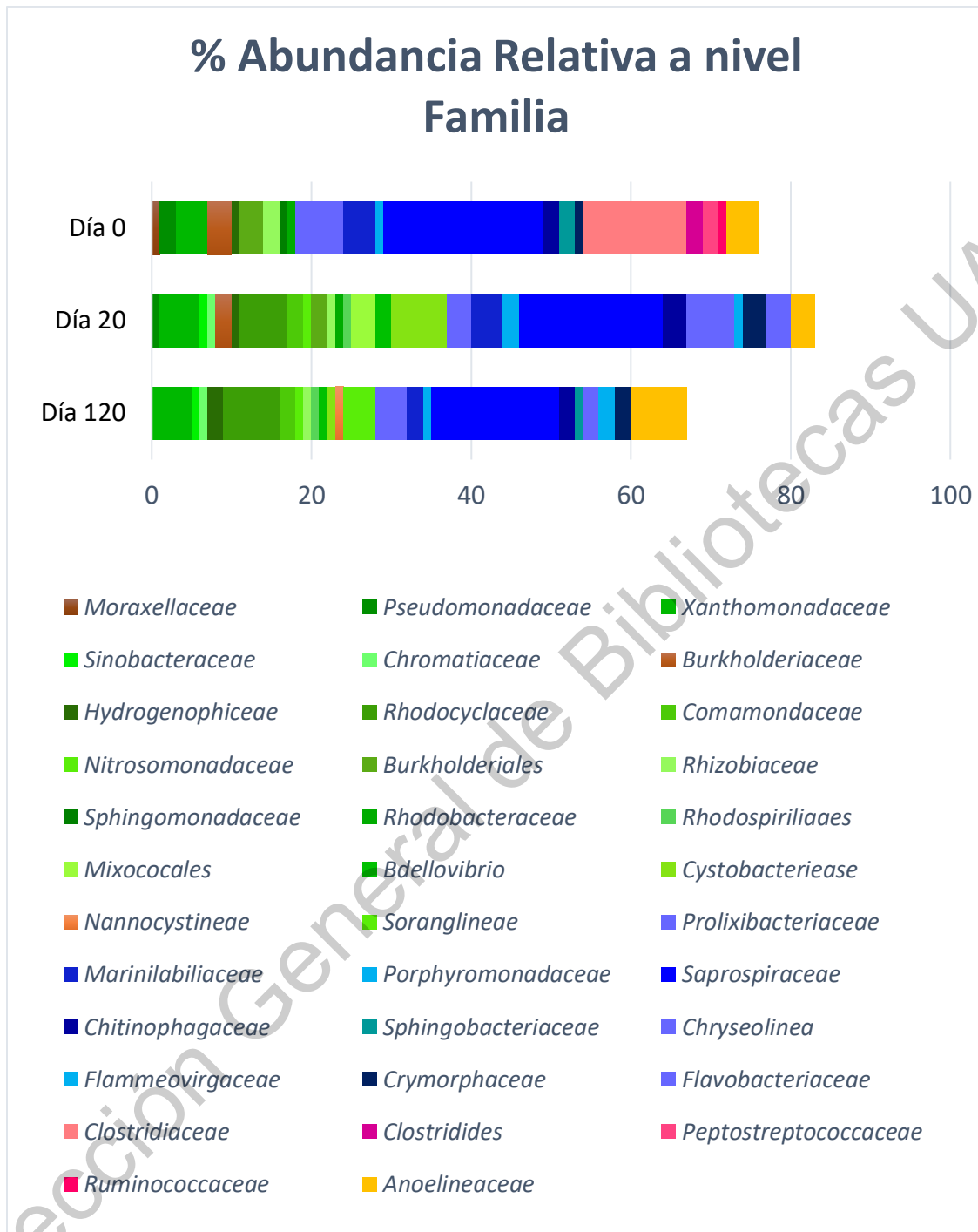


Figura 31. Estructura de comunidades bacterianas a nivel familia en diferentes fases del biorreactor para el tratamiento de aguas residuales domésticas. La abundancia se presenta en términos de porcentaje de la secuencia bacteriana efectiva total en cada muestra.

En base a los resultados se demuestra que la estructura bacteriana se alteró como resultado de la modificación de nicho partiendo de un inóculo en suspensión a la formación de una biopelícula. Sin embargo, la mayoría de las comunidades bacterianas pudieron adaptarse en la biopelícula.

Si bien hay que tener en cuenta que las comunidades bacterianas en reactores y/o plantas de tratamiento son dinámicas (Erijman *et al*; 2011) debido a que estos procesos están sujetos a cambios continuos por efecto de distintos factores de operación como en el caso de esta investigación, sin embargo, la caracterización de la estructura bacteriana en diferentes etapas del sistema nos permite entender mejor estos procesos estableciendo una relación directa con las poblaciones encontradas.

Una biopelícula consiste en una variedad de especies adaptadas que conviven en un estado de simbiosis, por lo cual es necesario mayor investigación sobre su formación y estructura para poder así tener procesos más eficientes. Los resultados presentados en esta investigación pueden resultar útiles para el diseño y la elección del inóculo para los procesos de biofilm en el tratamiento de aguas residuales.

VIII. CONCLUSIONES

El proceso biológico es el más factible y utilizado para tratar descargas domésticas, siendo su variación de lecho fijo (FBBR) una alternativa eficiente ya que presenta ventajas como es un menor tiempo de retención hidráulico y tiempo de residencia, posee una gran variedad de microorganismos en el biofilm capaces de degradar materia orgánica con poca generación de residuos biológicos.

Se desarrolló un sistema FBBR nivel escala laboratorio con un volumen de tratamiento de 70 litros alimentado con agua residual doméstica e inoculado con biomasa en suspensión. Implementando polietileno tereftalato (PET) como medio de soporte para el desarrollo de la biopelícula obteniendo un área de contacto de 7.53m² aumentando la superficie de empalme en comparación a los reactores en suspensión. Fue evaluado durante 150 días, durante este tiempo se pudo diferenciar perfectamente las etapas de un reactor de esta naturaleza, en donde se presenta primeramente la etapa de aclimatación en donde los lodos o microorganismos inoculados se adecuan a su nuevo medio lentamente, en la segunda etapa los microorganismos ya están adaptados a las condiciones del reactor y al agua residual problema y comienzan con la colonización del medio de soporte, en la tercera etapa llamada estabilización el reactor ya tiene un proceso eficiente, constante y permite la depuración de contaminantes y materia orgánica debido a la función de la biomasa.

PET es un material factible para ser implementado como medio de soporte en reactores de lecho fijo, ya que permite la formación rápida y estable del biofilm, desarrollándose a partir de los primeros 7 días de operación. Mediante Microscopía Electrónica de Barrido se comprobó la fijación y desarrollo de este al medio de soporte

Se logró la estabilización del sistema FBBR en un tiempo de 30 días. Al periodo de 90 días de operación el tiempo residencia fue de 4 horas reduciendo el tiempo de residencia 50% en comparación con sistemas en suspensión y una remoción de materia orgánica en términos de DQO y DBO >90% . Disminución en otros parámetros de calidad de agua como: SDT (25%), Color (60%), Turbidez (90%), así como neutralización del afluente con características alcalinas. De igual manera se determinaron los coeficientes biocinéticos de crecimiento biológico: Y, k, Kd, Ks

La aplicación de técnicas moleculares basadas en el biomarcador 16S ARNr permitió identificar que comunidades bacterianas están activos en determinadas etapas del sistema FBBR (inóculo en suspensión, durante la formación del biofilm y en el biofilm estable). Los resultados mostraron 11 phylum, de las cuales solo 8 se encuentran en el inocuo inicial, las poblaciones centrales como *Proteobacterias*, *Bacteroidates* y *Firmicutes* son las de mayor porcentaje de abundancia relativa para las tres fases. Los nuevos phylum caracterizados en las muestras de la biopelícula corresponden a *Ignavibacteriae*, *Parcubacteria* y *Verrucomicrobia* característicos por incluir géneros bacterianos productores de exopolisacáridos y por ende de la matriz polisacárido por tanto pueden considerarse como grupos clave para el desarrollo de la biopelícula.

Partiendo de un inóculo en suspensión (lodos activados) se desarrolló una biopelícula en el soporte de un sistema FBBR. Los resultados indican, con respecto a la diversidad bacteriana, que las bacterias en lodos en suspensión no solo tienen la capacidad de adaptarse para formar biopelícula, sino que también pueden tratar agua residual doméstica en un menor tiempo de residencia

IX. REFERENCIAS

Álvarez-Torrellas S. (2014). *Eliminación de contaminantes emergentes presentes en aguas mediante adsorción en lecho fijo* (Tesis Doctoral). Facultad de ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid. España 347

Anderson S. Kuttuva G., Land C. Dalhammar G. (2008). Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. *FEMS Microbiol Lett* 283: 83-09

Arévalo-Arbeláez A.J., Bedoya-Urrego K., Cabarcas-Jaramillo f., Alzate-Restrepo J.F (2017) Descripción de la microbiota bacteriana residente en el biosólido generado en la planta de tratamiento de aguas residuales San Fernando. Itagüí, Colombia. *Revista De Salud Pública* 6(19)

Bonilla-Rosso G., Souza V., Eguarte L.E., Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La Nueva Ecología en el Bicentenario de Darwin (2008). *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México* 1(11): 41-51

Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J.A., Valdez S. (2011). Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29(8): 601-608

Calderón K., Rodelas B., Cabirol N., González-López J., Noyola A. (2011). Analysis of microbial communities developed on the fouling layers of a membrane-coupled anaerobic bioreactor applied to wastewater treatment. *Bioresource Technology* 102: 4618–4627

Carreón González E.B. (2008). *Aislamiento e identificación de microorganismos en lodos activados*. (Tesis Maestría) Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en ciencia aplicada y Tecnología Avanzada. México. 100

Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) 2016. Estadísticas del agua en México http://www.agua.unam.mx/assets/pdfs/novedades/EstadisticasdelAguaMexico2016_CONAGUA.pdf consultado noviembre 2017.

Crombet S., Abalos-Rodríguez A.; Rodríguez-Pérez S., Pérez-Pompa N. (2016). Evaluación del tratamiento anaerobio de las aguas residuales de una comunidad universitaria. *Revista Colombiana de Biotecnología* 1(8): 49-56

Cydzik-Kwiatkowska A. & Zielińska M. (2016). Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World J. Microbiolgy Biotechnology* 32(66)

Amador –Díaz A., Veliz - Lorenzo E., Bataller – Venta M. (2015). Tratamiento de lodos, generalidades y aplicaciones. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, vol. 46, pp. 1-10

Erijman L. Figuerola E.L.M., Guerrero L., Ayarza J. 2011. Impacto de los recientes avances en el análisis de comunidades microbianas sobre el control del proceso de tratamiento de efluentes. *Revista Argentina de Microbiología* 43: 127-135

Espinosa Arzate M.C. (2017) *Remoción de materia orgánica y benceno de aguas residuales mediante lodos activados acoplados con proceso foto Fenton* (Tesis Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental). Universidad Autónoma de Querétaro, México

Ferrera I., Sánchez O. (2016). Insights into microbial diversity in wastewater treatment systems: How far have we come? *Biotechnology Advance*

Flemming H. C. & Wingender J. (2010) The Biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8(9):623-33

Gagliano M.C., Ismail S.B., Stams A.J.M., Plugge C.M., Temmink H., Van Lier J.B. (2017). Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity. *Water Research*. 121: 61-71

Giustinianovich-Campos E.A. (2011). *Integración de etapa aeróbica a reactores anóxicos/anaeróbicos y caracterización del proceso combinado anóxico/anaeróbico para el tratamiento de riles pesqueros* (Tesis Maestría) Universidad de Concepción, Facultad de Ingeniería. Chile 92

Gondim Porto C. (2013). *Análisis microbiológico de un suelo agrícola mediterráneo tras la aplicación de lodos de depuradora urbana* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense De Madrid, España.

González-Brambila M. & López-Insunza F. (2008). Membrane-Attached biofilm reactor behavior under different flow rate conditions in the treatment of a synthetic wastewater. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7(3): 183-193

Gullicks H., Hasan H., Das D., Moretti C. and Hung Y. (2011). Biofilm Fixed Film Systems Water. *Water Journal* 3:3 843-868

Hubaux N, Wells G., Morgenroth E., (2015). Impact of coexistence of flocs and biofilm on performance of combined nitrification-anammox granular sludge reactors. *Water Research* 68: 127-139

Huijie Lu, Kartik Chandran, David Stensel. (2014). Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Research*

Ibarbalz F.M. (2016). *Metagenómica de lodos activados. Factores determinantes del ensamblado de comunidades bacterianas en el tratamiento de efluentes* (Tesis Doctoral Ciencias Biológicas). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. Argentina 140p

Ingeniería y sistemas ambientales (ISA) <http://www.isa.ec/index.php/va-viene/entry/lodos-activados-vs-contactores-biologicos-rotatorios-rbc-s-vs-reactores-de-lecho-fijo-movil> consultado mayo 2019

Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., & Fine, D. H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. *Journal of bacteriology*, 185(16), 4693-4698.

Kim J., Lim J., Lee C. Kim J. (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment system: Applications and considerations. *Biotechnology Advances* 31(8)

Loera Muro A., Avelar Gonzalez F.J., Guerrero Barrera A.L. (2012). Biopelícula multi-especie: asociarse para sobrevivir. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Lahera R. (2010) Infraestructura sustentable: las plantas de tratamiento de aguas residuales *Quivera Universidad Autónoma del Estado de México* 2(12) 58-69

Liu Y., Kang X., Yuan Y. Performance of aerobic granular sludge in a sequencing batch bioreactor for slaughterhouse wastewater treatment (2015) *Bioresource Technology* 190: 487–491

Mahendran B., Lishman L., Liss S.N. (2012). Structural, physicochemical and microbial properties of flocs and biofilms in integrated fixed-film activated sludge (IFFAS) systems. *Water Research* 46: 5085-5101

Ma J., Wang Z., Yang Y., Mei X., Wu Z. (2013). Correlating microbial community structure and composition with aeration intensity in submerged membrane bioreactors by 454 high-throughput pyrosequencing. *Water Research* 47: 859-869p

Man Hu, Xiaohui Wang, Xianghua Wen, Yu Xia. (2012). Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis *Bioresource Technology* 117: 72–79

Metcalf y Eddy (2013). *Wastewater Engineering (Treatment and Reuse)*. Mc Graw Hill. New York. 574-618

Mendoza Burguete M. Y. (2016). *Acoplamiento de un sistema biológico aerobio y un proceso avanzado de oxidación para el tratamiento de un efluente acuoso* (Tesis Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental). Universidad Autónoma de Querétaro. México. 72p

Mieczkowski D., Cydzik-Kwiatkowska A., (2016). Temperature-induced changes in treatment efficiency and microbial structure of aerobic granules treating landfill leachate. *World J Microbiol Biotechnol* 32:91

Mora Collazos A, Bravo Montaña E. (2017) *Diversidad bacteriana asociada a biopelículas anódicas en celdas de combustible microbianas alimentadas con aguas residuales*. *Acta Biológica Colombiana*. 22(1):77-84

Moreno-Andrade & Buitrón G. (2008). Biodegradación Óptima de Compuestos Fenólicos en un Reactor Discontinuo Secuencial. *BioTecnología* 2(12)

Munawwar Ali Khan., Javeria Mohsina., Sultan Mohammad Faheemb. (2013). Monitoring Microbial Diversity of a Full-Scale Municipal Wastewater Plant in Dubai. *Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society* 5: 102-106

Nava-Urrego L.M., Gasperín Sánchez R. y Durán Moreno A. (2014). Comparación de un reactor de biomasa suspendida y un reactor de biomasa adherida para la biodegradación de compuestos tóxicos presentes en aguas residuales de refinerías de petróleo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 30(1): 101-112

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, Diario Oficial de la Federación 3 de junio de 1998 Consultado noviembre 2017

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SEMARNAT-1997 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público, Diario Oficial de la Federación, 06 de junio del 1997. Consultado noviembre 2017

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, "salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". Consultado noviembre 2017

Organización de las Naciones Unidas (ONU), Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2014. World Urbanization Prospects: The 2014 Revision, Highlights

O'Toole G., Heidi B. Kaplan H.B., Kolter R. (2000) biofilm formation as microbial development Annual Reviews. Microbioly. 54:49–79

Prado-Carrascal A. I. (2016). *Caracterización de la microbiota bacteriana presente en biorreactores de microalgas alimentados con purines* (Master oficial en Ingeniería Ambiental) Universidad de Valladolid Escuela de Ingenierías Industriales España. 50p.

Pabón S.L., Suárez J.H. Arranque y operación a escala real de un sistema de tratamiento de lodos activos para aguas residuales de matadero. (2009) *Revista Ingeniería e Investigación* 29 (2), 53-58

Ramírez-Camacho R., González-Tallón A.I., David Gómezb, Almudena Trinidad , Andrés Ibáñez A., José Ramón García-Berrocala J.R., José María Verdaguera J.M., José Ángel González-García J.A. San Román J. (2007). Microscopia electrónica de barrido ambiental para la detección de biopelículas en las amígdalas. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 59(1):16-20

Rivas-Lucero B.A., Nevárez-Moorillón G.V., Bautista-Margulis R.G., Pérez-Hernández A., Saucedo-Terán R. (2003). Wastewater treatment for agricultural use in a fixed bed bioreactor. *Agrociencia* 37(2), 157-166.

Ramalho R. S. (1996). Tratamiento de agua residual, Barcelona, España: Reverté. INGC-MON-11676.

R.-Boles B., Thoendel M., K.-Singh P. (2004). Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities *PNAS* 101 (47)

Rodicio M.R. & Mendoza M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamentos, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* Volumen 22: 238-245

Sancha-Antuña M. (2013). *Caracterización físico-química y microbiológica de un proceso de tratamiento de lixiviados de vertedero* (Master en Biotecnología Alimentaria) Universidad de Oviedo; España 109

Sandoval C.J., Carreño M., Castillo E.F., Vergara Mendoza M. (2007). Caracterización Microbiológica De Lodos Anaerobios Utilizados En El Tratamiento De La Fracción Orgánica De Los Residuos Sólidos Urbanos. *Scientia et Technical* 35

Sanz J.L. & Kořchling T.(2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42: 119–133

Tejero-Monzón J.I., Esteban–García A.I. Díez-Montero R., Lobo-García A. Rodríguez-Hdez. M.L. (2012). Tecnologías de biopelícula innovadoras para la depuración de aguas residuales veinticinco años de investigación del Grupo de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Cantabria. *Ingeniería Civil* 168. 61-74

Torres Lozada P. & Pérez Andrea Actividad. (2010). Metanogénica específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *EIDENAR*. 5-14p

Varila Quiroga J.A., Díaz López F.E. (2008). Tratamiento de aguas residuales mediante lodos activados a escala laboratorio. *Journal of Technology* 2(7) 21-28 p

Valeriano-Zapana J,A & Gonzales-Limache E. (2016). Caracterización de bacterias halofílas aisladas de un sistema de tratamiento de lodos activados del terminal petrolífero Almirante Barroso Sao Paulo, Brasil. *Revista ciencia y tecnología* 2(3): 23-60

Valenzuela-González F., Casillas-Hernández R., Villalpando E., Vargas-Albores F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas* 41(4): 297–313

Velasco-Pérez A., Puebla H., Martínez-Delgadillo S., Morales M.A., Solar-González R. (2014) Regulation of petrochemical wastewater at an activated sludge system via a simple robust feedback control approach. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 3(12): 919-931

Vigueras-Carmona, Zafra-Jiménez G., García-Rivero M., Martínez-Trujillo M.A., Pérez-Vargas J. (2013). Efecto Del Pretratamiento Sobre La

Biodegradabilidad Anaerobia Y Calidad Microbiologica De Lodos Residuales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 2 (12): 293-301

Wang Q., Garrity G. M., Tiedje J. M., James R. (2007.) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy 16 (73): 5261-5267

Wang X., Zhang Y., Wen X., Xia Y., Hu M., Zhaofang, Ding K. (2012). Real-time PCR quantification of the population dynamics of ammonia-oxidizing bacteria in a pilot-scale wastewater treatment plant. *Biochemical Engineering Journal* 66: 61-65

Wojnowska-Baryła, Cydzik-Kwiatkowska A, Zielińska M. (2010). The application of molecular techniques to the study of wastewater treatment systems. *Methods Mol Biol.* 599:157-83

Xia Y., Wang X., Wen X., Ding K., Zhou J., Yang Y., Yu Z.. (2014). Overall functional gene diversity of microbial communities in three full-scale activated sludge bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(16): 7233-7242.

Xiuheng W., Kun Z., Nanqi R., Li N., Lijiao R. (2009) Monitoring microbial community structure and succession of an A/O SBR during start-up period using PCR-DGGE, *Journal of Environmental Sciences* 21 223-228.

Zhang T., Shao M.f. Ye L. 454 (2011). Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal*