

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS AEROBIOS EN  
UN BIORREACTOR DISCONTINUO SECUENCIAL DURANTE LA  
DEGRADACIÓN DE 4-CLOROFENOL”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**TONATIUH MORENO PERLÍN**

DIRIGIDA POR

**Dr. IVÁN MORENO ANDRADE**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE GRÁNULOS AEROBIOS  
EN UN BIORREACTOR DISCONTINUO SECUENCIAL  
DURANTE LA DEGRADACIÓN DE 4-CLOROFENOL”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**TONATIUH MORENO PERLÍN**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. IVÁN MORENO ANDRADE**

**SINODALES**

**Dr. IVÁN MORENO ANDRADE.**  
DIRECTOR

---

**Dr. WILVERTH R. VILLATORO MONZÓN**  
SINODAL

---

**Dr. VÍCTOR PÉREZ MORENO**  
SINODAL

---

**Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ**  
SINODAL

---

## **Agradecimientos**

En el difícil arte de ser agradecido, el deber me obliga a empezar con mi madre. Gracias ma' por tu paciencia infinita (como sólo una madre puede tener); por tu apoyo, tu ejemplo, tu amor y por haber estado siempre cerca cuando te necesitaba aunque no lo mereciera. Sin ti no habría empezado siquiera este largo camino. Gracias.

A mi padre, que a pesar de haber partido tan temprano me enseñó tantas cosas. Porque juro que lo escucho reír cuando estoy feliz, por darme un gran ejemplo y muchos bellos recuerdos.

También quiero agradecer a mis suegros, porque sin su ayuda el camino de mi familia hubiera sido más largo y difícil. Pero más que nada les agradezco haberme abierto la puerta de su casa y de sus vidas (con mis defectos, pasado y manías) de manera tan súbita y sin recelo. Mi mayor respeto, agradecimiento y cariño.

A familia, mi gran familia, a todos mis tíos, tías, primos, primas, sobrinos, sobrinas, abuelas. En especial a mi tía Chiquis, que cuando peor me portaba mejor me cuidaba; que siempre tuvo tiempo para consentirme y ofrecerme alguno de sus deliciosos platillos. Y a Montse, Ulises, Sebastián y Christian, por ser mis hermanos y compartir mis alegrías, tristezas, triunfos, frustraciones... mi vida a lo largo de tantos años. Ustedes son los que hacen que todo el camino valga la pena.

A Rasheed, porque desde la primera vez que te vi cambiaste mi mundo. Me enseñaste que mi gran y única vocación es ser padre, tú eres mi más grande orgullo y cualquier logro palidece con la dicha que me produce verte crecer. Por enseñarme la esperanza que es vivir y la alegría de cada día.

A Pata, el eje invariable de mi vida, a ti que te me metiste en el alma a primera vista, porque tú me has enseñado (con el ejemplo) a amar hasta que nada más importe. Gracias por acompañarme en este camino y por hacer que cada día a tu lado sea un gran día.

A todos los que me preguntaron "¿Bio- qué?" porque mientras les explicaba de qué se trataba, me fui apasionando por lo que hacía.

A los miembros de mi jurado por sus comentarios que me ayudaron a enriquecer este trabajo. Al Dr. Buitrón por compartirme su amplia experiencia, al Dr. Wilverth por su apoyo en la realización del DGGE, al Dr. Víctor porque siempre fue amable y estuvo dispuesto a ayudarme; y especialmente al Dr. Iván, por estos años compartidos, por enseñarme todo lo que sé del área ambiental y principalmente por permitirme tener la grandiosa oportunidad de trabajar con él. Muchas gracias.

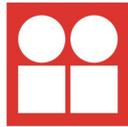
Agradezco el apoyo técnico del M en B. Jaime Pérez Trevilla y a la M. en C. Gloria Moreno Rodríguez por el entrenamiento para la operación de equipos

especializados, asesoramiento técnico de laboratorio y apoyo en el trabajo del día a día en el laboratorio. También quisiera agradecer a todos mis compañeros del LIPATA por haber hecho mi estancia en los laboratorios una experiencia inolvidable.

Y por último gracias a la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar este trabajo de tesis en sus instalaciones.

### **Apoyos Recibidos**

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.



**INSTITUTO  
DE INGENIERÍA  
UNAM**

**LIPATA**

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN  
EN PROCESOS AVANZADOS DE  
TRATAMIENTO DE AGUAS

Se agradece el apoyo financiero, para este trabajo, recibido del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto 103720 y del Fondo de Investigación del Instituto de Ingeniería de la UNAM (Proyectos internos A2) a través del proyecto 9362 para la realización del proyecto de investigación. También se agradece la beca que recibí por parte del CONACYT a través del proyecto 103720.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido.	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1. El Agua.	2
II.1.1. Calidad del agua.	2
II.2. Tratamiento de aguas en México.	3
II.3. Lodos activados.	5
II.4. Clorofenoles.	6
II.4.1. Presencia de clorofenoles en el ambiente.	7
II.4.2. 4-clorofenol.	8
II.5. Granulación aerobia.	8
II.5.1. Proceso de granulación aerobia.	9
II.6. Reactor discontinuo secuencial.	11
II.7. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).	13
II.8. Índices de biodiversidad.	13
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVOS	16
IV.1. General.	16
IV.2. Específicos.	16
V. METODOLOGÍA	17
V.1. Materiales.	17
V.2. Métodos.	17
V.3. Metodología experimental.	23
V.3.1. Arranque, operación y control del biorreactor.	23
V.3.2. Análisis microbiológico del biorreactor.	25

VI. RESULTADOS	26
VI.1. Operación del reactor.	26
VI.2. Aclimatación al 4CF.	26
VI.3. Inducción de la granulación.	28
VI.4 Operación del reactor en fase estacionaria.	29
VI.5 Análisis microbiológico del biorreactor.	30
VI.6 Extracción de ADN.	30
VI.7 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	32
VI.8 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).	34
VII. DISCUSIÓN	37
VIII. CONCLUSIONES	40
IX. BIBLIOGRAFÍA	41
X. ANEXOS	47

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales procesos, por caudal tratado, de tratamiento de aguas residuales municipales.	4
2	Tipos de tratamiento de aguas residuales industriales.	5
3	Medidas de la biodiversidad.	14
4	Reactivos y cantidades que se usaron para la PCR.	22
5	Concentraciones de los reactivos para preparar 15 mL de gel de acrilamida con gradiente desnaturante de 35%-65%.	22
6	Estrategia de operación del reactor.	26
7	Parámetros de la operación del reactor SBR en fase estacionaria.	29
8	Análisis del ADN extraído de las muestras A, B,C, D Y E.	31
9	Resultados de la amplificación por PCR de las regiones V6-V8 de las muestras A, B, C, D y E.	33
10	Matriz de presencia y ausencia de bandas en cada muestra.	35
11	Bandas compartidas entre las diferentes muestras del reactor.	35
12	Índice de Jaccard entre las diferentes muestras.	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Imágenes del lodo en las diferentes etapas de la granulación.	10
2	Fases típicas de un sistema discontinuo secuencial.	12
3	Reactor discontinuo secuencial empleado en el estudio.	24
4	Cinética de degradación de 200 mg/L de 4CF a lo largo del proceso de aclimatación.	27
5	Cinética de degradación del 4CF a partir del ciclo 13.	27
6	Cambios en el IVL y en los SSV a lo largo del proceso de granulación.	28
7	Cambios en la VS a lo largo del proceso de granulación.	29
8	Gránulos aerobios obtenidos después de 308 ciclos de operación. A) Vista normal, B) En microscopio (10X).	30
9	Electroforesis del ADN extraído de las muestras A, B, C, D Y E. Gel de agarosa al 1%, 70mA durante 30:00.	31
10	Programa empleado para la amplificación de las regiones V6-V8 del gen rrs mediante PCR.	32
11	Productos de PCR de las regiones V6-V8 de las muestras. Gel de agarosa al 1%, 70mA durante 30:00.	33
12	Patrón de bandas de los productos de PCR en un gel de acrilamida-bis al 6%. Gradiente de 35-65%, 6 h de corrida, 110 V a 70 °C.	34

## RESUMEN

Las aguas residuales industriales generalmente son difíciles de degradar por los métodos de tratamiento biológico convencionales, debido a que presentan compuestos inhibitorios y altamente tóxicos, por ejemplo, los clorofenoles. Se ha demostrado que los reactores discontinuos secuenciales son capaces de biodegradar compuestos inhibitorios. Se han buscado métodos para dar robustez al sistema discontinuo secuencial; entre ellos destaca la granulación aerobia. En este estudio se presenta la operación de un biorreactor discontinuo secuencial para la selección de microorganismos con capacidades para degradar 4-clorofenol y para formar gránulos aerobios. Se emplearon pruebas fisicoquímicas para evaluar la eficiencia del reactor y de biología molecular para analizar el cambio en la biodiversidad de la población a lo largo del proceso. Los resultados demuestran que se pueden obtener gránulos aerobios capaces de degradar 200mg/L de 4-clorofenol como única fuente de carbono. La aclimatación al 4-clorofenol se realizó mediante el proceso de tiempos de reacción variables y eficiencias fijas. La selección de biomasa granular se obtuvo reduciendo el tiempo de sedimentación. Se alcanzó el 99% de eficiencia en la remoción del compuesto tóxico en menos de 2 horas. La formación de gránulos aumento de manera significativa la velocidad de sedimentación a la vez que disminuyo el índice volumétrico de lodos, lo cual indica una mejora en las características de sedimentabilidad de la biomasa. Los parámetros de operación permanecieron estables durante la operación a largo plazo. Los resultados de biología molecular demuestran una pérdida de la biodiversidad del 66.6% entre el inóculo y los gránulos degradadores de 4-clorofenol.

## I. INTRODUCCIÓN

El acceso al agua en cantidad y calidad adecuada es una necesidad social para toda la población; ya que, además de ser un bien básico, es un factor importante para el desarrollo económico de cualquier país. México cuenta con condiciones privilegiadas, ya que es un país en el que abunda el agua; no obstante, debido a que somos un país tradicionalmente dedicado a la agricultura y a la manufactura, se ejerce una fuerte presión sobre este valioso recurso.

Un factor importante en la presión hídrica es la falta de infraestructura y tecnología necesarias para reutilizar el agua de manera óptima. Un ejemplo claro es el de las aguas residuales provenientes de la industria, de las cuales sólo se trata un porcentaje mínimo y el resto es descargado directamente en ríos y otros cuerpos receptores. Esto representa un grave problema, ya que las aguas industriales son altamente tóxicas al presentar compuestos inhibitorios que afectan seriamente los ecosistemas y son difíciles de remover, incluso empleando sistemas tradicionales de tratamiento de aguas.

El empleo de reactores discontinuos secuenciales se presenta como una opción prometedora para el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos inhibitorios. Recientemente, se han explorado diversas estrategias para aumentar la eficiencia de estos sistemas, una de ellas es el desarrollo de gránulos aerobios.

Los gránulos son agregados de biomasa que se han autoinmovilizado; su presencia le da robustez al sistema discontinuo secuencial, ya que lo hace más tolerante a los cambios en la carga orgánica, a los compuestos inhibidores y además aumenta la actividad metabólica de la biomasa.

Por lo tanto, es importante realizar estudios sobre la formación y la estabilidad de los gránulos aerobios con el fin de desarrollar nuevas tecnologías y estrategias para el tratamiento de aguas industriales.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. El agua

El manejo óptimo de los recursos hídricos es uno de los retos más importantes en el siglo XXI; ya que, además de las fuerzas naturales que los afectan, las actividades humanas se han convertido en un factor importante de presión sobre la disponibilidad y la calidad del agua. (UNESCO, 2009).

A pesar de que la disponibilidad natural media de México es de 458 mil millones de metros cúbicos de agua dulce renovable; la disponibilidad natural media per cápita (que resulta de dividir la disponibilidad natural media entre el número de habitantes) ha disminuido de 18035 m<sup>3</sup>/hab/año en 1950 a tan sólo 4312 en el 2007 (CONAGUA, 2010).

Cabe destacar que en México existen 653 acuíferos, de los cuales 101 están sobreexplotados, estos últimos proporcionan 58% del agua subterránea destinada a todos los usos, mientras que el agua que se recarga, representa 17.3% del total del agua disponible (INEGI, 2010).

El grado de presión del agua indica el porcentaje que representa el agua utilizada respecto a la disponibilidad total. El país en su conjunto experimenta un grado de presión en el agua del 17%, lo cual se considera de nivel moderado; sin embargo, la zona centro, norte y noroeste del país experimenta un grado de presión del 47%, lo cual es considerado como una presión fuerte (CONAGUA, 2010). Siendo evidente la presión que se ejerce sobre los recursos hídricos, cada vez se vuelve más necesaria investigación avanzada en ciencia y tecnología para ayudar a resolver problemas del agua.

#### II.1.1. Calidad del agua

Otro aspecto importante del agua, además del grado de presión que sufre, es la calidad que presenta. En este sentido, el desarrollo de nuevos instrumentos y sistemas para cuantificar y monitorear contaminantes traza, ha ayudado a

identificar de una manera más precisa como responden los sistemas de tratamiento de aguas a la presencia de diversos compuestos; lo cual permite un modelado del proceso más exacto, lo que conlleva a una mejora en el diseño y la operación del sistema (UN, 2003).

Generalmente, la evaluación de la calidad del agua se lleva a cabo utilizando tres indicadores principales: la Demanda Bioquímica de Oxígeno a cinco días ( $DBO_5$ ), la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y los Sólidos Suspendidos Totales (SST). La  $DBO_5$  y la DQO se utilizan para indicar la cantidad de materia orgánica presente en los cuerpos de agua. El primero revela la cantidad de materia orgánica biodegradable, en tanto que el segundo indica la cantidad total de materia orgánica. Los SST tienen su origen en las aguas residuales y la erosión del suelo e indican la cantidad de cuerpos coloidales suspendidos en el agua. (CONAGUA, 2010).

## II.2. Tratamiento de aguas en México.

En México, muchos cuerpos de agua son receptores de descargas directas de residuos domésticos e industriales; por lo que la contaminación del suelo y agua ocurre tanto en áreas urbanas como rurales.

Las descargas de aguas residuales se clasifican en municipales e industriales. Las primeras corresponden a las que son manejadas en los sistemas de alcantarillado municipales urbanos y rurales, en tanto que las segundas son aquellas descargadas directamente a los cuerpos receptores de propiedad nacional.

De acuerdo a datos de la Comisión Nacional del Agua, durante el 2007, en México se generaron 2.07 millones de toneladas de  $DBO_5$  en aguas municipales, de las cuales se removieron tan sólo 0.53 millones de toneladas de  $DBO_5$ ; es decir, sólo se trató efectivamente el 25.6% de las aguas municipales. En el Cuadro 1 se enlistan los principales métodos de tratamiento de aguas municipales y el caudal que es tratado por cada método.

Cuadro 1. Principales procesos, por caudal tratado, de tratamiento de aguas residuales municipales(CONAGUA, 2010).

Proceso	Caudal Tratado (m <sup>3</sup> /s)	Porcentaje
Lodos Activados	38.6	46.19%
Lagunas de Estabilización	14.6	17.49%
Primario Avanzado	8.5	10.17%
Lagunas Aireadas	5.9	7.14%
Dual	4.4	5.23%
Filtros Biológicos	3.8	4.49%
Zanjas de Oxidación	2.3	2.77%
Primario	2.1	2.49%
R.A.F.A.	1.1	1.34%
Humedad Artificial	0.5	0.56%
Tanque Séptico	0.5	0.54%
Otros	0.4	0.50%
Biodiscos	0.4	0.49%
Tanque Imhoff	0.4	0.48%
Reactor Enzimático	0.1	0.13%
Total	83.6	100.00%

Por otra parte, en cuanto a usos industriales se refiere, en México se generaron 6.95 millones de toneladas de DBO<sub>5</sub> durante el 2007 de las cuales se removieron 1.10 millones de toneladas de DBO<sub>5</sub>, lo cual representa tan sólo el 15.8% del total generado (CONAGUA, 2009). En el Cuadro 2 se enlistan los principales métodos de tratamiento de aguas industriales, el tipo de tratamiento, su objetivo, el número de plantas y el porcentaje del caudal que es tratado.

En México, los criterios para la selección de tecnologías empleadas para el tratamiento de las aguas residuales han sido:

- La viabilidad económica, técnica y operativa de la planta.

- La calidad de efluente que es posible obtener con cada tecnología.
- La confianza que las tecnologías ofrecen a las autoridades, por haber sido probadas en un número suficiente de instalaciones en el mundo.

Este último criterio ha propiciado un rezago tecnológico de varios años en el área de tecnología del agua (Escalas, 2006).

Cuadro 2. Tipos de tratamiento de aguas residuales industriales (CONAGUA, 2010).

Tipo de Tratamiento	Propósito	No. de Plantas	Caudal Tratado (m <sup>3</sup> /s)	%
Primario	Ajustar el pH y remover materiales orgánicos y/o inorgánicos en suspensión con tamaño $\geq 0.1$ mm.	648	12.25	36.26
Secundario	Remover materiales orgánicos coloidales y disueltos.	1185	17.62	52.16
Terciario	Remover materiales disueltos que incluyen gases, sustancias orgánicas naturales y sintéticas, iones, bacterias y virus.	66	0.83	2.46
No especificado		183	3.08	9.12
Total		2082	33.78	100.00

### II.3. Lodos activados

Los métodos para el tratamiento de aguas pueden ser físicos, químicos, biológicos o una combinación de éstos. Entre estos métodos, los tratamientos biológicos tienen gran importancia.

El proceso de lodos activados es el tratamiento biológico estándar en los países industrializados. En general, tiene costos elevados de inversión y operación, pero produce efluentes de mayor calidad que otros procesos simples (Escalas, 2006).

En este proceso, el material orgánico del agua es aprovechado por los lodos activados (microorganismos) para crecer y reproducirse, llevando a cabo una oxidación del material de desperdicio hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . El proceso se lleva a cabo en una mezcladora en un ambiente aerobio, a la mezcla de agua residual y lodos activados en el tanque de aireación se le llama licor mezclado. Para separar el lodo del efluente, se emplea un tanque en el que se permite que el lodo sedimente (clarificador). Los lodos son reutilizados en el ciclo y el efluente puede seguir otro tipo de tratamiento.

En el tratamiento de aguas residuales, es preferible el tratamiento biológico al físico o al químico, debido a la posibilidad de la mineralización completa de los contaminantes presentes en el agua (Metcalf y Eddy, 2003).

A nivel microbiológico, durante el tratamiento de agua por lodos activados se llevan a cabo dos procesos específicos (Bitton, 2005):

- Oxidación del material biodegradable para producir nuevas células.
- Floculación y separación de la biomasa recientemente formada del efluente.

#### II.4. Clorofenoles

Los compuestos fenólicos y sus derivados son un grupo importante de contaminantes presentes en las aguas de desecho de diversas industrias. Dentro de los compuestos fenólicos, destacan la familia de los clorofenoles (CF's), en los cuales se sustituye un átomo de hidrógeno por uno de cloro. Su presencia es amplia en la industria alimentaria, petrolera, carbonera, de resinas, textil y papelera (Nicell y col., 1993).

Es sabido que los CF's son altamente tóxicos, y que el consumo durante 10 días de agua contaminada con 3ppm de 2,4-diclorofenol puede causar el vómito, la parálisis e incluso la muerte (Aoyama y col., 2005). Entre los daños que producen

los CF's a la salud humana se encuentran: constituyen un factor de riesgo importante para desarrollar linfoma maligno(Hardell y col., 1981);inducen una depresión inmunológica, tienen efectos mutagénicos (Lampi y col. 2000) y además actúan como disruptores endocrinos al interferir en el transporte de hormonas tiroideas (van den Berg, 1990).

La toxicidad de los clorofenoles se debe a su capacidad para desacoplar la respiración celular. Este efecto se debe a su liposolubilidad, lo cual les permite atravesar la membrana celular; al ser ácidos débiles, forman iones de fenolato cuando el hidrógeno del grupo del hidroxilo se disocia del compuesto original. Un ión de fenolato puede tomar un protón en el exterior de la membrana celular, pasar a través de la membrana y depositar el protón en el citoplasma de la célula. El ión de fenolato se puede difundir hacia afuera y empezar un nuevo ciclo (Escher y col., 2001).

Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés), compuestos como el 2,4,6-triclorofenol, el 2-clorofenol, el 2,4-diclorofenol y el pentaclorofenol se encuentran entre los 65 contaminantes del agua de mayor prioridad(EPA, 2007).

#### II.4.1. Presencia de clorofenoles en al ambiente

De acuerdo a la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés), los CF's pueden entrar al ambiente cuando se usan como pesticidas o como microcontaminantes de las aguas de desecho de las industrias (ATSDR, 1999).

Cabe destacar que, aunque algunos clorofenoles son producidos de manera natural como metabolitos de algunas organismos, su contribución es insignificante al medio y prácticamente todos los clorofenoles presentes en el ambiente son de origen antropogénico, principalmente de derrames y filtraciones provenientes de las industrias maderera y del papel (WHO, 1989).

#### II.4.2.4-clorofenol

Desde el punto de vista ambiental, uno de los CF's más importante es el 4-clorofenol (4CF), debido a que puede ser formado por la cloración del agua residual, durante la cloración para blanquear la pulpa para la fabricación de papel o mediante la ruptura de herbicidas fenólicos como por ejemplo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Pritchard y col., 1987). El 4CF es también un producto de la degradación anaerobia de los fenoles altamente clorados como el pentaclorofenol, que son utilizados intensivamente en el tratamiento de madera (Madsen y Aamand, 1992).

Debido a sus características altamente inhibitorias, el 4CF es un compuesto difícil de degradar por los sistemas convencionales de tratamiento de aguas residuales.

#### II.5. Granulación aerobia

Desde hace muchos años se han realizado diversos trabajos en los cuales se demuestra la viabilidad del empleo de sistemas biológicos de tratamiento de aguas para la biodegradación de compuestos orgánicos halogenados, incluyendo a los CF's (Chaudhry y Chapalamadugu, 1991). Por ejemplo, se ha demostrado que es posible la remoción del 98% de DQO de un agua industrial simulada con ácido acético, fenol, 2,4-diclorofenol y 2,4-6 triclorofenol mediante tratamiento anaeróbico (Flora y col., 1994). No obstante, los sistemas de tratamiento biológico convencionales como lodos activados son sensibles a cargas altas y a fluctuaciones en la carga de fenol debido a la inhibición por sustrato (Watanabe y col., 1999).

La inhibición por sustrato se puede superar mediante estrategias de inmovilización celular, lo que protege a los microorganismos de la toxicidad de dichos compuestos (Massol-Deya y col., 1997).

Se ha reportado que la granulación aerobia es una tecnología de inmovilización celular viable y prometedora para la degradación de compuestos tóxicos altamente inhibitorios(Nor-Anuar y col., 2006).

Los gránulos aerobios son masas compactas y densas de agregados microbianos que se forman debido a la autoinmovilización de diferentes tipos de microorganismos. Generalmente están conformados por diferentes tipos de bacterias, hongos, protozoarios y rotíferos. El tipo de crecimiento y los organismos predominantes dependen principalmente de las características del agua de alimentación; por lo que representan un complejo microcosmos en sí mismos (Bitton, 2005).

Las ventajas que ofrece la granulación aerobia son (Jiang y col., 2004, Su y col., 2005; Nor-Anuar y col., 2007):

- Estructura microbiológica regular, resistente y densa.
- Excelente sedimentabilidad.
- Alta retención de biomasa.
- Eficiencia en la transmisión de masa.
- Alta actividad metabólica
- Resistencia a altos índices de carga de contaminantes, en comparación con el método tradicional de lodos activados.
- Reducción del espacio de los biorreactores.

Recientemente, se ha reportado la formación de gránulos empleando compuestos tóxicos como única fuente de carbono. Por ejemplo, empleando al fenol (Jiang y col., 2004) y al 4-clorofenol (Buitrón y col., 2003) como sustrato.

#### II.5.1. Proceso de Granulación Aerobia

El proceso de granulación aerobia es complejo y para su estudio, se ha propuesto dividirlo en cuatro fases (Su y col., 2005):

- Aclimatación: comprende desde el momento de la inoculación hasta que los gránulos aparecen, se caracteriza porque es cuando los flóculos presentes en el lodo comienzan a volverse más densos, aunque de forma irregular (Figura 1A).
- Iniciación: es cuando aparecen los primeros gránulos, la velocidad de sedimentación y la gravedad específica no varían significativamente (Figura 1B).
- Formación: la velocidad de sedimentación aumenta lentamente, mientras que el tamaño y la densidad lo hacen de manera significativa. En esta fase los gránulos pasan de ser agregados densos de forma irregular a gránulos propiamente dichos (Figura 1C).
- Maduración: los gránulos dejan de crecer y la velocidad de sedimentación y la gravedad específica se vuelven constantes (Figura 1D).

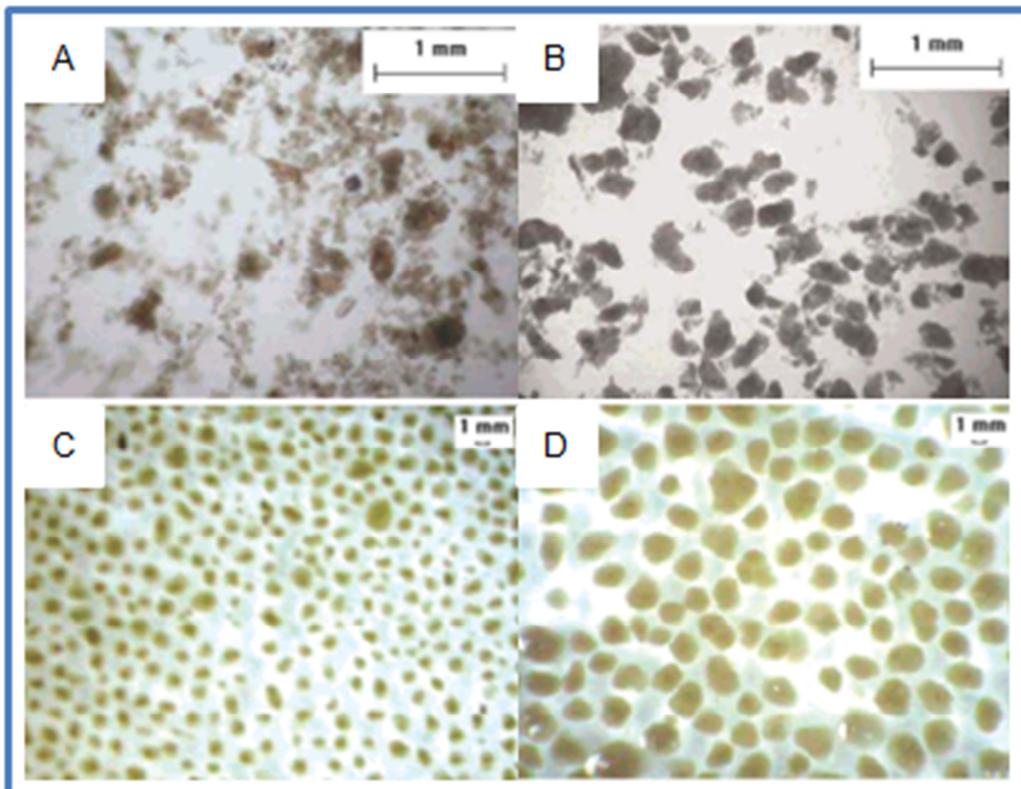


Figura 1. Lodo en las diferentes etapas de la granulación (modificado de Su y col., 2005): aclimatación (A), iniciación (B), formación (C) y maduración (D).

Se han realizado diversos trabajos para establecer las condiciones apropiadas que promueven la una granulación aerobia. Los parámetros que han resultados ser los más influyentes son: tiempo de sedimentación y de llenado (deben ser cortos) y volumen de recambio (debe de ser alto) (McSwaine y col., 2004;Etterer, 2006; Li y Li., 2009).

Estos tres parámetros pueden ser fácilmente manipulados en un reactor discontinuo secuencial (SBR por sus siglas en inglés); lo cual vuelve a este tipo de reactores ideales para la formación de gránulos aerobios (Liu y col., 2005).

## II.6. Reactor discontinuo secuencial (SBR)

Los reactores discontinuos secuenciales son una tecnología que presenta altas eficiencias en la degradación de aguas residuales industriales que contienen compuestos inhibitorios (Buitrón y col., 2007).

Los SBR's son sistemas que operan bajo cinco fases bien definidas, las cuales son: llenado, reacción, sedimentación, vaciado y tiempo muerto. Dichas fases se repiten de manera cíclica. Un ciclo inicia con la fase de llenado, durante esta fase se alimenta al reactor con el agua residual a degradar, en este momento inicia la degradación de sustratos. Posteriormente, en la fase de reacción el sustrato es degradado por los microorganismos. Durante la fase de sedimentación se separa la biomasa del agua tratada, esto se logra dejando al tanque en reposo, de tal manera que la biomasa se vaya al fondo del tanque. En la etapa de vaciado, el agua clarificada es drenada, por lo que en el reactor sólo permanece la biomasa con un remanente de agua. El tiempo muerto es el tiempo entre el vaciado y el llenado y tiene como fin el poder realizar diferentes ajustes operacionales entre ciclos, aunque existe la posibilidad de ser eliminado. Después del tiempo muerto inicia otro ciclo con la etapa de llenado.

En general, el proceso en un SBR tiene tres características importantes (Wilderer y col., 2001).

- Repetición periódica de una secuencia de fases definidas.

- La duración de cada fase es flexible de acuerdo al resultado que se espera.
- El tiempo se puede manipular para realizar varias reacciones biológicas y/o físicas.

En la Figura 2, se muestran las fases típicas de los SBR's. Aunque, las diferentes versiones de los SBR's incluyen influentes continuos y/o periódicos, distintas fases de reacción, sedimentación y/o vaciado (Wilderer y col., 2001).

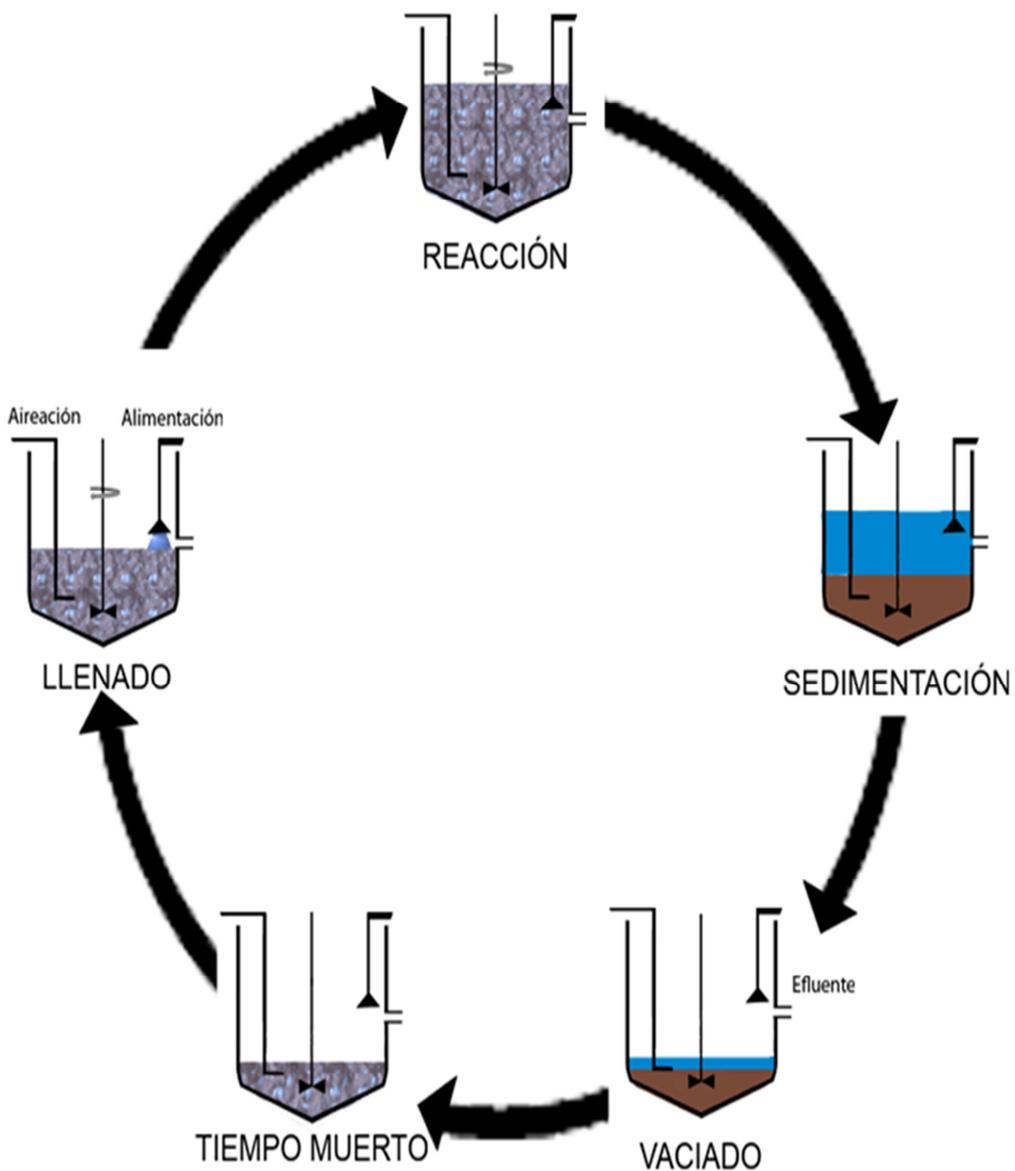


Figura 2. Fases típicas de un sistema discontinuo secuencial.

## II.7. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los gránulos poseen una gran diversidad biológica por lo que para su estudio es necesario emplear técnicas que eviten la pérdida de la diversidad de la muestra; como las técnicas de aislamiento de microbiología tradicional, donde se ha observado que se puede perder hasta el 95% de la diversidad de la comunidad (Etchebere y col., 2001).

Un método para el estudio de este tipo de muestras es mediante la reacción en cadena de la polimerasa en conjunto con una electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, (PCR-DGGE, por sus siglas en inglés) (Muyzer y col, 1993).

En esta técnica, primero se extrae el ADN genómico total de la muestra. Posteriormente se emplean cebadores universales para amplificar, mediante PCR, una región hipervariable del gen de la subunidad 16S del rDNA (gen *rrs*, por sus siglas en inglés); dichas regiones son únicas para cada microorganismo (Lane 1985). Posteriormente, los diferentes amplicones son separados mediante DGGE, de tal modo que en el gel es posible observar diferentes bandas y cada banda representa una especie presente en la muestra (Muyzer y col, 1993).

## II.8 Índices de biodiversidad

Tradicionalmente, para medir la diversidad biológica de una población se ha empleado al número de especies como unidad de análisis; es decir, entre más especies es más diversa la población. Este tipo de diversidad dentro de una comunidad se llama  $\alpha$  diversidad, e incluye la medición del número total de especies (riqueza), o la abundancia relativa de las especies (cuantificación de las especies) o una combinación de ambas dimensiones (Lozupone y Knight, 2008).

De manera análoga, la diversidad  $\beta$  indica la diversidad entre dos poblaciones. Para calcularla se emplea el número de especies que tienen en común las comunidades. Este tipo de diversidad generalmente se usa para evaluar una misma comunidad a lo largo del tiempo o dos comunidades bajo diferentes

condiciones ambientales. En el Cuadro 3 se resumen los principales métodos para medir la diversidad  $\alpha$  y  $\beta$ .

Uno de los métodos comúnmente usado para la cuantificación de la diversidad es el Índice de Jaccard, el cual mide la diferencia entre dos comunidades basándose en el número de especies que comparten entre sí (Lozupone y Knight, 2008).

Cuadro 3. Medidas de la biodiversidad (modificado de Lozupone y Knight, 2008).

	Medición de la diversidad dentro de una comunidad (diversidad $\alpha$ )	Medición de la diversidad entre comunidades (diversidad $\beta$ )
Presencia/Ausencia de un grupo taxonómico determinado	<p>Diversidad <math>\alpha</math> cualitativa (riqueza).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Basada en las especies: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Chao 1.</li> <li>▪ Ace.</li> <li>▪ Rarefacción.</li> </ul> </li> </ul>	<p>Diversidad <math>\beta</math> cualitativa.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Basada en especies: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Coeficiente de Sørensen.</li> <li>▪ Coeficiente de Jaccard.</li> </ul> </li> </ul>

Es posible analizar el patrón de bandas presentes en dos muestras (poblaciones) de un gel de DGGE mediante un sistema binario y el Índice de Jaccard. En este sistema, a la presencia de una banda se le asigna el valor de 1 y a la ausencia el de 0. Posteriormente se crea una matriz para comparar las bandas que se tienen en común y el número total de bandas y se resuelve la siguiente ecuación:

$$J = \frac{n_{AB}}{n_A + n_B - n_{AB}}$$

Donde  $n_{AB}$  es el número de bandas comunes entre A y B,  $n_A$  es el número de bandas en A,  $n_B$  es el número de bandas en B. Entre mayor sea el índice, es decir más se acerque a 1, las poblaciones serán más similares y será más probable que sean la misma (Schloss y Handelsman, 2006).

### **III. HIPÓTESIS**

La operación de un biorreactor discontinuo secuencial permitirá la selección de microorganismos con capacidades de degradar el 4-clorofenol y de formar gránulos aerobios.

## **IV. OBJETIVOS**

### IV.1 General

Evaluar la formación de gránulos aerobios en un biorreactor discontinuo secuencial durante la degradación de 4-clorofenol.

### IV.2 Específicos

- Realizar el arranque, aclimatación y operación de un reactor discontinuo secuencial para la formación de gránulos aerobios para el tratamiento de aguas residuales conteniendo compuestos tóxicos (4-clorofenol).
- Determinar los cambios en la degradación de 4-clorofenol, sólidos suspendidos volátiles y totales, índice volumétrico de lodos, y velocidad de sedimentación debido a la formación de gránulos aerobios.
- Determinar si existen cambios en las poblaciones de los microorganismos durante la aclimatación a la degradación de 4-clorofenol y la posterior formación de gránulos aerobios.

## V. MÉTODOLÓGÍA

### V.1 Materiales

- Tubos para centrífuga de 2, 15 y 50mL.
- Micropipetas de 0.5-10, 10-100 y 100-1000 $\mu$ L.
- Microcentrífuga.
- Vórtex.
- Plato caliente con agitador magnético.
- Cámara para electroforesis.
- Cámara DCode™System para DGGE.
- Termociclador.
- Fuente de poder.
- Fotodocumentador.
- Espectrofotómetro UV-VIS.
- Vasos de precipitado de 100mL.
- Matraces aforados de 50mL.
- Pipetas de 5mL.
- Probeta de 1L.
- Mufla.
- Estufa.
- Filtros GF/A, 25mm y 55 mm de diámetro.
- Matraz Kitasato.
- Desecador.

### V.2 Métodos

Se evaluaron los siguientes parámetros fisicoquímicos de acuerdo a Standard Methods (APHA, 2005): Índice volumétrico de lodos (IVL), Velocidad de Sedimentación (VS), Sólidos Totales (ST) y Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV). Se cuantificarán los Fenoles totales de acuerdo al método de la 4-aminoantipirina.

#### Determinación de fenoles totales

Se obtenían 15 mL de licor mezclado del reactor y se centrifugaban a 3000 g durante 2.5 minutos. Posteriormente, se recuperaba el sobrenadante y se filtraba con un filtro GF/A de 25mm (Whatman), se tomaba 1mL y se aforaba a 50mL.

Se agregaban 1.25 mL de solución D (0.5N de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , en tampón de fosfatos, pH 7.9); 0.5 mL de solución E (20 g/L de 4-aminoantipirina) y 0.5 mL de solución F (80 g/L de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ). A la par, se preparaba un blanco con 50 mL de agua destilada siguiendo el mismo procedimiento. Se agitaba cada matraz y se les dejaba reaccionar durante 15 minutos.

La cuantificación se llevaba a cabo por espectrofotometría usando una curva estándar. Si la concentración detectada era mayor a 5 mg/L, se diluía para que quedara en el intervalo de 0 a 5 mg/L.

Para realizar la curva estándar, se empleaban estándares de fenol a concentraciones de 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L. Las muestras se preparaban siguiendo el procedimiento previamente descrito y se leían a 590 nm en el espectrofotómetro en el modo de calibración, en orden ascendente. Después de cada lectura, se introducía la concentración correspondiente. El instrumento determinaba la curva y la pendiente.

#### Preparación del filtro para sólidos suspendidos totales y volátiles

Se emplearon filtros tipo GF/A, de 55mm de diámetro (Whatman), los cuales eran lavados con agua destilada y secados con un matraz Kitasato conectado a la línea de vacío. Posteriormente se llevaban a peso constante. Para esto se colocaban en la estufa a 103 – 105°C durante 1 hora. Después en una mufla a 550°C durante 15 minutos. Y por último se regresaban a la estufa por otros 15 minutos. Los filtros se guardaban en un desecador hasta su uso.

#### Sólidos suspendidos totales (SST)

Para obtener los SST, primero se pesaba un filtro previamente preparado, a este peso se le asignaba como peso B; a continuación se colocaba el filtro en el aparato de vacío y se agregaban 10 mL de muestra del licor mezclado. Posteriormente la muestra se secaba durante 1 hora a 103 – 105°C. Por último se pasaba el filtro a un desecador durante 15 minutos.

Para obtener los SST se volvía a pesar el filtro (peso A) y se resolvía la siguiente fórmula:

$$\text{gSST/mL} = (A - B) / \text{mL muestra.}$$

Sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Se emplearon los filtros de los que se habían obtenido los SST. Se colocaban los filtros con los SST en una mufla a 550°C durante 15 minutos. A continuación, se pasaban los filtros a una estufa a 103 – 105°C durante 15 minutos y luego se transferían a un desecador por 15 minutos.

Para obtener los SSV se volvían a pesar los filtros (peso C) y se resolvía la siguiente fórmula:

$$\text{gSSV/mL} = (A - C) / \text{mL muestra.}$$

Índice volumétrico de lodos (IVL) y velocidad de sedimentación (VS)

Para medir el IVL se tomaba una muestra de 1 L de licor mezclado del reactor. La muestra se colocaba en una probeta de 1 L, se agitaba la probeta y al mismo tiempo se iniciaba un cronómetro.

Posteriormente se anotaba el volumen que ocupaba el precipitado (biomasa) en la probeta a los 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 10.0, 20.0 y 30.0 minutos. El IVL era igual al volumen a los 30.0 min. Y se expresaba con relación a los gramos de SSV presentes en el reactor como mL/gSSV.

Para obtener la VS se resolvía la siguiente ecuación:

$$VS = 0.6m/At$$

Donde m era la pendiente máxima en el experimento de IVL (cm<sup>3</sup>/min), At representa el área transversal de la probeta (cm<sup>2</sup>) y 0.6 es el factor de conversión de tiempo y volumen (minutos a horas y centímetros a metros).

## Extracción de ADN

Las extracciones de ADN genómico total se llevaron a cabo mediante el kit comercial UltraClean® Soil DNA Extraction Kit (MoBio), siguiendo el siguiente protocolo para maximizar el rendimiento:

1. Agregar 0.5 g de muestra al tubo de lisis.
2. Mezclar con vórtex brevemente.
3. Agregar 60 µl de la solución S1 (SDS) y mezclar con vórtex brevemente.
4. Agregar 200 µl de la solución IRS (agente precipitador de ácidos húmicos y otros inhibidores de PCR).
5. Fijar con cinta adhesiva los tubos de lisis al vórtex de manera horizontal. Mezclar a máxima velocidad por 10 minutos.
6. Centrifugar a 10,000 g por 30 segundos.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 2 mL limpio.
8. Agregar 250 µl de solución S2 (precipitador de proteínas) y mezclar en el vórtex por 5 segundos. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
9. Centrifugar por 1 minuto a 10,000 g.
10. Transferir todo el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 2 mL evitando la pastilla.
11. Añadir 1.3 ml de solución S3 (solución con alta concentración de sales) al sobrenadante y mezclar en vórtex por 5 segundos.
12. Cargar 700 µL de la mezcla en un filtro y centrifugar a 10,000 g durante 1 minuto.
13. Desechar el filtrado y repetir el paso 13 hasta que haya pasado toda la muestra.
14. Añadir 300 µL de solución S4 (etanol) y centrifugar durante 30 segundos a 10,000 g.
15. Desechar el filtrado.
16. Centrifugar otra vez a 10,000 g durante 1 minuto.
17. Colocar el filtro en un tubo Eppendorf de 2 mL nuevo.

18. Agregar 50  $\mu$ L de solución S5 (amortiguador de elución) en el centro de la membrana del filtro.
19. Centrifugar a 10,000 g por 30 segundos.
20. Desechar el filtro; el ADN se encuentra en el tubo.

Los pasos 15 y 16 se realizaban dos veces para aumentar la pureza del ADN.

### Electroforesis

Las electroforesis se llevaron a cabo en una cámara para electroforesis Accesolab modelo PHU6 y con una fuente de poder Wealtec modelo Elite 30. Se emplearon geles de 25 mL de agarosa UltraPure™ (Invitrogen) al 1.0% en solución amortiguadora de TAE 1x (tris base, ácido acético y EDTA). Como marcador de peso molecular se empleó al 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Como buffer de carga) se utilizó el UltraClean™ Gel Dye (azul de bromofenol y glicerol 6x (MoBio).

Se cargaban 3:1  $\mu$ L de muestra y buffer de carga por cada pozo y se corría la prueba por 30 minutos a una intensidad de 70mA. Con el fin de asegurar la pureza del ADN extraído se medía el índice de OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> (Sambrook y Russel, 2001) en un espectrofotómetro Lambda 25 UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer Instruments).

Los geles se revelaban con SYBR GREEN (Invitrogen) al 1:10000 en agua destilada, posteriormente se utilizaba el fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak) empelando el programa de Molecular Imaging (Kodak) para cuantificar el ADN y para determinar el número de pares de bases presente en las muestras, de acuerdo al método del fabricante.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las regiones V6-V8 del gen rrs de las muestras fueron amplificadas mediante PCR en un termociclador Gradient Palm-Cycler (modelo CG1-96, Corbett

Research). Se emplearon los cebadores F-968(GC) y R-1401(Invitrogen) y a la TopTaq® Mastermix (Quiagen) como buffer de PCR. Se trabajó con un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L, empleando 12.5 $\mu$ L de TopTaq Mastermix, 1 $\mu$ M de cada cebador, y cantidades variables de muestra de ADN, agua y  $MgCl_2$  25 mM (Cuadro 4).

Se realizó una curva de concentración de  $Mg^{++}$  con el fin de encontrar las condiciones óptimas de amplificación (Anexo A).

Cuadro 4. Reactivos y cantidades que se usaron para la PCR.

Reactivo	Cantidad ( $\mu$ L)
TopTaq Mastermix	12.5
$MgCl_2$ , 25 mM	Variable
ADN (diferentes concentraciones)	Variable
Iniciadores 1 $\mu$ M (F698-GC y R1401)	1 de cada uno
dH <sub>2</sub> O	Ajustando a 25 $\mu$ L

#### Electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE)

Los productos de PCR fueron separados mediante DGGE en un gel de acrilamida/bis-acrilamida 37.5:1 (BioRad) al 6%. Para crear el gradiente desnaturante se empleó Formamida (Sigma) y Urea (BioRad) en las concentraciones que se indican en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Concentraciones de los reactivos para preparar 15 mL de gel de acrilamida con gradiente desnaturante de 35%-65%.

Reactivo	65%	35%
A-Bis (mL)	2.25	2.25
TAE 50X (mL)	0.3	0.3
Formamida (mL)	2.1	3.9

Urea (mL)	5.25	9.75
dH <sub>2</sub> O (mL)	5.1	--

Para lograr la polimerización se utilizaron 150  $\mu$ L persulfato de amonio (USB) al 10% y 8  $\mu$ L de N,N,N',N'-Tetrametiletetilendiamina, TEMED (BioRad) por cada 15 mL de solución. El experimento se llevó a cabo en una cámara DCode™ System (BioRad).

Para analizar el gel se seguía el mismo procedimiento que en la electroforesis.

### V.3. Metodología experimental

La metodología experimental se dividió en dos fases. La primera fase fue el arranque, la operación y el control del biorreactor. La segunda fase se enfocó en el análisis microbiológico del biorreactor.

#### V.3.1. Arranque, operación y control del biorreactor.

Para el estudio se empleó un reactor SBR como el que se muestra en la Figura 3. El arranque del biorreactor se llevó a cabo empleando un inóculo con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento biológico que trata aguas residuales municipales (2000 mgSSV/L). La aclimatación de los microorganismos a la biodegradación de 4CF se realizó por medio de la estrategia de tiempos de reacción variables y eficiencias fijas descrita por Buitrón y col. (2007).

Como sustrato se empleó agua sintética incluyendo al 4-clorofenol como única fuente de carbono y energía. Se evaluaron los parámetros fisicoquímicos del reactor por medio de un muestreo periódico. Se buscó seleccionar y ajustaron los parámetros de operación para obtener la granulación de la biomasa degradadora de compuestos fenólicos. Entre los parámetros evaluados se encuentran los siguientes: fenoles totales, SST, SSV, índice volumétrico de lodos y velocidad de sedimentación. El reactor se operó por tres meses con el fin de realizar la

aclimatación de la biomasa a la degradación de 4CF, la granulación de la biomasa y evaluar la estabilidad a largo plazo del sistema.

Se obtuvieron muestras durante la operación del biorreactor para su posterior análisis de diversidad microbiológica.

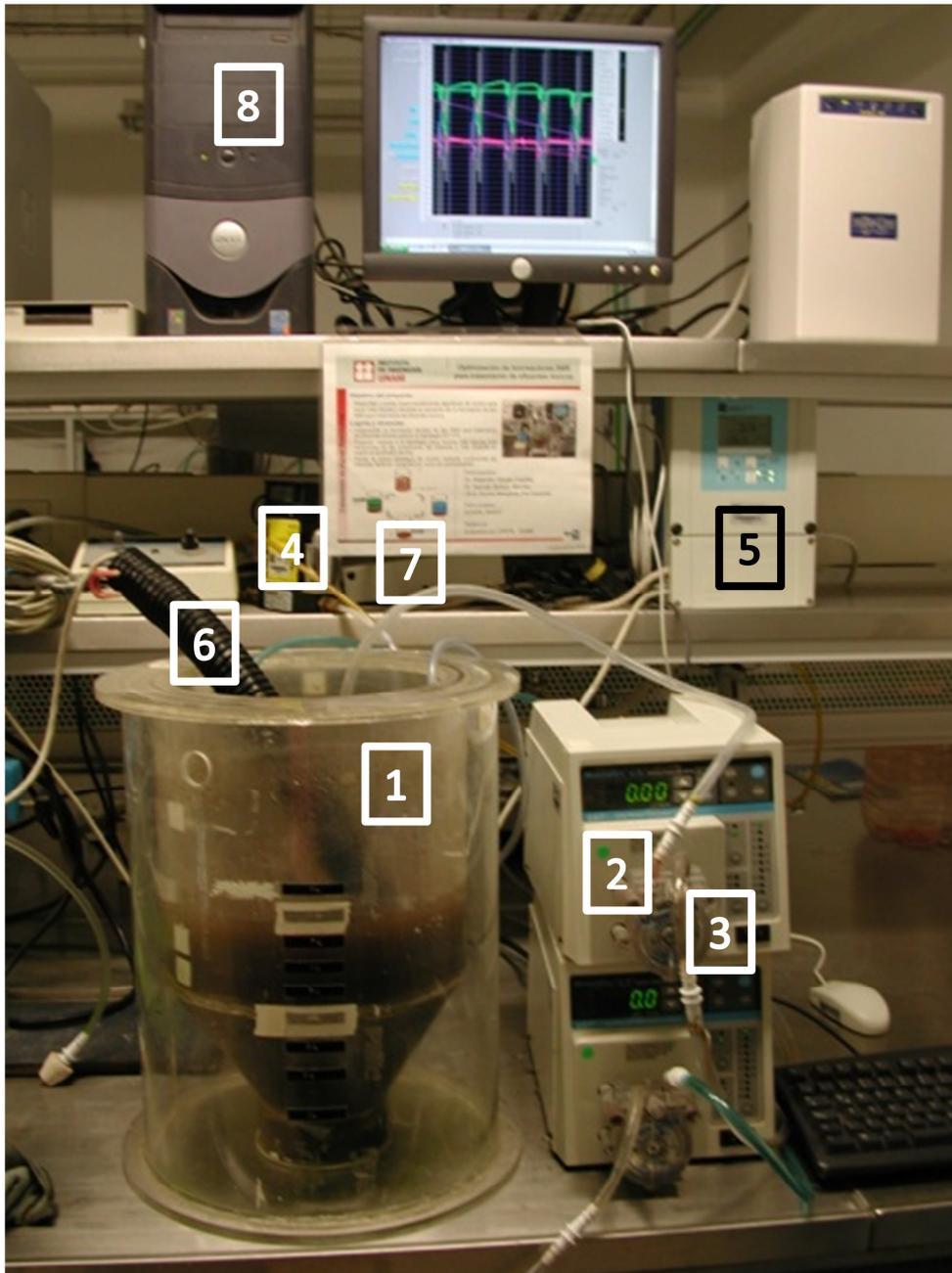


Figura 3. Reactor discontinuo secuencial empleado en el estudio. 1) Reactor, 2) Bomba de vaciado, 3) Bomba de llenado, 4) Controlador de flujo másico de oxígeno, 5) Oxímetro, 6) Detector de oxígeno, 7) Aireación, 8) Computadora.

#### V.3.2. Análisis microbiológico del biorreactor.

Las muestras de biomasa tomadas durante la operación del biorreactor fueron evaluadas por medio de la técnica PCR-DGGE. Las bandas obtenidas se emplearon para analizar el índice de diversidad de las muestras empleando el Índice de Jaccard.

## VI.RESULTADOS

### VI.1. Operación del reactor

El reactor SBR fue operado durante 188 días (1068 ciclos). La estrategia de operación del reactor se realizó como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Estrategia de operación del reactor.

Etapa	Duración	Observaciones
Pre aireación	15 minutos	Con el fin de saturar de oxígeno el tanque y facilitar la degradación de cualquier traza de 4CF que pudiera quedar del ciclo anterior.
Llenado	5 minutos	Se trabajó con un volumen de intercambio de 4 L es decir el 57% del volumen total del reactor (7 L).
Reacción	Variable	La duración dependía del tiempo necesario para degradar al menos el 95% del compuesto tóxico. Varió entre 50h y 2h en los primeros 10 ciclos debido a la aclimatación de los microorganismos, posteriormente se mantuvo alrededor de 2 h.
Sedimentación	Variable	Inicialmente fue de 30 min. y gradualmente se redujo hasta 1 min., una vez que se obtuvo la granulación de la biomasa.
Vaciado	3 minutos	

### VI.2. Aclimatación al 4CF

Siguiendo la metodología de operación previamente descrita, se obtuvo la aclimatación de los microorganismos a la degradación de 4CF después de 12 ciclos (7 días). En la Figura4 se muestran las cinéticas de degradación de 4 CF en diferentes ciclos durante el proceso de aclimatación.

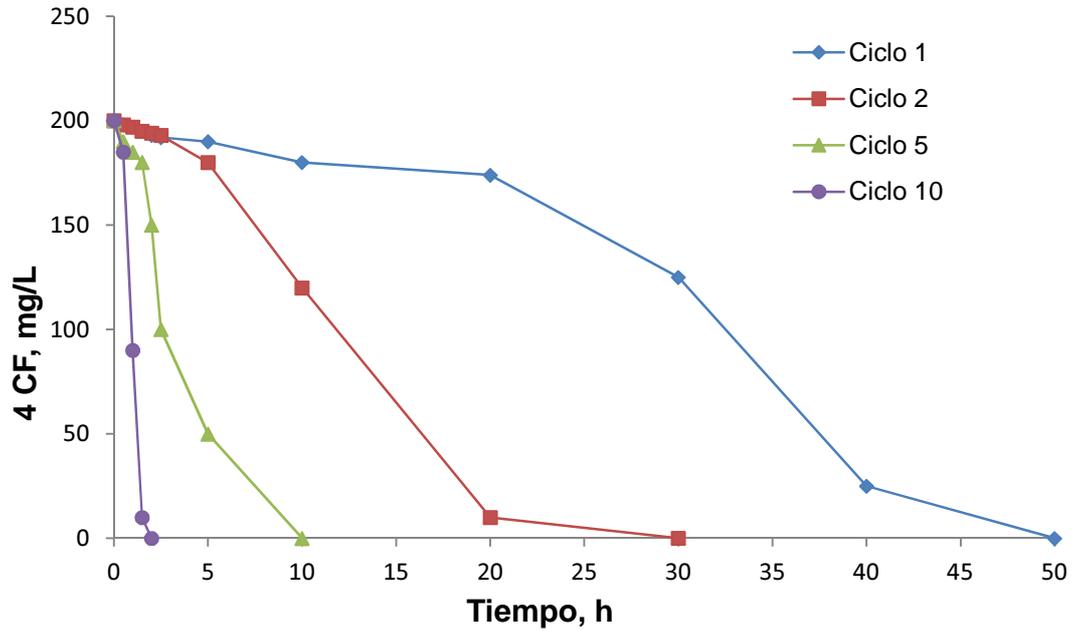


Figura 4. Cinética de degradación de 200 mg/L de 4CF a lo largo del proceso de aclimatación.

Una vez que la biomasa se aclimató a la degradación de 4CF, el tiempo de reacción se mantuvo estable hasta el final del experimento. La cinética que se observó en diferentes ciclos posteriores a la aclimatación era muy similar en todos casos (Figura 5).

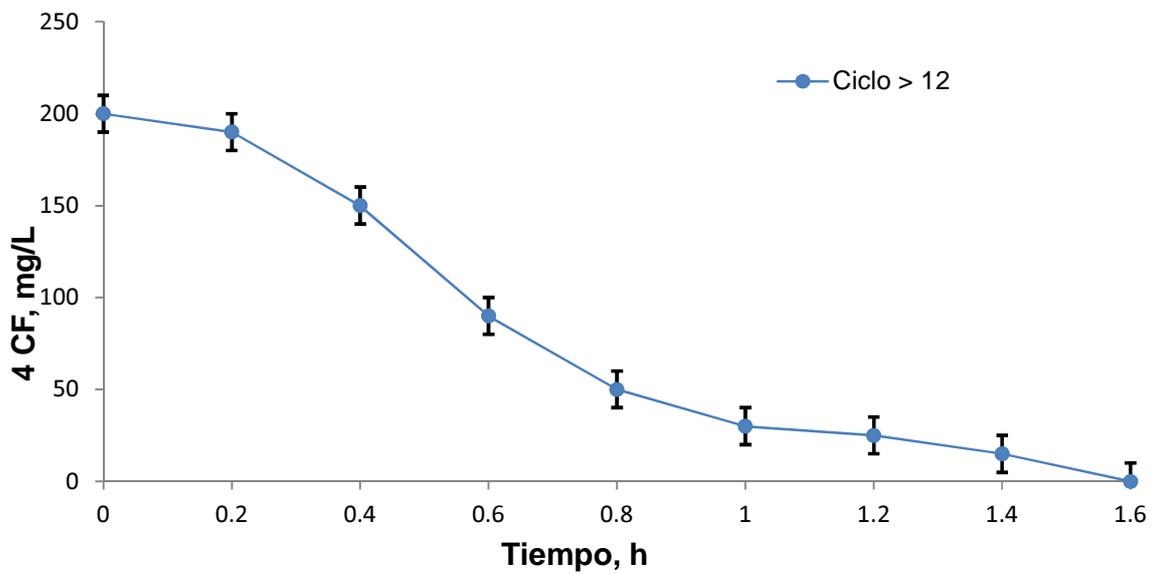


Figura 5. Cinética de degradación del 4CF a partir del ciclo 13.

### VI.3. Inducción de la granulación

Una vez que el consorcio microbiano se aclimató a la degradación de 4CF, se le sometió a una presión de selección con el fin de que se agregaran y formaran gránulos. Dicha presión se aplicó con un decremento gradual en el tiempo de la fase de sedimentación, la cual fue reducida de 30 minutos a 1 minuto.

Con la reducción del tiempo de sedimentación el IVL se redujo de 110 mL/g a 18 mL/g en los primeros 80 ciclos; por otra parte, los SSV disminuyeron de 7.7 g/L a 1.1 g/L entre los ciclos 1 y 35; posteriormente, aumentaron hasta 5.1 g/L en el ciclo 80 y se mantuvieron constantes hasta el final del proceso (Figura 6). A su vez, la VS aumentó de 2.4 m/h en el inóculo a 8.8 m/h al final del estudio (Figura 7).

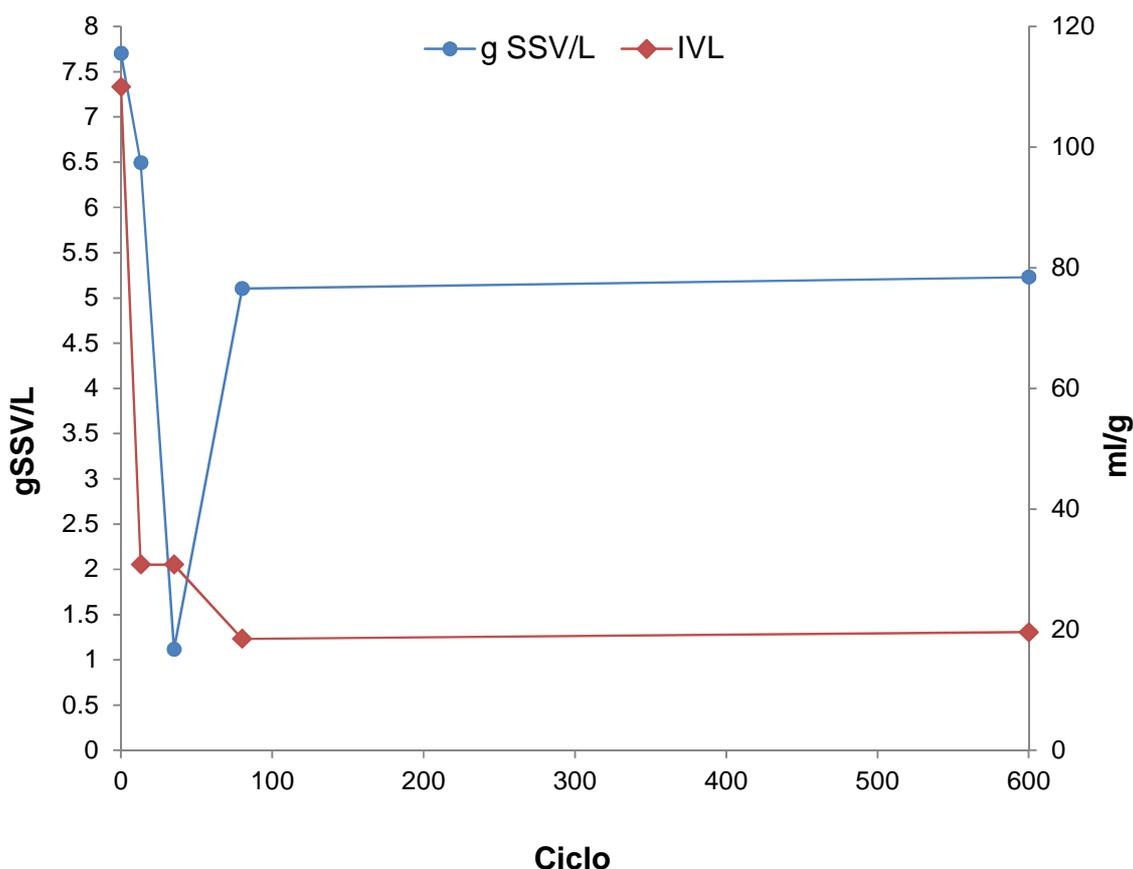


Figura 6. Cambios en el IVL y en los SSV a lo largo del proceso de granulación.

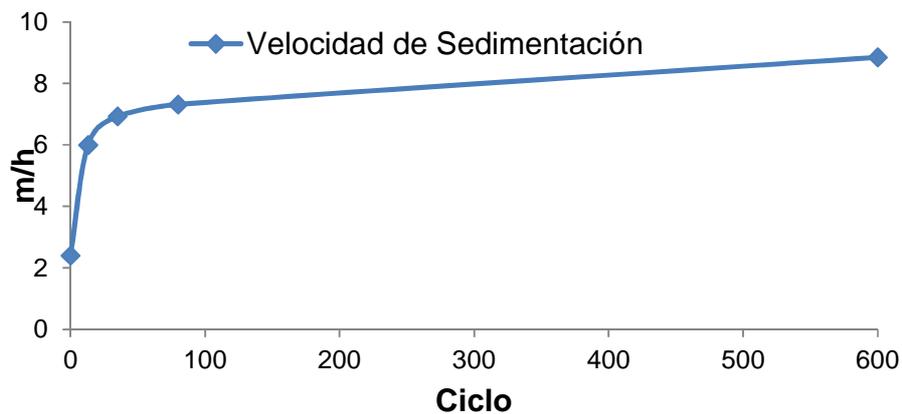


Figura 7. Cambios en la VS a lo largo del proceso de granulación.

#### VI.4 Operación del reactor en fase estacionaria

En el ciclo 308 (día 60) se observaron gránulos maduros, por lo que a partir del ciclo 309 se inició la operación del reactor en fase estacionaria, que duró 760 ciclos (128 días). El promedio de los parámetros evaluados durante esta fase se presentan en el Cuadro 7. Como se puede observar, la eficiencia de remoción fue mayor al 99%, la biomasa presentó excelentes características de sedimentabilidad y la concentración de sólidos suspendidos totales en el efluente se mantuvo alrededor de 24 mg/L. En la Figura 8 se puede observar la biomasa en forma de gránulos.

Cuadro 7. Parámetros de la operación del reactor SBR en fase estacionaria.

Parámetro	Valor
Alimentación 4CP	200 ± 13 mg/L
4CF <sub>efluente</sub>	0.1 ± 0.05 mg/L
Eficiencia de degradación	>99.9%
IVL	19.04 ± 0.55 mL/gSSV
VS	7.89 ± 0.96 m/h
SSV	5.17 ± 0.06 mg/L
SST <sub>efluente</sub>	24 ± 10 mg/L

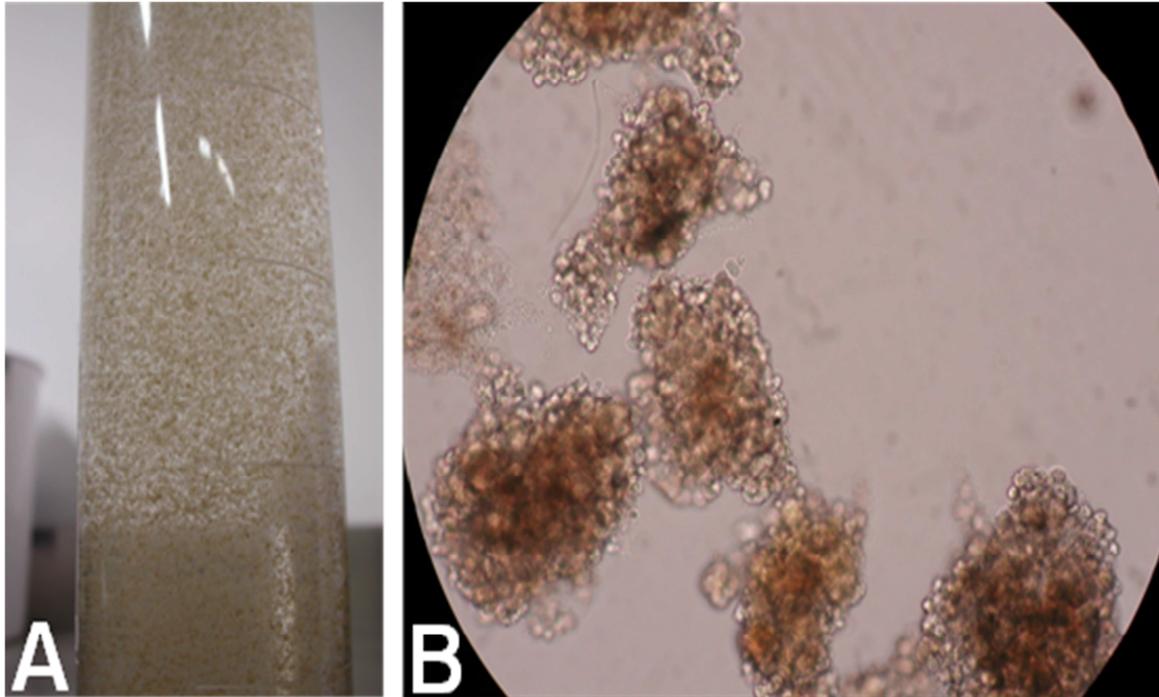


Figura 8. Gránulos aerobios obtenidos después de 308 ciclos de operación. A) Vista normal, B) En microscopio (10X).

#### VI.5 Análisis microbiológico del biorreactor.

Se tomaron muestras de 50 mL de los microorganismos del biorreactor en diferentes etapas del proceso de granulación. Una del inóculo (muestra A), otras dos durante el proceso de inducción de la granulación (muestras B y C) y otras dos durante la fase estacionaria una al inicio y otra al finalizar (muestras D y E respectivamente). Las muestras fueron centrifugadas y se desechó el sobrenadante para después ser congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### VI.6 Extracción de ADN

La extracción de DNA genómico total se realizó con el kit de extracción UltraClean Soil DNA Extraction Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se verificó la pureza del ADN obtenido mediante el índice  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis del ADN extraído de las muestras A, B,C, D y E.

Muestra	Ciclo	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	ng/μL	Tamaño (kb)
A	0	1.7	1.201	7375
B	140	1.7	2.141	7500
C	180	1.8	9.079	7500
D	308	1.7	3.257	7250
E	760	1.7	1.401	7375

Para cuantificar el ADN y para determinar su tamaño se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 9). La imagen fue analizada empleando el software de Molecular Imaging, los resultados se muestran en el Cuadro 8, el coeficiente de correlación para la cuantificación es de  $R^2=0.7$ .

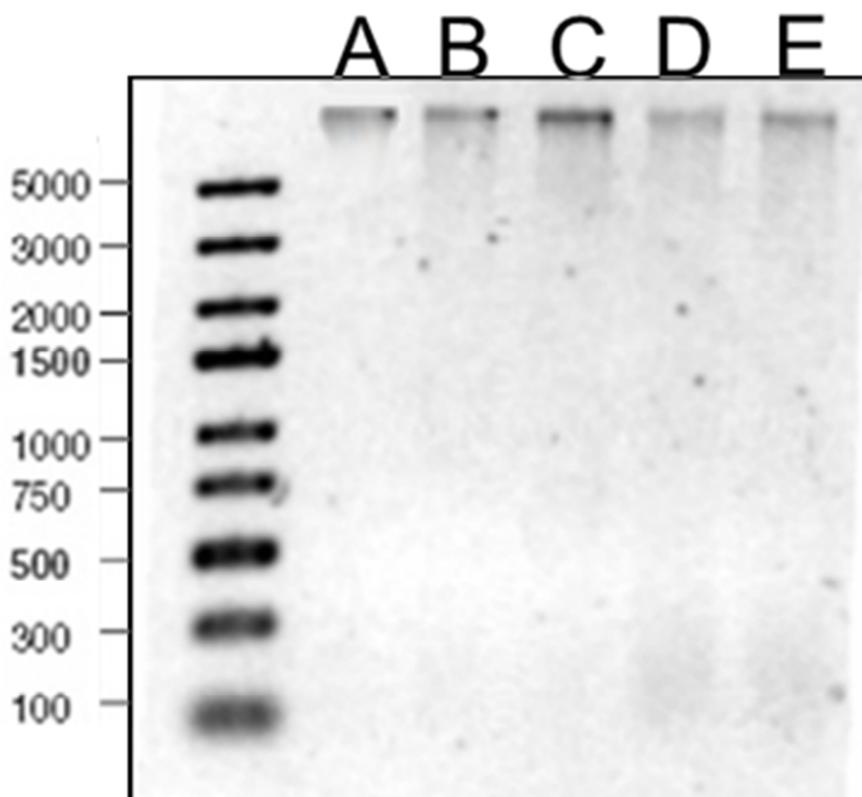


Figura 9. Electroforesis del ADN extraído de las muestras A, B,C, D y E. Gel de agarosa al 1%, 70mA durante 30 minutos.

## VI.7 Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de la región hipervariable V6-V8 del gen *rrs* se realizó empleando los iniciadores F968-GC y R1401. Se trabajó con un volumen total de reacción de 25  $\mu$ L, empleando 12.5 $\mu$ L de TopTaq Mastermix, 1 $\mu$ M de cada cebador, 3  $\mu$ L de  $\text{CaMg}_2$  25 mM y 50 ng de cada muestra de ADN, para concentrar las muestras se precipitó con etanol y  $\text{NaCl}$  2M y posteriormente se ajustó el volumen.

El programa del termociclador se resume en la Figura 10. Se inició con una activación a 94°C durante 5 min. Seguido de 10 ciclos de touchdown en los que se iniciaba con una desnaturalización a 94°C durante 5 min, para continuar con una hibridación a 61°C durante 30 seg. y la extensión de 1:30 min a 72°C, la temperatura de hibridación disminuía 0.5°C con cada ciclo hasta que alcanzó la temperatura teórica  $T_m$  de 56°C. Posteriormente se repetían 30 ciclos de amplificación con una fase de desnaturalización a 94°C por 5 min, de hibridación a 56°C por 30 seg y elongación a 72°C por 1:30 min. El programa concluía con una extensión final a 72°C durante 7 min.

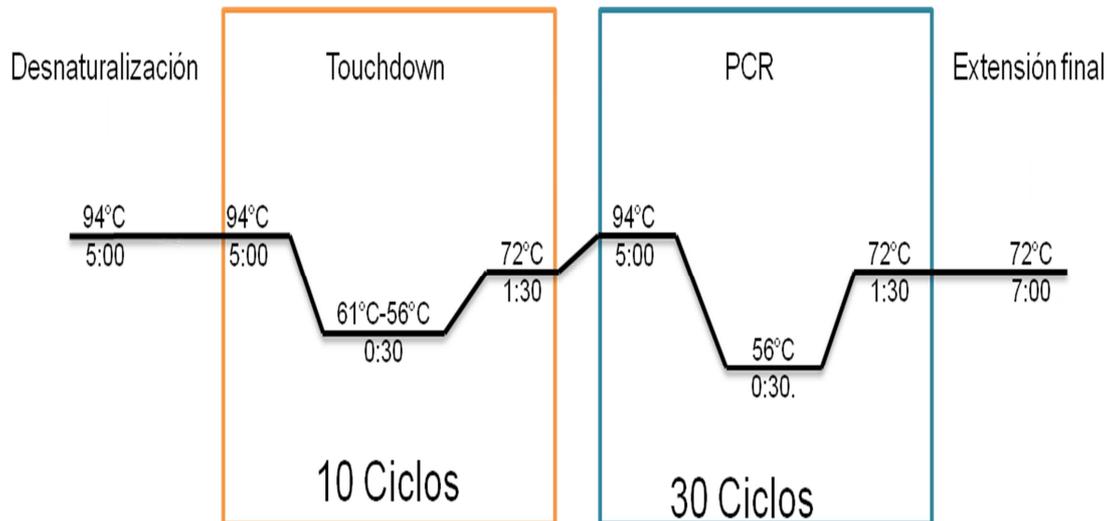


Figura 10. Programa empleado para la amplificación de las regiones V6-V8 del gen *rrs* mediante PCR.

El tamaño del amplicón producido por los cebadores F968 y R1401 es de 434 pb, pero al agregar la cola de GC su tamaño aumenta a 474 pb. El producto de amplificación fue verificado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 11). También se cuantificó la cantidad de ADN obtenido empleando el software de Molecular Imaging (Kodak). El coeficiente de correlación para la cuantificación es de  $R^2=0.7$ . Los resultados se muestran el Cuadro 9.

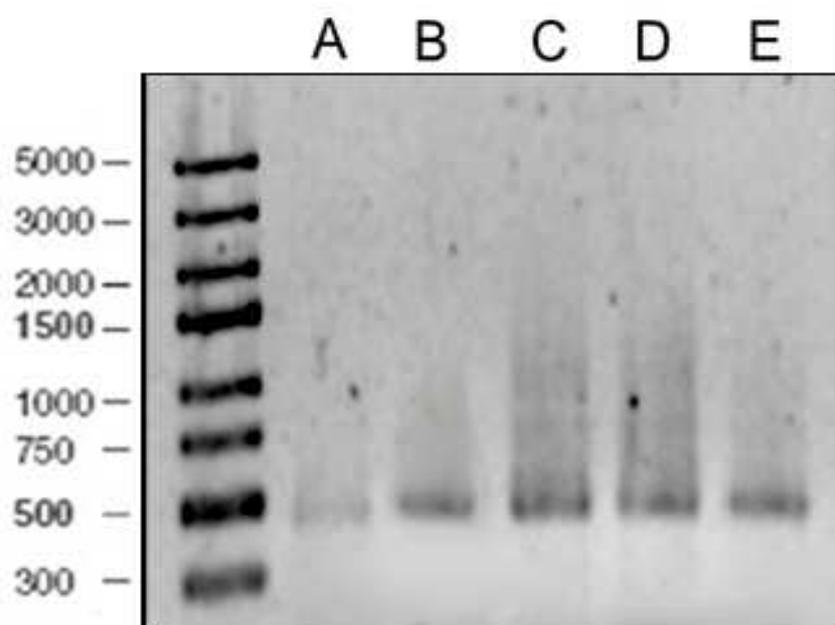


Figura 11. Productos de PCR de las regiones V6-V8 de las muestras. Gel de agarosa al 1%, 70mA durante 30 minutos.

Cuadro 9. Resultados de la amplificación por PCR de las regiones V6-V8 de las muestras A, B, C, D y E.

Muestra	Cantidad de DNA (ng/ $\mu$ L)	Tamaño del amplicón (pb)
A	25.4	488
B	24.8	488
C	37.2	453
D	34.6	457
E	36.1	476

## VI.8 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

Los productos de PCR fueron separados mediante DGGE (Figura 12). Se empleó Acrilamida- Bis Acrilamida 37.5:1 al 6%. El gradiente desnaturalizante empleado fue de 35% al 65%. Se cargaron 0.5 µg de ADN en cada carril y se empleó azul de bromofenol con glicerol como buffer de carga.

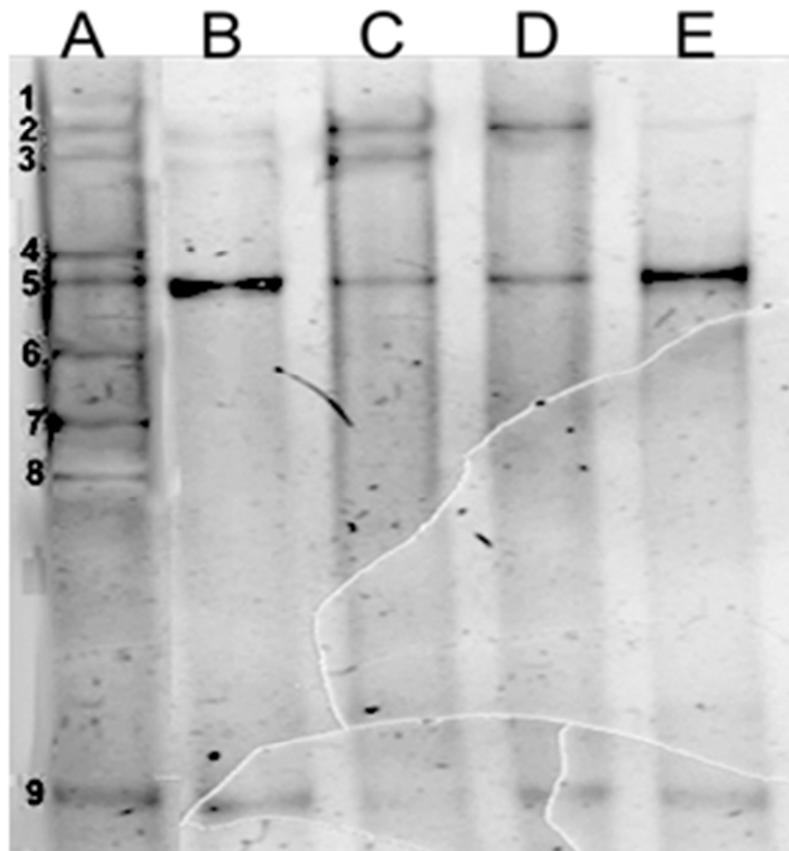


Figura 12. Patrón de bandas de los productos de PCR de las muestras A, B, C, D y E en un gel de acrilamida-bis al 6%. Gradiente de 35-65%, 6 h de corrida, 110 V a 70 °C.

Empleando el patrón de bandas del gel de la Figura 12, se realizó la matriz del Cuadro 10. En la matriz, el "1" significa presencia de una banda y el "0" es la ausencia de esa banda en determinado carril. Se considera la misma banda cuando esta aparece a la misma altura en otro carril, pero si la altura no es igual

se considera otra banda. Se analizaron todas las bandas que aparecieron en el gel, y se les asignó un número a cada banda, la primera banda que aparece en la muestra A se le asignó el número "1" y así sucesivamente hasta llegar a la última banda que es la "9".

Cuadro 10. Matriz de presencia y ausencia de bandas en cada muestra.

	A	B	C	D	E
1	1	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1
3	1	1	1	0	0
4	1	0	0	0	0
5	1	1	1	1	1
6	1	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0
9	1	1	1	1	1

Posteriormente se buscaron las bandas que tenían en común las diferentes muestras. Los resultados se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Bandas compartidas entre las diferentes muestras del reactor.

	B	C	D	E
A	4	4	3	3
B	---	4	3	3
C	---	---	3	3
D	---	---	---	3

Para calcular la similitud entre las poblaciones se empleó el Índice de Jaccard. Los resultados se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Índice de Jaccard entre las diferentes muestras.

	B	C	D	E
A	0.44	0.44	0.33	0.33
B	---	1	0.75	0.75
C	---	---	0.75	0.75
D	---	---	---	1

## VII. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la aclimatación al 4CF produce una reducción en el tiempo de degradación, ya que existe un aumento de afinidad del consorcio para biodegradar el sustrato tóxico (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). Como se puede observar en la Figura 4, el proceso de aclimatación que se llevó a cabo en este trabajo redujo significativamente el tiempos de degradación del compuesto inhibitorio de 47 horas a aproximadamente 2 h.

En la Figura 6 se observa una disminución significativa de SSV en el reactor desde el inicio del proceso hasta el ciclo 35. Esto se debe a que durante el proceso de la formación de los gránulos, se redujo el tiempo de sedimentación gradualmente, lo cual produce que las partículas que no han sedimentado sean eliminadas con el proceso de vaciado (Beun y col., 2002). No obstante, a partir de la formación de los primeros gránulos inmaduros, los SSV aumentaron continuamente hasta que se observaron los gránulos maduros. Después, los SSV permanecieron estables a lo largo de la operación a largo plazo. Cabe destacar que no obstante que se perdió una gran cantidad de biomasa, después de los primeros 3 ciclos de reducción del tiempo de sedimentación los SST en el efluente fueron menores a 35mg/L en todos los casos.

Un parámetro útil para cuantificar la sedimentabilidad y compactación de la biomasa en un reactor es el IVL. Un IVL menor de 80 mL/gSSV supone que la biomasa tiene una excelente sedimentabilidad mientras que un IVL mayor de 150 mL/gSSV se considera como lodos abultados y poco sedimentables (Ng y Hermanowicz, 2005). En este trabajo el IVL se redujo de 110 mL/gSSV en el inóculo a 18 mL/gSSV con la formación de los gránulos; lo cual implica excelentes condiciones de sedimentabilidad.

El principal problema que impide el desarrollo de la tecnología de gránulos aerobios es la pérdida de estabilidad de los gránulos durante largos periodos de operación en reactores SBR (Lee y col., 2010). En este estudio el reactor SBR fue operado durante 188 días (1068 ciclos), de los cuales 128 días (760 ciclos) fueron

en estado de fase estacionaria con parámetros de operación óptimos y sobresalientes, lo cual indica una buena estabilidad de los gránulos a lo largo de un proceso de operación a largo plazo.

El éxito de un análisis de biología depende en gran medida de que el ADN obtenido sea suficiente y de tenga la calidad adecuada (Kakirde y col, 2010). En este trabajo se empleó un kit comercial y se siguió el protocolo del fabricante de manera puntual, con el motivo de asegurar la repetitividad de los experimentos, lo cual significó un proceso lisis agresivo que incluía una incubación a 70°C con el fin de romper las paredes de las células más difícil de lisar. Esto pudo haber degradado parte del ADN de células que se lisan más fácilmente; lo cual explicaría la baja cantidad de ADN extraído (Figura 9), pero incrementaría la diversidad de organismos representados en cada muestra.

En estudios previos, se ha determinado que los consorcios microbianos granulares degradadores de fenoles se componen principalmente de  $\beta$  y  $\gamma$  Proteobacterias y bacterias Gram Positivas con alto contenido GC (Watanabe y col., 1998; Jiang y col., 2004; Cortés-Lorenzo y col., 2005). Por lo cual se emplearon los cebadores F968 y R1401 para la amplificación de las regiones hipervariables V6–V8 del gen 16S rRNA, dichos iniciadores son, teóricamente, específicos para las eubacterias (Huws y col., 2007) por lo que resultan adecuados para el estudio y aseguran un resultado representativo de la biodiversidad de la muestra.

En la Figura 12 se puede observar el patrón de bandas del DGGE para las muestras analizadas. De acuerdo a otros estudios, el número de bandas disminuye considerablemente al emplearse como sustrato a un compuesto altamente inhibitorio, lo cual implica una pérdida en la diversidad de la población (Tay y col., 2002; Chen y col., 2009; Ho y col., 2010).

El índice de Jaccard se emplea para comparar poblaciones en relación a diferencias ambientales, espaciales o temporales (Nam y col., 2011; Shrestha y col., 2011; Swenson, 2011). En este estudio, el Índice Jaccard (Cuadro 12) nos indica que la biodiversidad de la muestra disminuyó gradualmente a lo largo del

tiempo, desde el inicio del proceso hasta la obtención de gránulos maduros degradadores de 4CF. El primer cambio, que fue el más drástico, sucedió durante la aclimatación de la biomasa al 4CF, el Índice de Jaccard nos muestra que el inóculo sólo comparte el 0.44 de biodiversidad con la población aclimatada a la degradación de 4CF. A su vez, el proceso de granulación significó un cambio ligero, ya que se comparte el 0.75 de biodiversidad entre las muestras C y D. No obstante, si se compara la población final con la del inóculo, se observa una pérdida total del 66.6% de la biodiversidad original. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Li y col. (2008), en los cuales se evidenció que sólo pocas especies son importantes en la formación de gránulos aerobios y en el mantenimiento de su estructura.

Cabe destacar que entre las muestras D y E que corresponden al inicio y fin de la operación en fase estable no hubo cambios por lo cual se puede decir que la estabilidad no fue sólo operacional, sino también microbiológica.

## VIII. CONCLUSIONES

Se pueden obtener gránulos aerobios, capaces de degradar 4CF como única fuente de carbono y energía, en un reactor SBR a partir del inóculo de una planta de tratamiento de aguas municipales. La aclimatación al 4CF se llevó a cabo mediante el proceso de tiempos de reacción variables y eficiencias fijas. Y la selección de biomasa granulada se obtuvo mediante una reducción gradual en el tiempo de sedimentación.

El consorcio microbiano resulto ser altamente eficaz para degradar 200 mg/L de 4CF y alcanzó una remoción de más del 99% del compuesto toxico en menos de 2 horas.

La formación de gránulos aumentó de manera significativa la velocidad de sedimentación a la vez que disminuyó el IVL. Lo cual indica excelentes cualidades de sedimentación.

Los parámetros de operación permanecieron estables durante el periodo de operación a largo plazo (por más de 700 ciclos). Los resultados de biología molecular demuestran que en esta fase las poblaciones microbianas también permanecieron estables.

Se encontraron diferencias entre la población microbiana en el inóculo y la presente en los gránulos aerobios degradadores de 4CF. Los procesos de selección para la degradación de 4CF y la posterior granulación significaron una fuerte presión que incidió en el índice de biodiversidad de Jaccard. La biodiversidad compartida entre el inóculo y los gránulos maduros degradadores de 4CF es sólo de 0.33, según el Índice de Jaccard.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

**Aoyama**, H., Hojo, H., Takahashi, K.L., Shimizu, N., Araki, M., Harigae, M., Tanaka, N., Shirasaka, N., Kuwahara, M., Nakashima, N., Yamamoto, E., Saka, M., Teramoto, S.J., **2005**. A two-generation reproductive toxicity study of 2,4-dichlorophenol in rats. *Toxicology Science*. Vol. 30: 59–78.

**APHA**. **1992**. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. Washington.

**ATSDR**. **1999**. Toxicological Profile for Chlorophenols. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

**Bitton**, G. **2005**. Wastewater Microbiology. 3a Ed., John Wiley & sons, Hoboken, New Jersey: 211-291.

**Beun**, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. **2002**. Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research*. Vol. 36: 702-712.

**Buitrón**, G., Schoeb, M.-E., Moreno, J., **2003**. Automated Sequencing Batch Bioreactor under Extreme Peaks of 4-Chlorophenol. *Water Science and Technology*. Vol. 47: 175-181.

**Buitrón** G., Moreno-Andrade I., Linares-García J.A., Pérez J., Betancur M.J., Moreno J.A. **2007**. Evaluation of an optimal fill strategy to biodegrade inhibitory wastewater in an industrial-prototype discontinuous reactor. *Water Science and Technology*. Vol. 55: 47-54.

**Chaudhry**,G.R., Chapalamadugu S. **1991**. Biodegradation of Halogenated Organic Compounds. *Microbiological Reviews*. Vol. 55: 59-79.

**Chen**, Y.C., Chen, D., Peng, L. C., Fu, S. Y., Zhan, H. Y. **2009**. The microorganism community of pentachlorophenol (PCP)-degrading coupled granules. *Water Science and Technology*. Vol. 59: 987-994.

**CONAGUA**. **2009**. Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento Edición 2009.

**CONAGUA**. **2010**. Estadísticas del Agua en México Edición 2010.

**Cortés-Lorenzo**, C., Molina-Muñoz, M.L., Gómez-Villalba, B., Vilchez, R., Ramos, A., Rodelas, B., Hontoria E. y González-López, J. **2006**. Analysis of community

composition of biofilms in a submerged filter system for the removal of ammonia and phenol from industrial wastewater. *Biochemical Society Transactions*. Vol. 34: 165-168.

**EPA. 2007.** Clean Water Act Appendix A to 40 CFR Part 423.

**Escher, B.I., Hunziker R.W., Schwarzenbach R.P. 2001.** Interaction of phenolic uncouplers in binary mixtures: concentration-additive and synergistic effects. *Environmental Science and Technology*. Vol. 35:3905-3914.

**Etchebere C., Errazquin M.I., Dabert P., Moletta R., Mixí L. 2001.** Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*. Vol. 35: 259-267.

**Escalas, A., 2006.** Tecnologías y usos de las aguas residuales en México Congreso en Tecnologías sostenibles para el tratamiento de aguas y su impacto en los sistemas acuáticos. Concepción, Chile. 5,6:1-15.

**Etterer, T.J., 2006.** Formation, Structure and Function of Aerobic Granular Sludge. München. Technischen Universität München. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Naturales.105-106.

**Flora, J.R.V., Suidan, M.T., Wuellner, A.M., Boyer, T.K., 1994.** Anaerobic Treatment of a simulated high-strength industrial wastewater containing chlorophenols. *Water Environment Research*. Vol. 66: 21-31.

**Hardell, L., Eriksson, M., Lenner, P., Lundgren, E. 1981.** Malignant Lymphoma and Exposure to Chemicals, Especially Organic Solvents, Chlorophenols and Phenoxy Acids: A Case-Control Study. *British Journal of Cancer*. Vol. 43: 169-176.

**Ho, K. L., Chen, Y. Y., Lin, B., Lee, D. J. 2010.** Degrading high-strength phenol using aerobic granular sludge. *Applied Microbiology Biotechnology*. Vol. 85: 2009-2015.

**Huws, S. A., Edwards J. E., Kim, E. J., Scollan, N. D. 2007** Specificity and sensitivity of eubacterial primers utilized for molecular profiling of bacteria within complex microbial ecosystems. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 70: 565-569.

**INEGI.2010** Estadísticas a propósito del Día Mundial del Agua. Datos Nacionales.

**Jiang, H.-L., Tay, J.-H., Maszenan, A.M., Tay, S.T.-L. 2004.** Bacterial Diversity and Function of Aerobic Granules Engineered in a Sequencing Batch Reactor for Phenol Degradation. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 70: 6767-6775.

**Kakirde, K. S., Parsley, L. C., Liles, M. R. 2010.** Size does matter: Application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 42: 1911-1923.

**Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. 1985.** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Science*. Vol. 82: 6955-6959.

**Lampi, P., Vohlonen, I., Tuomisto, J., Heinonen, O.P. 2000.** Increase of specific symptoms after long-term use of chlorophenol polluted drinking water in a community. *European Journal of Epidemiology*. Vol.16: 245-251.

**Lee, D. J., Chen, Y. Y., Show, K. Y., Whiteley, C. G., Tay, J. H. 2010.** Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation. *Advances in Biotechnology*. Vol. 28: 919-934.

**Li, A. J., Yang, S. F., Li, X. Y., Gu, J. D. 2008.** Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. *Water Research*. Vol. 42: 3552-3560.

**Li, A.J., Li, X.Y. 2008.** Selective sludge discharge as the determining factor in SBR aerobic granulation: Numerical modeling and experimental verification. *Water Research*. Vol. 43: 3387-3396.

**Liu, Y., Wang, Z.-W., Qin, L., Liu, Y.-Q., Tay J.-H. 2005.** Selection pressure-driven aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 67: 26-32.

**Lozupone, C. A., Knight, R. 2008.** Species divergence and the measurement of microbial diversity. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*. Vol. 32: 557-578.

**Madsen, T., Aamand, J. 1992.** Anaerobic transformation and toxicity of trichlorophenols in a stable enrichment culture. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 58:57-561.

**Massol-Deyá, A., Weller, R., Ríos-Hernández, L., Hickey, R.F., Tiedje, J.M. 1997.** Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating benzene, toluene and p-xylene contaminated groundwater. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 63: 270-276.

**Metcalf y Eddy. 2003.** Wastewater engineering treatment and reuse. 4 ed. McGraw Hill, Nueva York: 545-644.

**McSwaine, B.S., Irvine, R.L., Wilderer, P.A. 2004.** The influence of settling time on the formation of aerobic granules. *Water Science and Technology*. 50:195–202.

**Moreno-Andrade, I., Buitrón G. 2004.** Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology*. Vol. 50:251-258.

**Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993.** Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 59: 695-700.

**Nam, Y-D., Jung, M-J, Roh, S. W., Kim, M-S., Bae, J-W., Comparative Analysis of Korean Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. 2011.** *PlosOne* Vol. 6: 1-15.

**Ng, H.Y., Hermanowicz, S.W., 2005.** Membrane bioreactor operation at short solids retention times: performance and biomass characteristics. *Water Research*. Vol. 39: 981– 992.

**Nicell, J.A., Bewtra, J.K., Biswas, N., Taylor, E. 1993** Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. *Water Research*. Vol. 27:1627-1639.

**Nor-Anuar A., Ujang Z., van Loosdrecht, M.C.M, de Kreuk, M.K. 2006.** Aerobic Granular Sludge Technology for Wastewater Treatment - An Overview. *Asiawater* 2006. Kuala Lumpur, Malasya 21,3:1-7.

**Nor-Anuar A., Ujang Z., van Loosdrecht, M.C.M, de Kreuk, M.K. 2007.** Settling behavior of aerobic granular sludge. *Water Science and Technology*. Vol. 56: 55-63.

**Pritchard**, P.H., O'Neill E.J., Spain C.M., Ahern D.J. **1987**. Physical and biological parameters that determine the fate of p-chlorophenol in laboratory test systems. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 53:1833-1838.

**Sambrook**, J., Russel, D. W. **2001**, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition, Ney York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Schloss**, D., Handelsman, J. **2006**. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 72:6773–6779.

**Shrestha**, P., Szaro, T. M., Bruns, T. D., y Taylor, J. W., Systematic Search for Cultivable Fungi That Best Deconstruct Cell Walls of Miscanthus and Sugarcane in the Field. **2011**. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 77: 5490–5504.

**Su**, K.-Z., Yu, H.-Q. **2005**. Formation and characterization of aerobic granules in a sequencing batch reactor treating soybean-processing wastewater. *Environmental Science and Technology*. Vol. 39: 2818-2827.

**Swenson** N. G.. Phylogenetic Beta Diversity Metrics, Trait Evolution and Inferring the Functional Beta Diversity of Communities. **2011**. *PLoS ONE*. Vol. 6: 1-9

**Tay**, J. H., Ivanov, V., Pan, S., Tay, S. T. L. **2002**. Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Letters on Applied Microbiology*. Vol. 34: 254–257.

**UN**. **2003**, *Waste-Water Treatment Technologies: A General Review*.

**UNESCO**. **2009**. *Water in a Changing World. The United Nations World Water Development Report 3*.

**van den Berg**, K.J. **1990**. Interaction of chlorinated phenols with thyroxine binding sites of human transthyretin, albumin and thyroid binding globulin. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 76:63-75.

**Watanabe**, K., Terramoto, M., Futumata, H., Harayama, S. **1998**. Molecular Detection, Isolation, and Physiological Characterization of Functionally Dominant Phenol-Degrading Bacteria in Activated Sludge. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 64: 4396-4402.

**Watanabe**, K., Terramoto, M., Harayama, S. **1999**. An Outbreak of Non-flocculating Catabolic Populations Caused the Breakdown of a Phenol-digesting

Activated-Sludge Process. Applied Environmental Microbiology. Vol. 65: 2813-2819.

**WHO. 1989.** Chlorophenols (Environmental Health Criteria for Chlorophenols Other than Pentachlorophenol).

**Wilderer, P.A., McSwaine, B.S., 2001.** Sequencing batch reactor Technology. Scientific and Technical Report No 10. IWA Publishing, London, pp. 76.

## X. ANEXOS

### X.1. Curva de concentración de Mg<sup>++</sup> para la PCR

Con el fin de optimizar los resultados de la amplificación se realizó una curva con diferentes concentraciones de ClMg<sub>2</sub> y de ADN. Como buffer de reacción se empleó al TopTaq Mastermix (Qiagen), el cual contiene una concentración de Mg<sup>++</sup> de 1.5 mM. Para aumentar la concentración se empleó ClMg<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen). Las concentraciones finales de ADN y Mg<sup>++</sup> se muestran en el Cuadro 13. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Cuadro 13. Concentraciones finales de ADN y Mg<sup>++</sup> empleadas en la curva de optimización de la PC.

Carril	ng ADN	Mg <sup>++</sup> mM
2	50	1.5
3	50	1.7
4	50	2.0
5	100	1.5
6	100	1.7
7	100	2.0
8	200	0

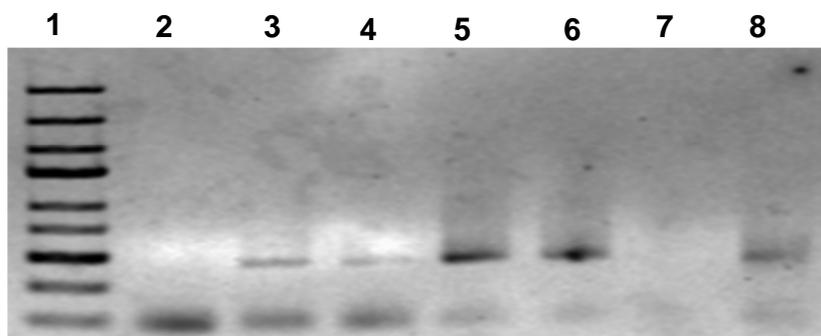


Figura 13. Electroforesis de los productos de PCR amplificados con diferentes concentraciones de Mg<sup>++</sup> y ADN, de acuerdo al Cuadro 13. Gel de agarosa al 1%, 70mA durante 30 min.

Es sabido que los iones de  $Mg^{++}$  juegan un papel importante en la PCR al aumentar la estabilidad de los híbridos cebador-molde reduciendo las fuerzas electrostáticas de repulsión entre ellos, pero un exceso de iones promueve dímeros entre los cebadores y disminuye la especificidad de los mismos (Moreau y col, 2009). Por lo que se deben encontrar las condiciones adecuadas para la PCR.

En este estudio se encontró que la concentración óptima era de 1.7 mM de  $Mg^{++}$  y 50 ng de ADN como molde como se muestra en la Fig. 13. Estas concentraciones corresponden al carril 3. Se eligió esta concentración ya que, a pesar de que en los carriles en los que se emplearon 100ng de molde dieron mayor rendimiento, también fueron en los que se hubo una menor especificidad en la replicación, esto se comprueba con el barrido antes de la banda.

### **Bibliografía**

**Moreau V.**, Voirin E., Paris C., Kotera M., Nothisen M., Rémy J-S., Behr J-P., Erbacher P., y Lenne-Samuel N. Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR and reverse transcription. **2009**. Nucleic Acids Research. Vol. 37: 1-14.

**X.2. Artículo presentado en el congreso 2nd IWA Mexico Young Water Professional Conference 2010 Santiago de Querétaro, Qro. MEXICO. April 12-14, 2010**

## **Start-up and long-term operation of an aerobic granular discontinuous bioreactor degrading a toxic compound**

Tonatiuh Moreno and Iván Moreno-Andrade

Laboratory for Research on Advanced Processes for Water Treatment, Instituto de Ingeniería, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, 76230, Mexico.  
(E-mail: [imorenoa@ii.unam.mx](mailto:imorenoa@ii.unam.mx))

**Abstract** Sequencing Batch Reactors (SBR) it is a technology applied recently to degrade industrial effluents with high efficiency. The aerobic granulation has been reported in SBR and can be used in order to increase the settleability of mixed liquor. The objective of this research was to start-up an aerobic granular discontinuous bioreactor in order to obtain granules formation during the 4-chlorophenol degradation. 4CP was degraded with efficiencies higher than 99%. It was observed the aerobic granules formation. The settling velocity was 6.8 m/h, the sludge volumetric index was 25 mL/gSSV. As the biomass settle in an excellent form, the total suspended solids concentration in the effluent was 24 mg/L.

**Keywords:** acclimation, aerobic granulation, degradation, sequencing batch reactor.

### **INTRODUCTION**

Discontinuous bioreactors are a technology with high efficiencies during the industrial wastewater containing inhibitory compounds (Buitrón *et al.*, 2007). This kind of bioreactors is called Sequencing batch reactor (SBR). SBR processes are characterized for the cyclically operation, i.e., under five well-defined phases: fill, react, settle, draw, and idle. Most of the advantages of SBR processes may be attributed to their single-tank designs and the flexibility allowing them to meet many different treatment objectives, which derives from the possibility of adjusting the duration of the different phases.

Aerobic granules are compact and dense microbial aggregates formed via the self-immobilization of different microorganisms. In the past years, the aerobic sludge granulation has been reported during the treatment of treating the wastewater containing organics, nitrogen, and phosphorus in bioreactors (de Kreuk *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006). The main advantages of aerobic granular sludge are the regular, dense and strong microbial structure, good settleability, high biomass retention and ability to withstand a high organic loading rate compared with conventional activated sludge process (Tay *et al.*, 2001).

Most of the aerobic granules have been cultivated on non-inhibitory substrates such as glucose, acetate, and alcohol, and the ability of aerobic granules for high-rate degradation of toxic pollutants has been poorly understood (Zhu *et al.*, 2008), except some recent reports where aerobic granules were reported during the degradation of phenol, tert-butyl alcohol and *p*-nitro-phenol (Tay *et al.*, 2004, 2005; Yi *et al.*, 2006; Moreno-Andrade and Buitrón, 2009).

In order to form aerobic compact granules it is necessary the fast conversion of biodegradable substrate in intracellular storage substances obtained in SBR applying short fill time (de Kreuk and van Loosdrecht, 2004). Other factors that induce the aerobic granulation are the dissolved oxygen concentration, the reactor configuration and the settling time.

The objective of this research was to start-up an aerobic granular discontinuous bioreactor in order to obtain granules formation during the 4-chlorophenol degradation. The long-term operation of the bioreactor was also tested.

## MATERIALS AND METHODS

An aerobic automated SBR system with a capacity of 7L and an exchange volume of 57% was used (Figure 1). The airflow rate was 2 L/min and the temperature was maintained at 20 °C inside the reactor. The reactor was inoculated with flocculent microorganisms coming from a municipal activated sludge treatment plant (2000 mgVSS/L). A synthetic wastewater containing 200 mg of 4-chlorophenol/L was used as a sole source of carbon and energy. Nutrients such as nitrogen, phosphorus, and oligo-elements were added.

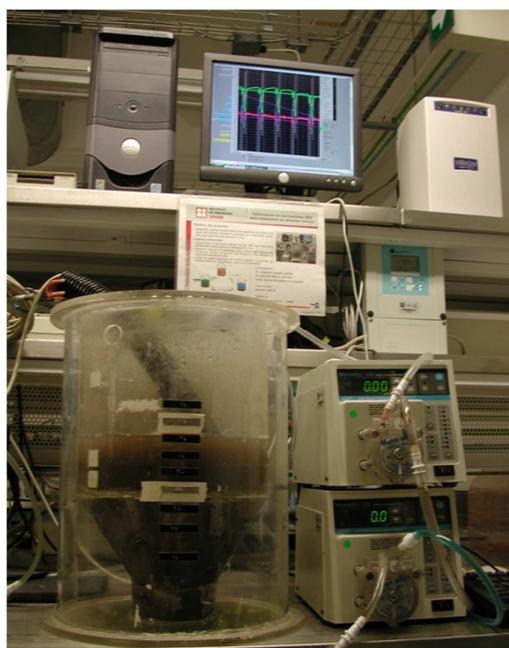


Figure 1: Automated SBR for 4-chlorophenol degradation

The bioreactor was long-term operated under the strategy present in table 1. During the acclimation (first 12 cycles, 7 days), the react phase was variable depending on the necessary time to reach 99% of removal efficiency of 4-chlorophenol, 4CP (i.e., cycle 1=50

h, cycle 2=30 h, cycle 3=22 h, cycle 4-5=15 h, cycle 7-12=6 h). Degradation time was followed using the dissolved oxygen (DO) concentration present in the reactor (Buitrón *et al.*, 2003).

Table 1. SBR operation strategy (from cycle 12 to cycle 970).

SBR phase	Time
Preaeration	15 min
Fill	5 min
React	4 h
Settling	1 min
Draw	4 min

Substrate concentration was measured taking samples and processing them offline using the colorimetric technique of 4-aminoantipyrine (APHA, 2005). Settling velocity (SV), sludge volumetric index (SVI), Total and volatile suspended solids (TSS and VSS) analyses were determined according to the Standard Methods (APHA, 2005). Dissolved organic carbon (DOC) was determined with a Shimadzu TOC-5050 and Chemical Oxygen Demand (COD) according to Standard Methods (APHA, 2005). Extracellular Polymeric Substances (EPS) analysis was done according to (Ng and Hermanowicz, 2005). : sludge sample was extracted from the reactor, centrifuged at 2000g at room temperature for 15 min and the supernatant decanted. The centrifuged biomass was resuspended back to 200 mL with a fresh phosphate buffer. The resuspended sludge sample was transferred to a closed container, 90 g/g VSS of a cation exchange resin, DOWEX 50 X 8 (Fluka Cat No 44445) was added and the mixture was stirred at 600 rpm for 2 hours in an ice water bath. The mixture was then centrifuged at 10,000 rpm for 30 min to remove the resin and the microorganisms. The supernatant was then analyzed for carbohydrates and proteins. Protein quantification was done according to Lowry technique (Lowry, 1951).

The biomass was acclimated using a variable cycle strategy, i.e., the reaction phase duration was variable and stopped when the removal of 4CP was equal or greater than 99%. After the acclimation, the settle time was reduced gradually from 30 min to 1 min. The granules formation was followed taking samples and manual observation in a microscope Eclipse (Nikon Instruments). The granular bioreactor operated in a steady state from during 128 days.

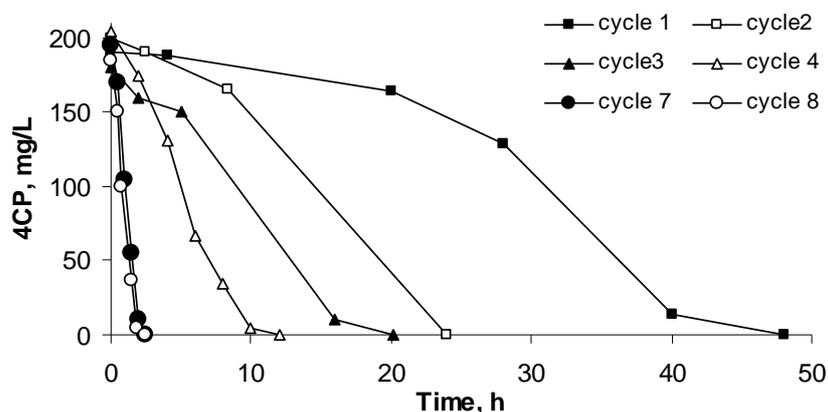
## RESULTS AND DISCUSSION

The bioreactor operated during 1068 cycles (188 days). The acclimation was reach in 12 cycles and granules formation was observed after 140 degradation cycles (32 days).

### Start-up experiments

The degradation kinetics for the acclimation process was followed. The acclimation was obtained in 10 degradation cycles. During the acclimation, 4CP was degraded with efficiencies higher than 99% as 4CP and 95% as DOC and COD. During the acclimation of the activated sludge, the relationship between residual 4CP concentration and incubation time gradually changed, and then stabilized. In figure 1 it is possible to observe that the degradation time was reduced from 48 h to 2 h, after eight degradation cycles.

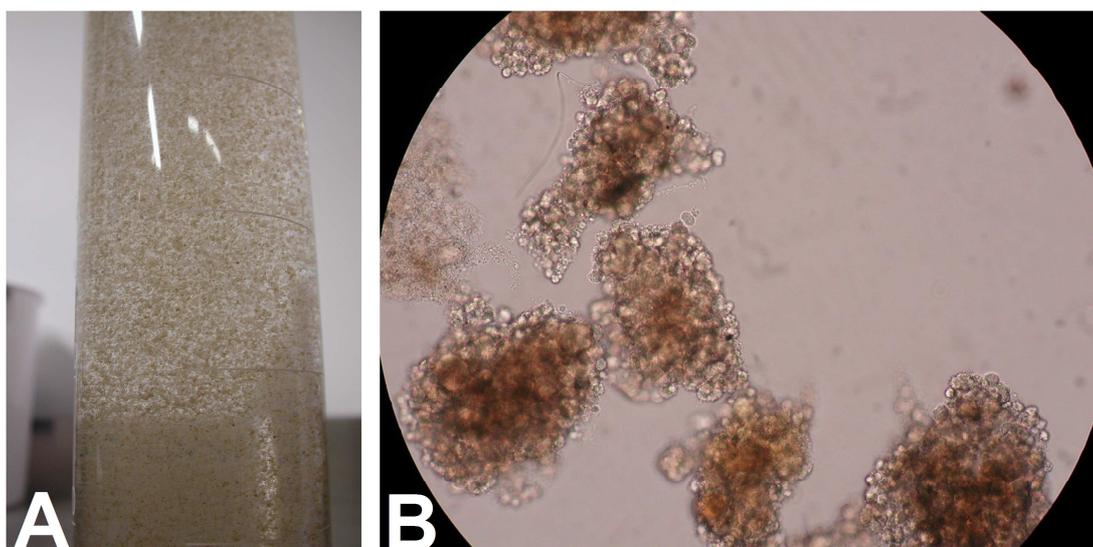
When the acclimation of microorganisms were obtained, the settling phase time was reduced gradually from 30 min to 1 min, increasing the selection pressure of microorganisms aggregated in granules, this increase the settling velocity from 0.4 m/h (inoculum source) to 2.8 m/h after acclimation.



**Figure 1.** Degradation kinetics during the acclimation process to 200 mg/L of 4CP

### Granules formation and long-term operation

After the operation of the SBR degrading 4CP in a stable form, it was observed the aerobic granules formation (Figure 2), this granules were well conformed after the cycle 308 (day 60). The granules in the reactor improved the settleability. In order to promote the biomass granulation, the settling phase was deducted from 30 to 1 min. It was observed a lost in the VSS during this changes, however, after three degradation cycles, the effluent VSS were stables in quantities lower than 35 mg/L in all cases. Sludge settleability and compaction are usually quantified using sludge volume index (SVI) measurement. In general, sludge having a SVI smaller than 80 mL/g is considered as having excellent settling and compaction characteristics, while a SVI greater than 150 mL/g is considered as poor settling and bulking sludge (Ng, 2005). In our study, the SVI was reduced from 110 mL/g (inoculum) to 25 mL/g due to the granules formation, i.e., excellent settling characteristic in sludge was observed.



**Figure 2.** Photography of the aerobic granules A) Normal view and, B) in a microscope (10x) during the 4CP degradation

When the biomass was associated in granules, the reactor was operated in a steady-state form for 760 cycles (128 days). Table 2 showed values for the parameters evaluated during steady state operation; it is presented the SVI, SV, TSS and VSS, and the removal efficiency of the process. It is possible to observe that during this period, 4CP was degraded with efficiencies higher than 99.9%. The settling velocity was 6.8 m/h; the sludge volumetric index was 25 mL/gSSV. As the biomass settle in an excellent form, the total suspended solids concentration in the effluent was 24 mg/L.

**Table 2.** Parameters during the long-term operation of the SBR

Parameters	Values
4CP influent	133 ± 61 mg/L
4CP effluent	0.1 ± 0.05 mg/L
Degradation efficiency	>99.9%
SVI	24.5 ± 7 mL/g
SV	6.3 ± 1.2 m/h
VSS	5.1 ± 1.4 mg/L
TSS <sub>effluent</sub>	24 ± 10 mg/L

It has been reported that during the biological treatment of 4CP, inhibition, loss of viability, and cells lyses occur (Moreno-Andrade *et al.*, 2006); for this reason carbohydrates and proteins may remain suspended in the reactor. The analysis of EPS showed that the protein and total carbohydrates concentration in mixed liquor was 19.5±3 µg/mL and 34±8 µg/mL respectively. In previously research it has been reported a protein content of 30.2 ± 7.9 µg/mL in mixed liquor in a non granular SBR treating 4CP at the same condition (Moreno-Andrade and Buitrón, 2009a). In this sense, the double quantity of proteins was obtained when compared with granular sludge.

The analysis of the microbial community present in the granular sludge was performed. In this case, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was applied for determine differences in the microbial composition of the granules degrading 4-chlorophenol. The results showed a moderate diversity in the community, obtaining changes in dynamic population due to the acclimation to 4CP. This results agree with Jiang *et al.*, (2004), they made culture isolation and DGGE assays in a community forming aerobic granules in presence of phenol, confirming the dominance of  $\beta$ -Proteobacteria and high-GC gram-positive bacteria in the phenol-degrading aerobic granules.

## CONCLUSIONS

Aerobic granules were observed in a SBR degrading 4-chlorophenol as a sole source of carbon and energy. It was observed an improvement of the settleability of the biomass due to the granulation of the biomass. The biomass was acclimated to degrade 200 mg/L of 4CP. A stable long-term operation was observed operating with a settle phase of 1 min. The settling velocity was 2.8 m/h, the sludge volumetric index was 70 mL/gSSV

## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by CONACYT through the project 103720. Jaime Perez Trevilla is acknowledged for his technical assistance. Thank to Darling Avigail Lopez for its work in some experiments.

## REFERENCES

- APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21<sup>th</sup> ed., American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Port city press. Baltimore, Maryland.
- Buitrón G., Moreno-Andrade I., Linares-García J.A., Pérez J., Betancur M.J., Moreno J.A. (2007). Evaluation of an optimal fill strategy to biodegrade inhibitory wastewater in an industrial-prototype discontinuous reactor. *Water Science and Technology*. 55 (7), 47-54.
- de Kreuk M.K., van Loosdrecht M.C.M. (2004). Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Sci. Technol.* 49 (11-12), 9-17. 9.
- de Kreuk M.K., Picioreanu C., Hosseini M., Xavier J.B., van Loosdrecht M.C.M. (2007). Kinetic model of a granular sludge SBR: influences on nutrient removal. *Biotechnol Bioeng.* 97(4), 801–815.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Jiang H-L, Tay J-H, Maszenan A, Tay S. (2004). Bacterial Diversity and Function of Aerobic Granules Engineered in a Sequencing Batch Reactor for Phenol Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 6767–6775.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2009). Aerobic granulation during the 4-chlorophenol degradation in a sequencing batch reactor. *Proc. Water & Industry 2009 International Conference. IWA Chemical Industries Specialist Group.* 30/11-2/12/2009. Palmerston North, New Zealand.

- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2009a). Performance and effluent characteristics between a conventional discontinuous and a membrane discontinuous reactor. *Proc. 5th IWA Specialized Membrane Technology Conference for Water and Wastewater Treatment*. 1-3/09/2009. Beijing, China.
- Ng, H.Y., Hermanowicz, S.W., 2005. Membrane bioreactor operation at short solids retention times: performance and biomass characteristics. *Water Res.* 39, 981– 992.
- Tay J.-H., · Q.-S. Liu and Y. Liu. (2001). The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57, 227–233.
- Tay J.H., Jiang H.L., Tay S.T.L. (2004). High-rate biodegradation of phenol by aerobically grown microbial granules. *J Environ Eng.* 130(12), 1415–1423.
- Tay S.L., Zhuang W.Q., Tay J.H. (2005). Start-up, microbial community analysis and formation of aerobic granules in a tert-butyl alcohol degrading sequencing batch reactor. *Environ Sci Technol.* 39, 5774–5780.
- Wang Zhi-Wu, Li Yong, Zhou Jia-Qi, Liu Yu. (2006). The influence of short-term starvation on aerobic granules. *Process Biochemistry.* 41, 2373–2378.
- Yi S., Zhuang W.Q., Wu B., Tay S.T.L., Tay J.H. (2006). Biodegradation of p-nitrophenol by aerobic granules in a sequencing batch reactor. *Environ Sci Technol.* 40, 2396–2401.
- Zhu L., Xu X., Luo W., Tian Z., Lin H., Zhang N. (2008). A comparative study on the formation and characterization of aerobic 4-chloroaniline-degrading granules in SBR and SABR. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79, 867–874.

### X.3. Trabajo presentado en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

#### BIODEGRADACIÓN DE 4-CLOROFENOL POR MEDIO DE UN REACTOR DISCONTINUO SECUENCIAL CON GRÁNULOS AEROBIOS

Tonatiuh Moreno Perlín, Iván Moreno Andrade

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, Unidad Académica Juriquilla-Querétaro, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro, 76230, México. E-mail: imorenoa@ii.unam.mx

*Palabras clave:* SBR, gránulos aerobios, 4-clorofenol.

**Introducción.** Las aguas residuales industriales presentan compuestos que ocasionan daños severos al ambiente y al hombre; por ejemplo, los clorofenoles que son desechos comunes de la industria maderera y del carbón. El tratamiento tradicional de aguas residuales es poco eficiente para degradar compuestos fenólicos (1). Se ha demostrado que los reactores discontinuos secuenciales son capaces de biodegradar clorofenoles (2). Recientemente se han empleado microorganismos asociados en forma de gránulos aerobios, los cuales son agregados de biomasa que se encuentran autoinmovilizados, presentan resistencia a los compuestos inhibitorios y una alta actividad metabólica además de que poseen excelentes capacidades de sedimentación. El objetivo de este trabajo fue el de evaluar la formación de gránulos aerobios en un biorreactor discontinuo secuencial durante la degradación de 4-clorofenol (4CF).

**Metodología.** El arranque del biorreactor se llevó a cabo con un inóculo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. La aclimatación de los microorganismos se realizó mediante la estrategia de tiempos de reacción variables y eficiencias fijas (3). Como sustrato se empleó agua sintética con 100 mg4CF/L como única fuente de carbono y energía. Se evaluaron los fenoles totales, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), índice volumétrico de lodos (IVL) y velocidad de sedimentación mediante muestreos periódicos de acuerdo a Standard Methods (4). Se ajustaron los parámetros de operación con el fin de obtener la granulación de la biomasa degradadora de compuestos fenólicos. Se analizaron muestras del biorreactor mediante técnica PCR-DGGE para evaluar los cambios microbiológicos durante la granulación.

**Resultados.** El tiempo de degradación de 200 mg/L de 4CF disminuyó de 50h a 2.8h a lo largo de la aclimatación (Fig. 1). A su vez, el proceso de inducción de la granulación promovió una disminución del IVL de 110 mL/gSSV en el inóculo a 12 mL/gSSV (Fig 2). La velocidad de sedimentación aumentó de 6.3 m/h a 8.8 m/h.

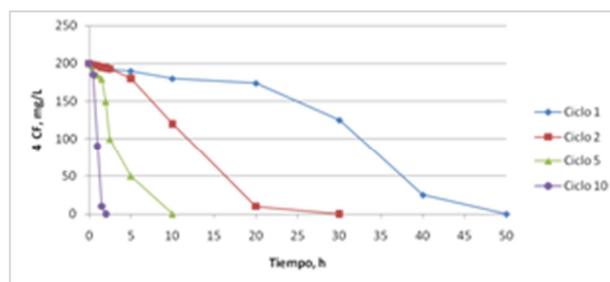


Fig. 1. Cinética de la degradación de 200 mg/L de 4CF durante el proceso de aclimatación.

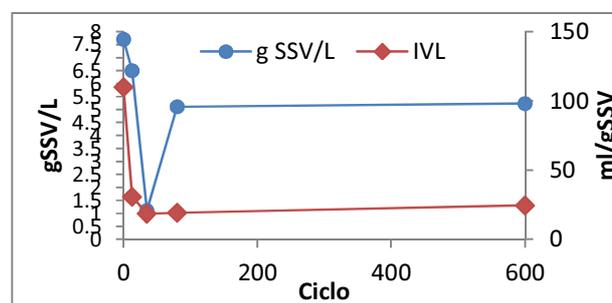


Fig. 2. Variación en los SSV y en el IVL durante la granulación.

**Conclusiones.** Se obtuvieron gránulos aerobios en un reactor discontinuo secuencial degradador de 4CF como única fuente de carbono y energía. Los gránulos aumentaron la sedimentabilidad de la biomasa al aumentar la velocidad de sedimentación y disminuir el índice volumétrico de lodos.

**Agradecimientos.** Se agradece el apoyo financiero de CONACYT a través del proyecto 103720 y el apoyo técnico de Jaime Pérez y Gloria Moreno.

#### Bibliografía.

1. Watanabe, K., Terramoto, M., Harayama, S. (1999). Appl. Environ. Microbio. 65 (7): 2813-2819.
2. Buitrón G., Moreno-Andrade I., Linares-García J.A., Pérez J., Betancur M.J., Moreno J.A. (2007). Water Sci. Tech. 55 (7): 47-54.
3. Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2004). Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. Wat. Sci. Technol. 50 (10), 251-258.
4. APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21th ed., American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Port city press. Baltimore, Maryland.

