



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Determinación de los parámetros de efectividad en gránulos
aerobios por respirometría *in situ*”**

Tesis que presenta

Janeth Guadalupe García Hernández

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Frederic Thalasso Siret**

Ciudad de México, México

Octubre, 2020

Agradecimientos

Esta maestría fue llevada a cabo gracias a la beca numero 721618 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), en el Laboratorio de Bioprocesos Ambientales del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav, México.

Quiero agradecer al Dr. Frédéric Thalasso por su confianza, tiempo y paciencia para la realización de este proyecto. Así como a mis asesores Dr. Luis Bernardo Flores Cotera y Dr. Luc Dendooven por su guía durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

Por último, quiero dar gracias a los asistentes del laboratorio Victoria, Juan y Francisco por su apoyo técnico y disponibilidad. Asimismo, agradezco a mis compañeros de laboratorio por su tiempo y conocimientos compartidos.

Índice

Índice	II
Índice de Figuras.....	III
Índice de Tablas	IV
Nomenclatura.....	V
Resumen.....	VI
Abstract.....	VII
1 Introducción.....	1
1.1 Gránulos aerobios.....	2
1.2 Resistencia a la transferencia de masa	6
1.3 Respirimetría	8
1.4 Microrespirimetría.....	12
2 Justificación.....	14
3 Objetivos.....	15
4 Hipótesis.....	16
5 Materiales y métodos.....	17
5.1 Configuración y operación del reactor	17
5.2 Métodos analíticos	19
5.3 Análisis de imagen	19
5.4 Biomasa disgregada	20
5.5 Microbioreactores	21
5.6 Experimento respirométrico.....	21
5.7 Determinación del coeficiente de transferencia de masa (K_{La})	23
5.8 Interpretación de datos	24
6 Resultados y discusión	26
6.1 Operación del reactor	26
6.2 Gránulos aerobios.....	29
6.3 Respirimetría	31
6.4 Factor de efectividad.....	41
7 Conclusiones.....	43
8 Bibliografía.....	45

Índice de Figuras

Figura 1.1 Mecanismo de formación de gránulos aerobios (tomado de Sarma <i>et al.</i> , 2017)	4
Figura 1.2 Pasos de un ciclo de un SBR	5
Figura 1.3 Transferencia de masa a través de un gránulo.....	6
Figura 1.4 Respirograma típico de una respirometría dinámica de pulsos	10
Figura 5.1 Diagrama SBR.....	17
Figura 5.2 Caracterización del diámetro de Feret.....	20
Figura 5.3 Sistema de microbioreactores.....	21
Figura 5.4 Dispositivo de aireación	23
Figura 6.1: Concentración de la biomasa observada en el reactor y tiempo de sedimentación aplicado durante los 123 días de operación. El punto 1 indica el cambio en el tiempo de sedimentación a un minuto y el punto 2 indica la desaparición de los flóculos.....	26
Figura 6.2: Flóculos observados en el día 60 de operación	27
Figura 6.3: Comportamiento observado de la concentración de OD en el reactor SBR (día 110) durante dos ciclos consecutivos.....	29
Figura 6.4: Diámetro promedio de Feret de los gránulos durante la operación del SBR del día 67 al 123.....	30
Figura 6.5: Perfil de OUR_{ex} observado en el día 96; (A) con gránulos aerobios de 450 ± 61 μm ; (B) con biomasa disgregada, después de la inyección de pulsos de 2 a 45 $\text{mg}_{\text{DQO}}/\text{l}$	32
Figura 6.6 Ejemplo de linealización de Hanes-Woolf de los experimentos del día 117; (A) con gránulos aerobios de 596 ± 57 μm ; (B) con biomasa disgregada.....	34
Figura 6.7 Valores de $OUR_{ex,max}^*$ aparentes e intrínsecos obtenidos en la experimentación; (A) $OUR_{ex,max}^*$ en función del tiempo; (B) % $OUR_{ex,max}^*$ en función del diámetro promedio de Feret. Los datos marcados con * indican diferencia significativa entre los parámetros ($p < 0.05$).	37
Figura 6.8 Parámetros cinéticos aparentes e intrínsecos obtenidos en la experimentación. (A) μ_{max} ; (B) K_s ; (C) $Y_{X/S}$. Los datos marcados con * indican diferencia significativa entre los parámetros ($p < 0.05$).....	40
Figura 6.9 Valores de η encontrados a lo largo de la operación del SBR. Experimentos realizados con pulsos de sustrato de 14 $\text{mg}_{\text{DQO}}/\text{l}$	42
Figura 6.10 Valores de η encontrados con diferentes concentraciones de sustrato en diferentes días (80, 96 y 100).	43

Índice de Tablas

Tabla 5.1 Composición del medio de cultivo mineral	18
Tabla 5.2 Parámetros de operación SBR	19

Nomenclatura

μ_{\max}	Velocidad máxima de crecimiento celular
b_H	Respiración endógena
C	Concentración de oxígeno disuelto en el tiempo
C^*	Concentración de saturación de oxígeno disuelto
C_0	Concentración de oxígeno disuelto al comienzo del pulso
C_b	Concentración de oxígeno disuelto de la línea base
C_f	Concentración de oxígeno disuelto al final del pulso
EPS	Exopolisacáridos
K_I	Contantes de inhibición
K_{La}	Coeficiente de transferencia de masa
K_s	Constante de afinidad
η	Factor de efectividad
OD	Oxígeno disuelto
OUR	Tasa de consumo de oxígeno
OUR^*_{\max}	Tasa máxima de consumo de oxígeno específico
OUR'_{\max}	Tasa máxima de consumo de oxígeno observada en el experimento
OUR_{\max}	Tasa máxima de consumo de oxígeno
R_{\max}	Tasa máxima de degradación del sustrato
SBR	Reactor por lote secuenciado
S_p	Pulso de sustrato
X	Concentración de biomasa
$Y_{O/S}$	Rendimiento de oxidación de sustrato
$Y_{X/S}$	Rendimiento celular

Resumen

Los gránulos aerobios son una tecnología relativamente nueva usada para el tratamiento de aguas residuales, los cuales presentan varias ventajas comparados con los lodos activados, entre las que destacan su capacidad para sedimentar y la menor producción de lodos. Los gránulos son formas tridimensionales, por lo que, al aumentar su diámetro, su superficie específica se ve disminuida presentando limitaciones en la transferencia de oxígeno y nutrientes. Conocer el impacto de estas limitaciones es un tema de interés para la aplicación y uso de esta tecnología.

Las limitaciones en la transferencia de masa se pueden cuantificar mediante el factor de efectividad (η), el cual se basa en resolver ecuaciones de continuidad. Sin embargo, las ecuaciones de continuidad son complejas de resolver e implica el uso de parámetros difíciles de cuantificar. En esta tesis se usó la respirometría (medición indirecta del consumo de sustrato al monitorear el consumo de oxígeno bajo condiciones definidas) como método alternativo para la cuantificación del factor de efectividad y parámetros cinéticos y estequiométricos de gránulos aerobios de diferentes geometrías y tamaños.

Como primera parte del proyecto se caracterizaron los gránulos en función del diámetro de Feret y después se buscó una tendencia entre los parámetros calculados (η , OUR_{max} , μ_{max} , $Y_{X/S}$ y K_s) y el diámetro de los gránulos. Sin embargo, no se encontró ninguna tendencia ya que los valores encontrados fluctuaban según el día de experimentación. Lo anterior lo atribuimos a las diferencias estructurales y conformacionales de los gránulos los cuales variaban con el tiempo y edad de los gránulos.

Abstract

Aerobic granules are a relatively new technology used for wastewater treatment, this technology have several advantages compared to activated sludge such settling capability and lower sludge production. The granules are tridimensional shapes, therefore, as their diameter increases their specific surface is diminished, presenting limitations in the transfer of oxygen and nutrients. Knowing the impact of these limitations is a topic of interest for the application and use of this technology.

Limitation in mass transfer can be quantified by the effectiveness factor (η), which is based on solving continuity equations. However, continuity equations are complex to solve and involve the use of parameters that are difficult to quantify. In this thesis, respirometry (indirect measurement of substrate consumption rate by monitoring the oxygen consumption under well-defined conditions) was used as an alternative method for the quantification of the effectiveness factor and kinetic and stoichiometric parameters

As the first part of the project, the granules were characterization according to the Feret diameter, then a relation was sought between the calculated parameters (η , OUR_{max} , μ_{max} , $Y_{X/S}$ y K_s) and the diameter of the granules. However, no trend was found since the values found fluctuated according to the day of experimentation. This trend was attribute to the structural and conformational differences of the granules, which varies with the time and age of the granules.

1 Introducción

Las aguas residuales son aquellas que han sido utilizadas en las actividades diarias de una comunidad (domésticas, comerciales, industriales y de servicios) y necesitan ser tratadas para poder ser reintegradas al ambiente o reutilizadas. El no tratar estas aguas puede ocasionar problemas a la salud pública ya que en ellas se encuentran microorganismos patógenos que en su mayoría habitan el intestino humano, compuestos tóxicos y compuestos que son potencialmente mutagénicos y/o cancerígenos. Además del impacto sobre la salud humana, el contenido de materia orgánica puede ocasionar la proliferación de plantas acuáticas (eutroficación) y afectar la biodiversidad de los ecosistemas receptores.

Por lo anterior, la remoción de estos compuestos es de interés social y ambiental. Desde principios del siglo XX se ha reportado el uso de plantas de tratamiento de aguas residuales que emplean procesos físicos, químicos y biológicos, los cuales se suelen clasificar en tres etapas:

1. Tratamiento primario: remoción de sólidos gruesos usando procesos físicos como sedimentadores y filtros.
2. Tratamiento secundario: remoción de la materia orgánica biodegradable y sólidos suspendidos usando procesos químicos y/o biológicos como la floculación, precipitación, adsorción y actividad microbiana.
3. Tratamiento terciario: es usado cuando se requiere aumentar la calidad del efluente removiendo nutrientes, sólidos suspendidos restantes y desinfección.

Dentro de los procesos biológicos más comunes, se encuentran los lodos activados, lagunas de estabilización, humedales, entre otros. Sin embargo, estas tecnologías presentan ciertas

desventajas como la extensión territorial que necesitan, la alta producción de biomasa (lodos), baja carga orgánica que pueden operar y una capacidad de conversión volumétrica relativamente baja (Beun *et al.*, 1999).

Por lo cual el desarrollo de tecnologías innovadoras y de bajo costo para tratar estas aguas es un tema de suma importancia para la sociedad. Desde hace aproximadamente 30 años se ha reportado el uso de gránulos aerobios en diferentes tipos de reactores.

Los gránulos aerobios son agregados estables de células autoadheridas que se forman de manera natural en los reactores (Liu y Tay, 2004). Estos densos consorcios microbianos desempeñan una función primordial en la degradación, biosorción y bioacumulación de los compuestos presentes en las aguas residuales (Sarma *et al.*, 2017). En comparación con los lodos activados convencionales, los gránulos presentan una estructura regular, compacta y densa con la capacidad de sedimentar por lo cual, se pueden separar fácilmente sin la necesidad de un sedimentador. Adicionalmente, los microorganismos agrupados en gránulos presentan un rendimiento celular menor, reduciendo hasta un 30% la producción de lodos (Arrojo *et al.*, 2007). Otras ventajas de los gránulos es que presentan una mayor tolerancia a compuestos tóxicos, pueden soportar grandes cargas hidráulicas y orgánicas, así como tener una mayor concentración de biomasa dentro de los reactores.

1.1 Gránulos aerobios

Los gránulos aerobios son un conjunto de células autoinmovilizadas que están unidas por una matriz de exopolisacáridos (EPS), compuestos inorgánicos y varios minerales (Adav y Lee, 2008 en Zhang *et al.*, 2016). Su superficie externa está dominada por microorganismos aerobios, mientras que en su núcleo se pueden encontrar microorganismos anaerobios

facultativos y obligados, así como biomasa muerta (Sarma *et al.*, 2017). La obtención de gránulos maduros es un proceso que puede llevar desde días hasta meses presentando un tamaño promedio entre 0.2 y 5 mm (Liu y Tay, 2004; Toh *et al.*, 2003).

Los gránulos aerobios usados para el tratamiento de aguas residuales presentan diferentes colores dependiendo de la especie de microorganismo dominante y del compuesto principal a remover, aunque en su mayoría son de color amarillo o marrón amarillento. En los procesos de remoción de fosforo se ha reportado la presencia de gránulos amarillos los cuales están dominados por *Candidatus Competibacter* (Sarma *et al.*, 2017).

En su formación están involucrados varios factores como la composición del sustrato, carga orgánica, fuerza de corte hidrodinámico, concentración de oxígeno disuelto, configuración de los reactores, tiempo de retención hidráulico, periodo de hambruna el cual se cree fomenta la hidrofobicidad de las bacterias, presencia de agentes quelantes para neutralizar las cargas de la superficie bacteriana y favorecer el contacto entre ellas, tiempo de sedimentación, proporción de volumen a decantar y tiempo de descarga (Liu y Tay, 2004; Sarma *et al.*, 2017). De esos factores, se ha identificado que los últimos tres mencionados son los principales promotores de la presión selectiva de la comunidad microbiana dentro de los reactores (Liu, 2006).

El mecanismo de formación de los gránulos es un tema de gran interés, sin embargo, los pasos exactos son difíciles de corroborar experimentalmente. No obstante, la teoría generalmente aceptada es que se lleva a cabo en los cuatro pasos siguientes (Figura 1.1; Liu y Tay, 2002):

1. Movimientos físicos que inician el contacto entre bacterias siguiendo las fuerzas hidrodinámicas, de difusión, gravedad, termodinámicas y movimiento celular.

2. Fuerzas de atracción físicas, químicas y biológicas que mantienen el contacto entre bacterias. En este paso la superficie celular hidrofóbica juega un papel importante.
3. Fuerzas microbianas que ocasionan la maduración del agregado bacteriano como pueden ser la producción de polímeros extracelulares, crecimiento de clúster celulares y cambios metabólicos.
4. Estabilización de la estructura tridimensional. La forma externa y el tamaño de los gránulos resultan de la resistencia/patrón entre los gránulos y la fuerza de corte hidrodinámica, las especies microbianas y la velocidad de carga del sustrato.

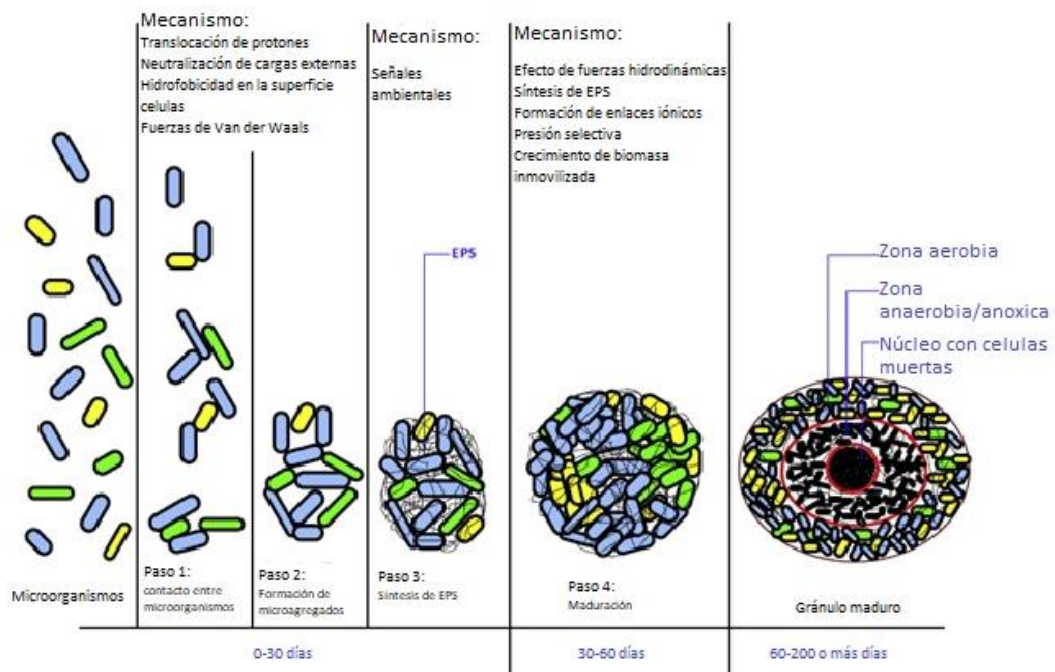
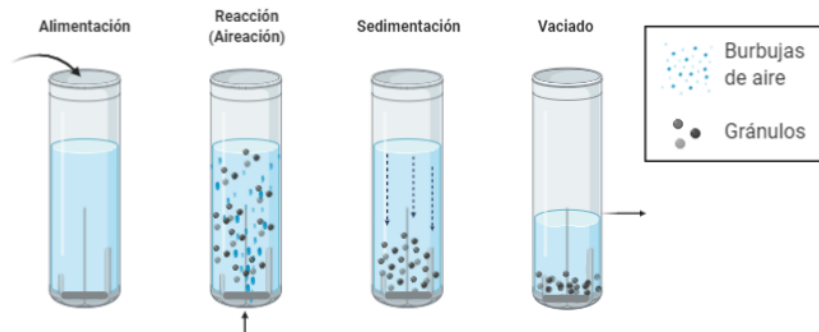


Figura 1.1 Mecanismo de formación de gránulos aerobios (tomado de Sarma *et al.*, 2017)

Los gránulos aerobios se han cultivado en una gran variedad de sustratos como glucosa, acetato, etanol, fenol, agua residual sintética, entre otras (Liu y Tay, 2004) y se ha encontrado que la diversidad microbiana está directamente relacionada con la fuente de carbono (Lee *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Tay y colaboradores (2002) comparando el uso de

glucosa y acetato como fuente de carbono se encontró que los gránulos crecidos con acetato mostraron superficies más lisas y con una presencia mínima de microorganismos filamentosos, por lo cual, su estructura bacteriana era compacta y el contacto entre células íntimo. En cambio, los gránulos crecidos en glucosa fueron menos densos y compactos.

Por otro lado, la formación de gránulos se ha reportado en diferentes tipos de reactores. Los sistemas más usados son los reactores por lote secuenciados o SBR (por sus siglas en inglés; Sequencing Batch Reactor). Esos reactores constan de ciclos compuestos por 4 pasos: alimentación, aireación, sedimentación (clarificación) y decantación (Figura 1.2). La duración de cada una de las fases se determina por las características del agua residual a tratar y los requerimientos de depuración del efluente. Para la formación de gránulos, la etapa de sedimentación es de primera importancia, porque permite crear una presión selectiva sobre la comunidad microbiana; un corto tiempo de sedimentación favorece la selección de bacterias con la capacidad de sedimentar rápidamente y las que no, son eliminadas con el efluente.



Pasos:

- 1. Alimentación.** Se ingresa al reactor medio fresco.
- 2. Reacción.** En esta etapa se enciende la aireación para que se lleve a cabo el consumo de sustrato.
- 3. Sedimentación.** La aireación es suspendida y la biomasa empieza a sedimentarse.
- 4. Vaciado.** Se decanta cierto porcentaje del volumen de operación del reactor así como biomasa con pobre capacidad de sedimentar.

Figura 1.2 Pasos de un ciclo de un SBR

1.2 Resistencia a la transferencia de masa

Una de las principales características de los gránulos es su tamaño, un aumento en el diámetro representa una disminución de su superficie específica (m^2/m^3). Por lo anterior, el crecimiento de los gránulos va acompañado con limitaciones de transferencia de masa interna y externa de oxígeno, sustrato y nutrientes (Liu, 2005; Li y Liu 2005; Li *et al.*, 2008). Estas limitaciones en el aporte de oxígeno, sustrato y nutrientes pueden afectar la estructura y estabilidad del gránulo (Toh *et al.*, 2003; Dahalan *et al.*, 2015).

El o los sustratos y el oxígeno se transportan a los gránulos mediante la interfaz formada entre su superficie y el agua (Bishop, 1997; Figura 1.3). Una vez que hayan cruzado la interface, el o los sustratos y el oxígeno se difunden por el seno del gránulo donde son consumidos por los microorganismos que lo conforman, según un mecanismo llamado difusión-reacción (Melo, 2005). En este proceso la transferencia de masa y la reacción biológica pueden considerarse fenómenos dependientes (Rittmann *et al.*, 1999), esto indica que el mecanismo más lento será el paso limitante del proceso y controlará la tasa global de consumo de sustrato y actividad biológica. Debido a que la transferencia de masa interna es con frecuencia el paso más lento su estudio es de vital importancia (Melo, 2005).



Figura 1.3 Transferencia de masa a través de un gránulo

Una forma de cuantificar la limitación de la transferencia de masa sobre la velocidad de reacción es a través del factor de efectividad (η), que se define como la relación entre la tasa de reacción con limitación de transferencia de masa (aparente) y la tasa de reacción sin efectos de ésta (intrínseca) (Li y Lui, 2005).

$$\eta = \frac{\text{Reacción con limitación de transferencia de masa}}{\text{Reacción sin limitación de transferencia de masa}} \quad (1)$$

Cuando la resistencia a la difusión es insignificante η se aproxima a uno, mientras que η tiene valores cercanos a cero cuando la resistencia a la difusión domina a la reacción.

El factor de efectividad generalmente se determina mediante métodos matemáticos basados en resolver ecuaciones de continuidad. Sin embargo, resolver ecuaciones de continuidad es complejo ya que el reactor en operación presenta cambios tanto en la concentración de oxígeno como de sustrato en la fase líquida, acompañado por gradientes afuera y dentro de los gránulos (Vital-Jacome *et al.*, 2016). Adicionalmente, para resolver ecuaciones de continuidad se necesita estimar una gran variedad de parámetros como la difusividad del sustrato y oxígeno, concentración de biomasa y parámetros cinéticos y estequiométricos necesarios para el proceso de bioconversión, muchos de los cuales son difíciles de determinar. Debido a los inconvenientes involucrados en la determinación de los parámetros, se prefiere usar valores previamente reportados en lugar de los valores experimentales (Ordaz *et al.*, 2019), lo cual concluye en valores de η sobreestimados o subestimados.

Una alternativa para calcular los parámetros cinéticos y estequiométricos y calcular el factor de efectividad es mediante métodos de respirometría con el cual se mide de manera indirecta la tasa de consumo de sustratos al monitorear la tasa de consumo de oxígeno en condiciones bien definidas (Vanrolleghem, *et al.*, 1998).

En el trabajo reportado por Vital-Jacome y colaboradores (2016), de nuestro grupo de trabajo, se evaluó el potencial de la microrespirometría para caracterizar los gránulos aerobios. El concepto de este acercamiento es la medición de la tasa de respiración en gránulos íntegros y en gránulos disgregados (sin resistencia a la transferencia de masa). En este trabajo, los autores determinaron experimentalmente el factor de efectividad de los gránulos en un modelo de SBR granular aeróbico que degradaba 4-clorofenol (4-CP) como única fuente de carbono.

En el presente trabajo, basándose en ese antecedente del grupo y empleándose técnicas de respirometría, se pretende determinar el factor de efectividad en gránulos aerobios de diferentes geometrías y tamaños creciendo en un medio de acetato de sodio como única fuente de carbono.

1.3 Respirometría

La respirometría es la medición e interpretación de la tasa de consumo de oxígeno (OUR por sus siglas en inglés) por los microorganismos bajo condiciones bien definidas. La tasa de respiración es definida como la cantidad de oxígeno consumido por unidad de volumen y tiempo, la cual está directamente relacionada con el crecimiento celular y consumo de sustrato (Spanjers y Vanrolleghem, 1995).

La tasa de respiración es usualmente medida en un respirómetro. Existe una variedad de respirómetros disponibles comercialmente o desarrollados por grupos de investigación. Estos presentan diferentes formas y tamaños que van desde equipos simples como una botella con un sensor de oxígeno disuelto (OD) hasta sistemas más complejos que operan de manera automática (Spanjers *et al.*, 1996). Los métodos respirométricos pueden clasificarse bajo dos criterios:

1. La fase donde el oxígeno es medido, líquido o gas.

2. El régimen de la fase, es decir, en la presencia (dinámica) o ausencia (estática) de aireación continua.

La medición del oxígeno disuelto (OD) es generalmente llevada a cabo en la fase líquida debido a la disponibilidad y accesibilidad de equipos (sensores) que realizan esta función en tiempo real.

Los métodos más usados para obtener datos de OUR son la respirometría estática, que se basa en la medición de la concentración de OD en un respirómetro no aireado. En este caso, el OUR se determina a partir de la pendiente decreciente del OD contra el tiempo (Ramírez-Vargas *et al.*, 2013). La respirometría dinámica mide el oxígeno disuelto en un respirómetro aireado. Usualmente la respirometría dinámica implica la inyección de pulsos de sustrato y se llama, en este caso “respirometría dinámica de pulsos”. En este método, el OUR se determina resolviendo el balance de masa entre el aporte de oxígeno (coeficiente de transferencia de masa; K_{La}) y su consumo; i.e. OUR (Ramírez-Vargas *et al.*, 2013). La curva de OD que se observa durante este tipo de experimento se llama respirograma.

La Figura 1.4 muestra un ejemplo de un respirograma típico observado durante un experimento de respirometría dinámica de pulsos; C^* corresponde a la concentración de saturación de oxígeno; la línea punteada roja (C_b) corresponde a la respiración endógena (respiración asociada al metabolismo basal o de mantenimiento) o línea base inicial del estado pseudo-estacionario; la línea azul muestra C observada después de la inyección del pulso de sustrato de concentración conocida (S_p); el área rosa refleja la masa de oxígeno consumida para oxidar el sustrato inyectado. Cabe observar que el respirograma muestra una caída repentina después de la inyección del pulso de sustrato. Esta caída corresponde a la transición entre respiración endógena; i.e. sin sustrato exógeno, y respiración exógena (oxidación del sustrato añadido externamente) (Oliveira *et al.*, 2009). Rápidamente la tasa de respiración alcanza un valor máximo (C mínimo),

que corresponde a la tasa de respiración a la concentración de sustrato (dependiendo de la cinética microbiana descrita por modelo de Monod, u otro). Después, C regresa progresivamente a C_b , mientras el sustrato se está agotando y los microorganismos regresan a la condición de respiración endógena.

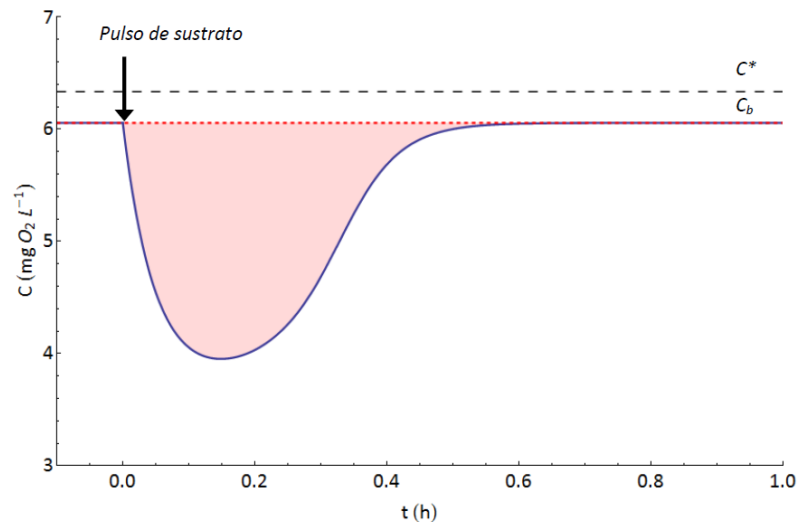


Figura 1.4 Respirograma típico de una respirometría dinámica de pulsos

La respirometría ha sido utilizada para estimar una gran variedad de parámetros cinéticos y estequiométricos como: la constante de afinidad (K_S), rendimiento de oxidación de sustrato ($Y_{O/S}$), rendimiento celular ($Y_{X/S}$), velocidad máxima de degradación del sustrato (R_{max}), velocidad máxima de crecimiento celular (μ_{max}), respiración endógena (b_H), constantes de inhibición (K_I), entre otros (Vanrolleghem et al., 2004; Kong et al., 1996). Los cuales se pueden obtener mediante una amplia variedad de métodos.

A partir de un respirograma los parámetros estequiométricos de rendimientos de oxidación ($Y_{O2/S}$) y de crecimiento celular ($Y_{X/S}$) se determinan de la observación directa del respirograma (área rosa) como lo describe la ecuación 2. Cabe mencionar que, si están expresados en unidades de DQO o de oxígeno, entonces la suma de $Y_{O2/S}$ y $Y_{X/S}$ es igual a uno.

$$Y_{X/S} = 1 - Y_{O_2/S} = \frac{\int_0^t OUR_{ex} dt}{S_p} = \frac{K_L a \int_0^t (C_b - C) dt + (C_0 - C_f)}{S_p} \quad (2)$$

Donde la integral corresponde al área del respirograma mientras que C_0 y C_f son la línea base antes y después del pulso de sustrato (S_p).

La constante de afinidad al sustrato (K_s), la velocidad máxima de consumo de oxígeno (OUR_{max}) y la velocidad máxima de crecimiento celular (μ_{max}) se pueden determinar por varios métodos. El método más corriente es por ajuste de modelo a datos experimentales: i.e. calibración de modelo (Ramírez-Vargas *et al.*, 2013). En la calibración de modelos se usan herramientas matemáticas basadas en métodos numéricos para estimar los parámetros que mejor se ajustan a los valores experimentales del respirograma. Sin embargo, una de las principales desventajas de este método es identificabilidad estructural y práctica de los parámetros, a menudo deficiente (Vital-Jacome, 2017). Por lo anterior, el grupo de trabajo desarrolló hace unos años un método alternativo, llamado “método de pulsos de concentración creciente” que se basa en la determinación de la tasa máxima de respiración observada ($OUR'_{ex,max}$), con diferentes concentraciones de pulso (S_p). Considerando que $OUR'_{ex,max}$ es proporcional a S_p , el conjunto de datos obtenidos permite calibrar modelos de una forma más sencilla. Una forma de proceder, cuando se considera una cinética de tipo Monod, es mediante linealización de Hanes-Woolf o Lineweaver-Burk. Sin embargo, la principal desventaja de este método es el limitado número de parámetros que se pueden estimar; i.e. solo K_s y OUR_{max} (Vital-Jacome, 2017).

La respirometría es entonces una herramienta valiosa para estimar parámetros cinéticos y estequiométricos. Ese método, con todas sus variantes, se desarrolló para reducir el esfuerzo experimental y el error que implica el método tradicional de sustrato limitante (el método de sustrato limitante consiste en la medición directa de la concentración de sustrato de muestras

tomadas del sistema a diferentes tiempos, lo cual se vuelve complejo cuando las concentraciones son bajas). Sin embargo, los métodos respirométricos requieren experimentos simultáneos y la duración de estos reduce el número de replicas que se puede realizar. Además, en sus configuraciones clásicas, la respirometría requiere volúmenes de cultivos relativamente grandes (100-1000 ml) (Esquivel-Rios *et al.*, 2014).

Llevar a cabo experimentos respirométricos de manera simultánea con un número significativo de replicas y usando volúmenes pequeños es una mejoría importante que se consiguió, en nuestro grupo, aprovechando el desarrollo de arreglos de microbioreactores, los cuales trabajan con pequeños volúmenes y usualmente incluyen sensores de oxígeno disuelto (Esquivel-Rios *et al.*, 2014).

1.4 Microrespirometría

Los arreglos de microbioreactores son dispositivos que operan con pequeños volúmenes (0.1 – 100 ml) y son utilizados para realizar pruebas rápidas de selección clonal, mejorado de cepas y medios de cultivo, así como optimización de procesos (Isett *et al.*, 2007).

Los microbioreactores están a menudo equipados con un sensor de OD óptico que presenta varias ventajas sobre los sensores de OD tradicionales (electroquímicos), por ejemplo, son sensores no invasivos con un menor tiempo de respuesta y que no consumen oxígeno durante la medición. Están diseñados para medir cambios bruscos en la concentración de oxígeno y son menos susceptibles a interferencias químicas (Wolfbeis, 2015).

Existe en el mercado una amplia variedad de microbioreactores con 6 a 384 pozos (Ramírez-Vargas *et al.*, 2014). Los más simples solo contienen sensores de oxígeno o pH y requieren el uso de una incubadora para controlar la temperatura y agitación. Por otro lado, los sistemas más

complejos están equipados con su propio sistema de agitación, sensor de OD, pH y temperatura (Betts y Baganz, 2006).

Debido a estas características, en nuestro grupo de trabajo se ha implementado el uso de microbioreactores para realizar pruebas de respirometría, el cual se denominó microrespirometría. Tal como lo reporta Ramírez-Vargas y colaboradores (2014), los resultados obtenidos de la medición de OD y transferencia de oxígeno en microbioreactores son muy similares a los obtenidos en bioreactores de mayor escala. Con esta base, esos mismos autores desarrollaron la técnica de respirometría dinámica en esos sistemas de microbioreactores y llamaron el método "Microrespirometría". Similarmente Esquivel-Ríos y colaboradores (2014) concluyeron que el uso de microbioreactores disminuye el error en la determinación de los parámetros debido al número de replicas que se pueden llevar a cabo en un mismo experimento, así como la reducción del esfuerzo experimental y disminución de costos.

Por lo anterior, se demuestra la utilidad de la microrespirometría para el cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos y será el método utilizado en esta tesis, enfocado a la determinación del factor de efectividad (η).

2 Justificación

Trabajos previos del grupo de trabajo incluyeron el desarrollo de métodos de microrespirometría para la caracterización de bioprocesos en arreglos de microbioreactores (Ramírez-Vargas *et al.*, 2014). Con base en estos, Vital-Jacome y colaboradores (2016) aplicaron ese método respirométrico para caracterizar el factor de efectividad de gránulos aerobios degradando 4-Clorofenol como único sustrato. Esos autores demostraron la factibilidad de ese método, experimentalmente sencillo, comparado con los métodos ya existentes; i.e. resolviendo complejos sistemas de ecuaciones de difusión/reacción. Por lo anterior se justifica repetir ese protocolo de determinación de factor de efectividad en otros ejes de investigación. Conocer el impacto del tamaño y edad de los gránulos aerobios en la transferencia de masa es de suma importancia ya que esta información nos ayudaría a conocer el tamaño óptimo de los gránulos para su operación en una planta de tratamiento de aguas residuales y así mejorar su eficiencia y diseño, una forma de conocer esta información es mediante el factor de efectividad (η) que relaciona la velocidad de reacción con y sin resistencia a la transferencia de masa.

3 Objetivos

1.1. Objetivo general

Determinar el factor de efectividad asociado a diferentes geometrías de gránulos utilizando técnicas de respirometría dinámica.

1.2. Objetivos específicos

1. Obtener gránulos aerobios de tamaño homogéneo.
2. Caracterización de los gránulos.
3. Evaluar y optimizar la operación de los microbioreactores.
4. Desarrollar una metodología para el análisis de resultados y calcular los parámetros cinéticos de los gránulos y gránulos disgregados.
5. Determinar el factor de efectividad.

4 Hipótesis

Mediante microrespirometría dinámica de pulsos se podrán determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos (OUR_{max} , μ_{max} , K_s , $Y_{O_2/S}$ y $Y_{X/S}$) de gránulos microbianos de tamaño creciente.

5 Materiales y métodos

5.1 Configuración y operación del reactor

Un reactor SBR fue operado en una columna de burbujas de vidrio con un diámetro interno de 0.12 m, un volumen total de 9 l y un volumen de trabajo de 6 l. El reactor fue inoculado con lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas (San Juan de Aragón, Ciudad de México). La concentración inicial de biomasa en el reactor fue de $0.72 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{l}$. El SBR operó a temperatura ambiente ($20 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) y pH de 7.5 ± 0.5 controlado mediante la adición de H_3PO_4 1 M.

La alimentación del medio de cultivo y la descarga del efluente se realizaron por medio de bombas peristálticas (Masterflex L/S Cole Palmer, Modelo 7554) que fueron controlados por temporizadores de precisión. El suministro de aire se realizó por medio de difusores localizados en el fondo del reactor a un flujo de 1 VVM (volumen de aire por volumen de líquido por minuto) y fue controlado por medio de una electroválvula. La operación del reactor se muestra de manera gráfica en el siguiente esquema.

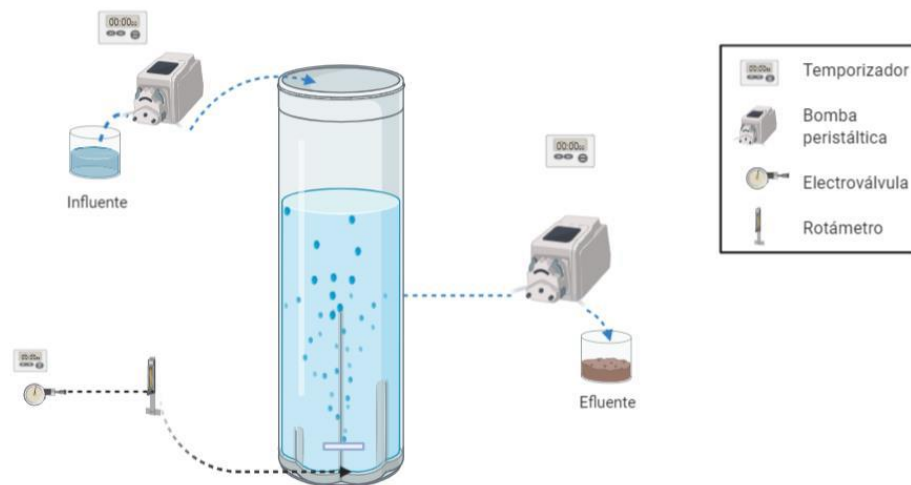


Figura 5.1 Diagrama SBR

La Tabla 5.1 muestra la composición del medio de cultivo usado para la alimentación, donde se puede apreciar que la única fuente de carbono fue acetato de sodio (CH_3COONa).

Tabla 5.1 Composición del medio de cultivo mineral

Compuesto	mg/l
KH_2PO_4	20
NaHPO_4	38
NH_4Cl	220
MgSO_4	25
CaCl_2	50
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5
CH_3COONa	2000
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03539
H_3BO_4	0.0572
ZnCl_2	0.0203
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.0347
EDTA	0.0555

En cada ciclo del reactor se descargó 3 l de su contenido (50% del volumen total) y se reemplazó por medio de cultivo nuevo. El medio de cultivo mineral tenía una concentración de sustrato de 1.3 $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{l}$, por lo cual, la concentración del medio de cultivo dentro del reactor fue de 0.65 $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{l}$, considerando una remoción total de sustrato.

El reactor después de ser inoculado operó en lote por 24 horas y posteriormente, el tiempo de reacción (aireación) fue disminuido en función del comportamiento de la biomasa. Así mismo, el tiempo de sedimentación fue disminuido para ejercer una presión selectiva dentro del reactor y promover la formación de gránulos en el menor tiempo posible. Los tiempos de operación de cada periodo se llevaron a cabo como se describe en la Tabla 5.2:

Tabla 5.2 Parámetros de operación SBR

Periodo (d)	Alimentación (min)	Reacción (min)	Sedimentación (min)	Descarga (min)	Total (h)
0-1	9	1411	15	5	24
1-3	9	696	10	5	12
3-7	9	221	5	5	4
7-9	9	344	2	5	6
9-29	9	464	2	5	8
29-77	9	465	1	5	8
77-123	9	705	1	5	12

Para monitorear la velocidad de consumo del sustrato se midió el oxígeno disuelto del reactor mediante un parche PreSens (OIM Type PSt3) con fibra óptica (Sistema OXY-1-SMA) que se localizaba a la mitad del volumen de trabajo del reactor. La recolección de datos de OD fue en tiempo real usando el software PreSens measurement studio 2Ink.

5.2 Métodos analíticos

La cantidad de biomasa dentro del reactor fue monitoreada mediante la demanda química de oxígeno (DQO) la cual fue medida por el método colorimétrico de reflujo cerrado (APHA, 1999). Se calculó la DQO total y soluble de una muestra homogénea tomada del reactor. Para la DQO soluble una parte de la muestra fue centrifugada y filtrada a través de una membrana de nylon con poro de 0.45 μm . La DQO insoluble se calculó a partir de la diferencia entre DQO total y DQO soluble. Se consideró que la DQO insoluble correspondía a la concentración de biomasa debido a la ausencia de sólidos suspendidos en el medio de cultivo.

5.3 Análisis de imagen

El diámetro de los gránulos se calculó a partir de muestras tomadas del seno del reactor, con la finalidad de garantizar muestras más homogéneas. Las muestras al comienzo de la granulación se observaron al microscopio y se usó una cámara de Neubauer como referencia. Cuando el

diámetro de los gránulos fue mayor a 0.2 mm, se tomaron fotos de las muestras usando una referencia conocida. Las fotografías fueron analizadas con un software de análisis de imagen (ImageJ 1.52v). El tamaño del diámetro fue caracterizado por el diámetro de Feret, que es igual a la distancia perpendicular entre tangentes paralelas de los extremos con mayor y menor distancia que tocan lados opuestos de la partícula (Walton, 1948; Figura 5.2). En este trabajo se reportó el promedio del diámetro de mayor tamaño.



Figura 5.2 Caracterización del diámetro de Feret

5.4 Biomasa disgregada

Para cuantificar las limitaciones en la transferencia de masa se realizaron experimentos con biomasa disgregada. Para disgregar los gránulos se efectuaron pruebas con un homogeneizador (ULTRA-TURRAX t8) a distintos tiempos (1,2,4 y 8 minutos) y dos velocidades (13000 y 17000 RPM). Muestras de los diferentes tiempos fueron observadas al microscopio para verificar que los gránulos habían sido disgregados. Se observó una disminución del tamaño desde los 4 minutos de homogenización, por lo cual, se decidió usar un tiempo de 5 minutos y 17000 RPM.

Para corroborar que el homogeneizador no afectaba el metabolismo de los microorganismos se monitoreó la respiración de gránulos y muestras disgregadas a diferentes tiempos en los microbioreactores (apartado 5.5). Los experimentos mostraron que todas las muestras llegaron

a la misma línea base (C_b), por lo cual se corroboró que la homogenización/disgregación no afectó el metabolismo celular.

5.5 Microbioreactores

Los ensayos respirométricos se llevaron a cabo en un sistema de microbioreactores de 24 pocillos cada uno con un diámetro de 16 mm y 18 mm de profundidad (24-microplate system, PreSens, Applikon, México). Cada pozo incluía un sensor de oxígeno disuelto fluorométrico (DO) precalibrado (OxoDish, PreSens, México), como se muestra en la Figura 5.3. Los sensores se leyeron con un Sensor Dish Reader de 24 canales (SDR-281, PreSens, México) conectado a una computadora personal para la adquisición de datos utilizando el software PreSens (SDR v37).



Figura 5.3 Sistema de microbioreactores

El sistema de microbioreactores fue mantenido a una temperatura fija en una incubadora/agitadora orbital a 25°C y 160 RPM, la transferencia de oxígeno fue mantenida mediante aireación superficial y para mejorarla se agregó a cada pozo una perla de vidrio de 5 mm de diámetro.

5.6 Experimento respirométrico

El método respirométrico fue utilizado para determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos aparentes e intrínsecos de la biomasa.

Los parámetros aparentes corresponden a los datos obtenidos de los experimentos realizados con los gránulos íntegros, es decir, con limitaciones en la transferencia de masa. Por su parte, los parámetros intrínsecos fueron determinados a partir de la biomasa de los gránulos disgregados, esto con la finalidad de eliminar la resistencia a la transferencia de masa.

El método elegido para esta tesis fue la respirometría dinámica de pulsos. La cual se llevó a cabo como se describe a continuación:

0. Como paso antecesor se tomó una muestra del reactor que fue centrifugada a 7000 RPM por 10 minutos y resuspendida en medio mineral sin fuente de carbono. El procedimiento fue hecho dos veces para remover cualquier sustrato residual.
1. Se colocó 1.4 ml de la solución de biomasa a cada microbioreactor y se ingresó a la incubadora con las condiciones ya mencionadas. La adquisición de datos de OD fue cada 15 segundos y se esperó a que estos llegaran a una línea base que corresponde a la respiración endógena (C_b).
2. El sistema fue parado para agregarle los pulsos, se adicionó 0.1 ml de acetato de sodio. La concentración final en cada microbioreactor fue de 0, 2, 8, 14, 30 y 45 mg_{DQO}/l, cada uno con 4 réplicas.
3. El sistema fue reanudado y se observó una caída en la concentración de OD, lo cual se debe al consumo de sustrato.
4. La concentración de OD regresó a la línea base.

En el caso de los experimentos sin resistencia a la transferencia de masa el único paso adicional fue en el punto 0, después de los lavados se usó el homogenizador por 5 minutos para disgregar

los gránulos. El resto del experimento se llevó a cabo como indican los puntos descritos con anterioridad.

5.7 Determinación del coeficiente de transferencia de masa (K_{La})

Al final de la prueba de respirometría, después de alcanzada la línea base se determinó el valor del K_{La} de acuerdo con el método descrito por Badino y colaboradores (2000). Se inyectó nitrógeno a cada pozo del sistema de microbioreactores por medio de un dispositivo de aireación (Figura 5.4). El flujo de nitrógeno se mantuvo hasta obtener lecturas de OD cercanas a cero, después de esto el dispositivo fue retirado y se permitió que el sistema llegara a la línea base.

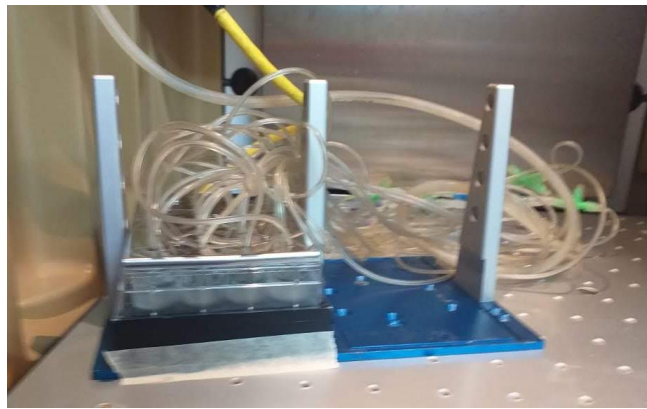


Figura 5.4 Dispositivo de aireación

Los valores de K_{La} se determinaron por ajuste de modelo a datos experimentales usando la ecuación 3. El análisis se realizó en el software AQUASIM V2.

$$\frac{dc}{dt} = K_L a (C_b - C) \quad (3)$$

C_b representa la concentración de oxígeno disuelto de la línea base y C es la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo t .

5.8 Interpretación de datos

La interpretación de los datos después de la adición del pulso se analizó mediante el balance de masa que se muestra la ecuación 4 (Kong et al., 1994). La ecuación describe el balance entre la velocidad de consumo de oxígeno (OUR_{ex}) y el oxígeno suministrado:

$$\frac{dc}{dt} = K_L a (C_b - C) - OUR_{ex} \quad (4)$$

Donde, C_b representa la concentración de oxígeno disuelto de la línea base; C es la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo t ; $K_L a$ es el coeficiente de transferencia de masa y OUR_{ex} es la tasa de consumo de oxígeno cuando se adiciona una concentración conocida de sustrato.

El rendimiento de oxidación ($Y_{O_2/S}$) se determinó a partir del área del respirograma de acuerdo con la ecuación 5 (Ordaz et al., 2008). Cuando una cantidad conocida de sustrato es oxidada, el $Y_{O_2/S}$ esta dado por la cantidad de oxígeno consumido para oxidar el sustrato inyectado (S_p), en unidades de DQO (Esquivel-Rios *et al.*, 2014).

$$Y_{O_2/S} = \frac{\int_0^t OUR_{ex} dt}{S_p} = \frac{K_L a \int_0^t (C_b - C) dt + (C_o - C_f)}{S_p} \quad (5)$$

Como las concentraciones de biomasa y sustrato están expresadas en DQO, a partir de $Y_{O_2/S}$ se puede determinar $Y_{X/S}$, ecuación 6.

$$Y_{X/S} = 1 - Y_{O_2/S} = \frac{\int_0^t OUR_{ex} dt}{S_p} = \frac{K_L a \int_0^t (C_b - C) dt + (C_o - C_f)}{S_p} \quad (6)$$

Donde la integral corresponde al área del respirograma mientras que C_o y C_f son la línea base antes y después del pulso de sustrato (S_p).

K_s y OUR_{max} fueron determinados a partir de la linealización de Hanes-Woolf (ecuación 7)

$$\frac{S_P}{OUR'_{ex,max}} = \frac{S_P}{OUR_{max}} + \frac{K_S}{OUR_{max}} \quad (7)$$

Donde $OUR'_{ex,max}$ corresponde a la tasa máxima de consumo de oxígeno observada en el experimento; S_P concentración del pulso; OUR_{max} tasa máxima de consumo de oxígeno y K_S constante de afinidad al sustrato.

La velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\mu_{max} = OUR_{max} * \frac{Y_{X/S}}{X * Y_{O_2/S}} \quad (8)$$

Donde X es la concentración de biomasa en unidades de DQO; $Y_{O_2/S}$ y $Y_{X/S}$ son los rendimientos de oxidación y celular respectivamente, y OUR_{max} es la tasa máxima de consumo de oxígeno.

Los experimentos se llevaron a cabo en diferentes días y fases del reactor por lo cual la concentración de biomasa no era la misma. Para poder comparar los valores obtenidos de OUR_{max} de los diferentes días se usó el OUR específico (OUR^*). El OUR^* es una relación entre OUR_{max} y la concentración de biomasa (X) en unidades de DQO.

Para cuantificar las limitaciones en la transferencia de masa se calculó η de acuerdo con la ecuación 9, que compara los valores de OUR^* de los experimentos con gránulos (OUR^*_g) y gránulos disgregados (OUR^*_d) a la misma concentración de sustrato.

$$\eta = \frac{OUR^*_g}{OUR^*_d} \quad (9)$$

Todos los datos fueron analizados con el programa de Excel.

6 Resultados y discusión

6.1 Operación del reactor

La acumulación de biomasa dentro del reactor depende de dos factores: la velocidad de crecimiento celular y la cantidad de biomasa lavada. La Figura 6.1 muestra el comportamiento de la biomasa durante el experimento. En ella se puede observar una disminución de la cantidad de biomasa especialmente en los primeros 7 días de operación ya que el tiempo de sedimentación fue disminuido de manera drástica de 15 a 5 minutos. Los resultados observados concuerdan con los datos reportados por diversos autores (Vital-Jacome et al., 2016; Lui y Tay, 2007), al disminuir el tiempo de sedimentación la biomasa con una pobre capacidad para sedimentar es lavada.

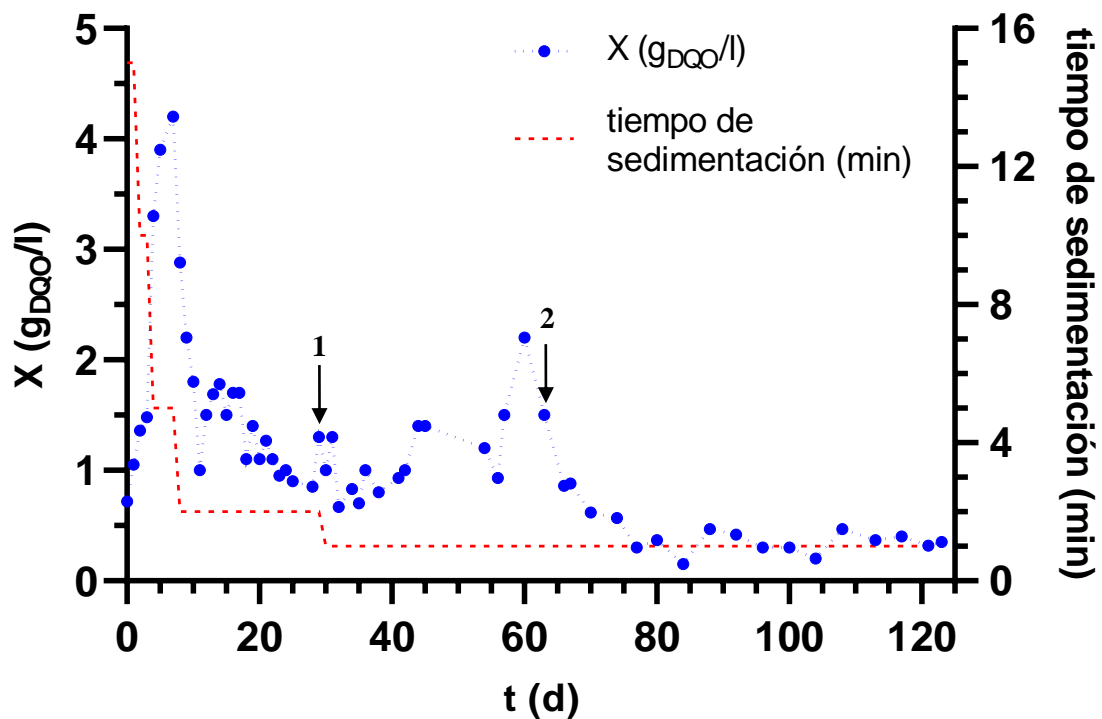


Figura 6.1: Concentración de la biomasa observada en el reactor y tiempo de sedimentación aplicado durante los 123 días de operación. El punto 1 indica el cambio en el tiempo de sedimentación a un minuto y el punto 2 indica la desaparición de los flóculos.

En los siguientes 22 días de operación el tiempo de sedimentación se mantuvo en 2 minutos (línea roja en la Figura 6.1). Al día 30 (punto 1 en la Figura 6.1), debido a que en el reactor no se observaron gránulos compactos se decidió disminuir este tiempo a un minuto (tiempo que fue mantenido hasta el último día de operación) para ejercer una mayor presión selectiva. En este caso no se observó un cambio brusco en la concentración de biomasa debido a que la misma ya estaba adaptada y se mantuvo a una concentración promedio de $1 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{l}$. Sin embargo, en el día 42 de operación se observó un aumento en el tamaño de los flóculos así como un cambio de su morfología, presentando geometrías alargadas (Figura 6.2). A partir del día 63, la presencia de esos flóculos disminuyó drásticamente y en el día 67 de operación no se observaron. Lo anterior se puede atribuir a su inestabilidad, lo que ocasionó que se separaran y la biomasa libre fue lavada del reactor. Otro factor pudo ser el aumento de la temperatura ambiente, la cual había incrementado esas últimas semanas por el cambio de estación, ocasionando un cambio metabólico en los microorganismos.

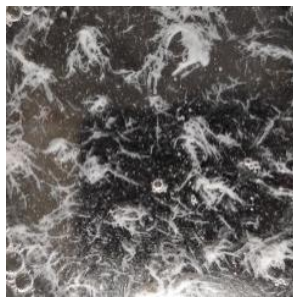


Figura 6.2: Flóculos observados en el día 60 de operación

Asimismo, el lavado de los flóculos observado a partir del día 63 se refleja en la concentración de la biomasa (línea azul en la Figura 6.1), la cual disminuyó de $2.2 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{l}$ (día 63) a $0.86 \text{ g}_{\text{DQO}}/\text{l}$ (día 67). Esto significó la pérdida del 60 % de la biomasa en 4 días.

En el día 77 de operación del reactor, se modificó el tiempo de reacción de cada ciclo a 705 minutos, dando un tiempo de retención hidráulica (HRT por sus siglas en inglés) de 23.5 h. Estas condiciones que se mantuvieron hasta el último día de operación.

El consumo de sustrato se monitoreó midiendo el OD del reactor en días aleatorios. Para el tiempo de reacción también se consideró un tiempo de hambruna el cual según Liu y Tay (2007) es un factor determinante para la granulación, ellos observaron gránulos más densos y con mejor capacidad de sedimentación cuando el tiempo de hambruna fue de 3.3 h. Los perfiles de OD obtenidos fueron como el presentado en la Figura 6.3 donde se observa una disminución en la concentración de OD después de la alimentación del medio fresco; cuando la concentración de acetato alcanzó valores mínimos se aprecia un aumento rápido en la concentración de oxígeno y su estabilización en la línea base (fase de hambruna).

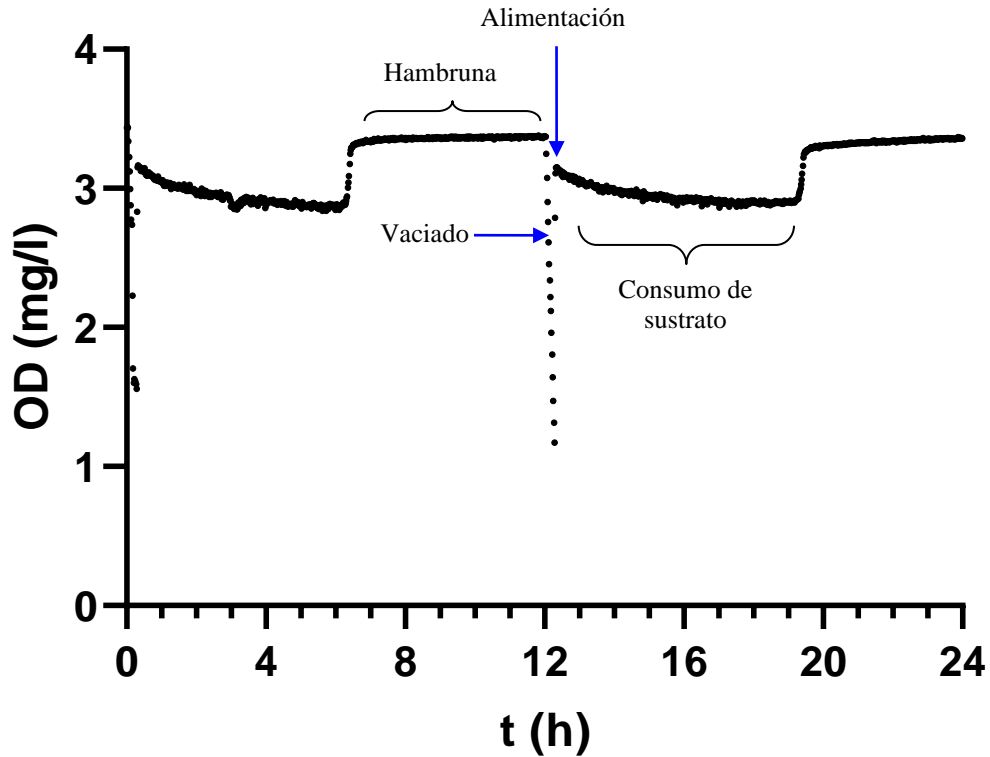


Figura 6.3: Comportamiento observado de la concentración de OD en el reactor SBR (día 110) durante dos ciclos consecutivos.

6.2 Gránulos aerobios

La formación de los gránulos se empezó a observar a partir del quinto día de operación. Los gránulos presentaron un diámetro promedio de 55 μm y en los días subsecuentes se observó un crecimiento paulatino en su diámetro. Sin embargo, el reactor estaba dominado por flóculos los cuales al colocarse en una caja Petri tendían a aglomerarse.

En el día 67 de operación (después de la desintegración de los flóculos) se observaron pequeños gránulos de 66 μm de diámetro, por lo cual se consideró que el proceso de granulación se reinició a partir de esta fecha. Por lo anterior, a continuación presentaremos los resultados observados solo después de esa fecha.

El comportamiento del diámetro de Feret de los gránulos, después del día 67, se presenta en la Figura 6.4. En los primeros 7 días (subsecuentes al día 67) no se apreció un crecimiento en el diámetro de los gránulos, sin embargo, en el día 80 este aumentó a $186 \pm 23 \mu\text{m}$. El mayor aumento se presentó del día 80 al 84 con un incremento del 45 % del tamaño. Después del día 84 se observó un aumento lineal en el diámetro de los gránulos (línea azul en la Figura 6.4). Este incremento paulatino en el diámetro puede deberse a lo mencionado por Liu y Tay (2007), un HRT alto favorece el crecimiento de biomasa libre por lo cual, en lugar de crecer como biomasa inmovilizada esta creció de forma libre.

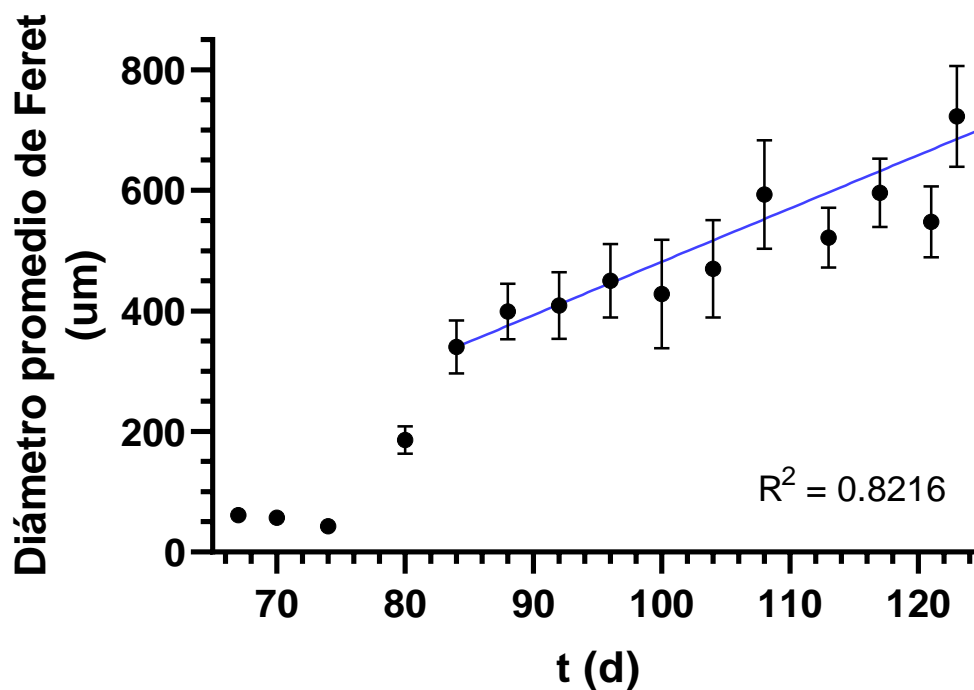


Figura 6.4: Diámetro promedio de Feret de los gránulos durante la operación del SBR del día 67 al 123.

6.3 Respirimetría

La biomasa para los ensayos respirométricos fue tomada antes de finalizar la fase de aireación donde más del 90% del sustrato ya había sido consumido. Las muestras fueron tratadas como se explica en la sección 5.6 hasta el día 104, después de esta fecha las muestras fueron dejadas para que sedimentaran por gravedad y decantar el sobrenadante. Después de decantar el sobrenadante, se realizó una selección manual del tamaño de los gránulos, esto con la finalidad de tener muestras más homogéneas. En los experimentos se usaron 5 concentraciones diferentes y un blanco (sin sustrato), todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado.

La figura 6.5 muestra un ejemplo de perfil de OUR_{ex} observado en el día 96, donde se observó que después de agregar el pulso de sustrato hubo un aumento súbito de OUR_{ex} , seguido por una fase de aumento paulatino, antes de una disminución de OUR_{ex} y su regreso a un valor cercano a cero. Este comportamiento fue reproducible en los pulsos de diferente concentración a excepción del pulso de mayor concentración (45 mg_{DQO}/l , línea azul de la Figura 6.5), donde se observó que el mayor aumento de OUR_{ex} fue antes de empezar a disminuir su valor. Este comportamiento atípico lo atribuimos a un crecimiento de la biomasa durante el experimento. El valor del aumento súbito de OUR_{ex} (después de agregar sustrato exógeno) fue tomado como la velocidad máxima de consumo de oxígeno observado en cada experimento ($OUR'_{ex,max}$, Figura 6.5). Este criterio también fue considerado para el pulso de 45 mg_{DQO}/l , esto con la finalidad de tener una homogeneidad en criterios.

La Figura 6.5A muestra respirogramas típicos observados con gránulos, y la Figura 6.5B muestra los mismos respirogramas con biomasa disgregada. Se observa claramente que la duración de los pulsos con gránulos fue aproximadamente 20 minutos más largo que en el caso de la biomasa disgregada (Figura 6.5B), lo cual es un indicador de la existencia de una resistencia a la

transferencia de masa en gránulos. Lo anterior se corrobora con la diferencia en los valores de $OUR'_{ex,max}$ obtenidos. En efecto, los valores de $OUR'_{ex,max}$ de la biomasa disgregada fueron mayores. Esos resultados concuerdan con lo mencionado por Liu y Tay (2007) indicando que al aumentar el diámetro y densidad de los gránulos se observa un decaimiento en la velocidad de consumo de oxígeno.

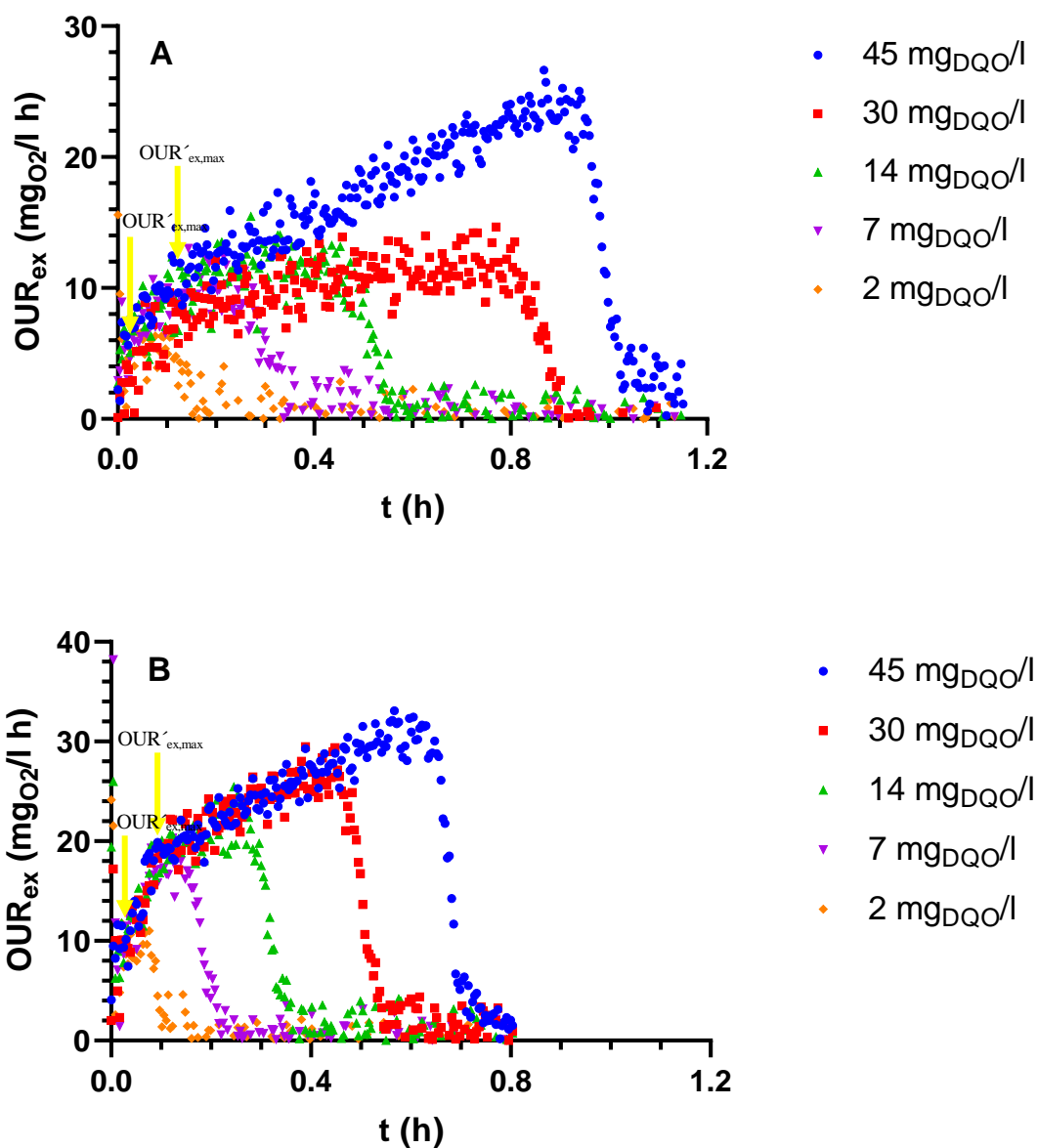


Figura 6.5: Perfil de OUR_{ex} observado en el día 96; (A) con gránulos aerobios de 450 ± 61 μm; (B) con biomasa disgregada, después de la inyección de pulsos de 2 a 45 mg_{DQO}/l.

Los valores promedios de $OUR'_{ex,max}$ fueron utilizados para la linealización de la ecuación de Monod usando Hanes-Woolf y posterior cálculo de los parámetros cinéticos y estequiométricos aparentes e intrínsecos. Este método ha sido usado por diferentes autores (Ramírez-Vargas *et al.*, 2013; Esquivel-Rios *et al.*, 2013), los cuales reportan su utilidad y simplicidad. La Figura 6.6 presenta la linealización del experimento del día 117 de gránulos y biomasa disgregada, donde se observa un buen ajuste ($R^2=0.9999$ y $R^2=0.9994$) al modelo por lo cual se valida el uso del método. En general, todos los ajustes fueron buenos presentando R^2 mayores a 0.90, con lo cual se demuestra la bondad del método usado y la confiabilidad en los parámetros calculados a partir de este.

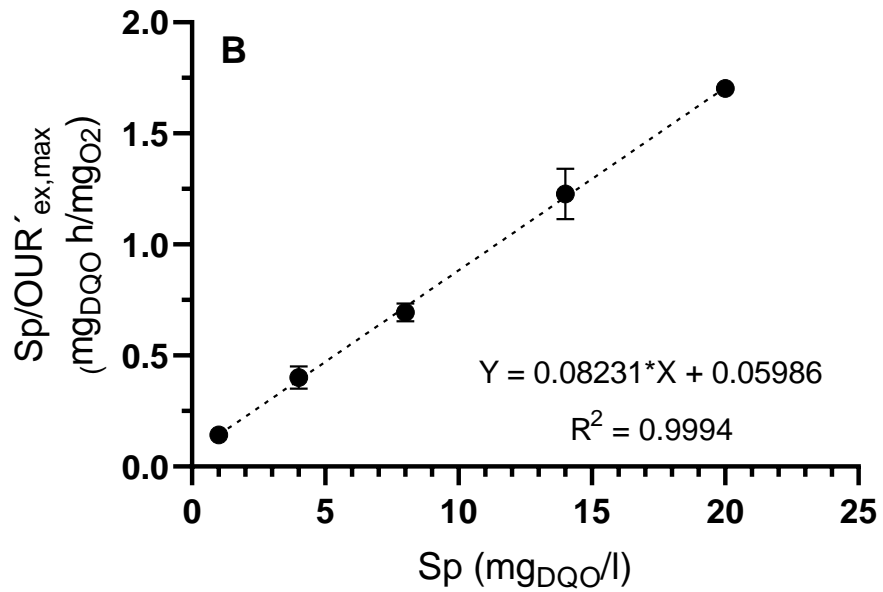
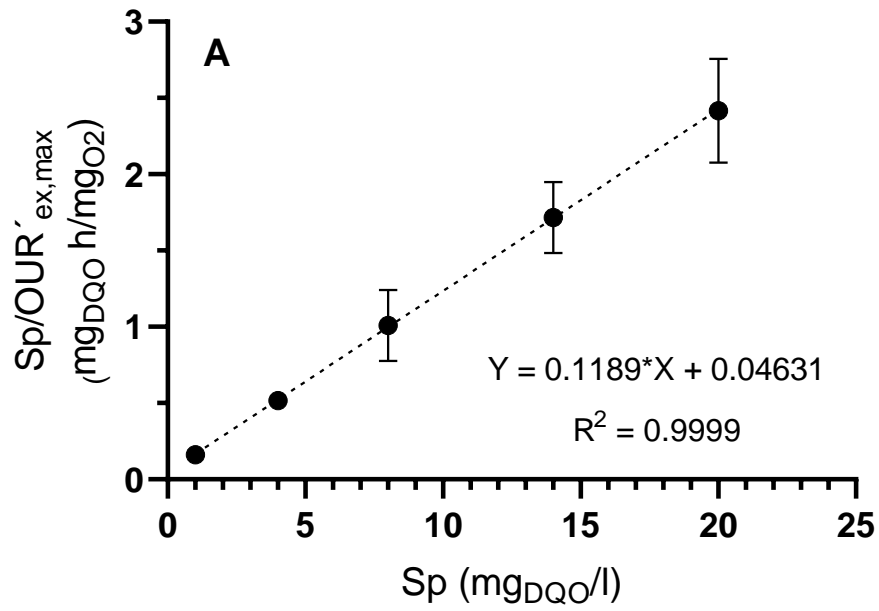


Figura 6.6 Ejemplo de linealización de Hanes-Woolf de los experimentos del día 117; (A) con gránulos aerobios de $596 \pm 57 \mu\text{m}$; (B) con biomasa disgregada.

La Figura 6.7 presenta los valores de OUR_{\max} específico (OUR^*_{\max}) de los experimentos llevados a cabo de las muestras granuladas y disgregadas. Para corroborar si existía diferencia significativa entre los parámetros aparentes e intrínsecos calculados se usó una prueba t de student de dos muestras con un $\alpha=0.05$. Los datos fueron analizados en el software Real Statistics Resource Pack. Los pares de datos que presentaron diferencias significativas se marcaron con un asterisco (*). La Figura 6.7A muestra que solamente tres experimentos que corresponden a los días 88, 113 y 123 no presentaron diferencias significativas entre biomasa granular y disgregada (los valores de OUR^*_{\max} de gránulos y biomasa disgregada fueron muy cercanos). El comportamiento obtenido puede deberse a que la biomasa interna de los gránulos estaba inactiva y solo la de la superficie se encontraba activa (Log *et al.*, 2015). Por lo cual, al desintegrar los gránulos y llevar a cabo los experimentos se observaron los mismos resultados. Según Zhou y colaboradores (2014) las limitaciones en la transferencia de masa en gránulos maduros causan estructuras heterogéneas dominadas por microorganismo muertos en las capas internas lo que ocasiona su posterior ruptura. Asimismo, las limitaciones en la transferencia de oxígeno y sustrato ocasionan que las células localizadas en el núcleo del granulo empiecen a consumir los exopolisacáridos produciendo su desestabilización y posterior ruptura (Li *et al.*, 2008; Gobi *et al.*, 2015).

Por lo anterior Zhou y colaboradores (2014), proponen que el mecanismo de granulación es un equilibrio entre agregaciones nuevas y ruptura de gránulos, encontrando experimentalmente que los fragmentos de los gránulos eran usados como núcleos para nuevas formaciones. Por lo cual suponemos que el comportamiento observado en los valores de OUR^*_{\max} se debe a que la biomasa dentro del reactor estaba dominada por gránulos maduros o gránulos jóvenes según el día. Por ejemplo, el día 80 se observó una mayor diferencia entre los OUR^*_{\max} por tanto, creemos que el reactor estaba dominado por gránulos jóvenes.

La Figura 6.7B muestra el comportamiento del OUR^*_{max} en función del tiempo. En la Figura se aprecia que, aunque hubo un crecimiento en el diámetro de los gránulos, los valores de OUR^*_{max} oscilaron sin ninguna tendencia. Este comportamiento nos ayuda a reafirmar la hipótesis de la heterogeneidad en la estructura de los gránulos. Por esta razón, el valor de $OUR^*_{ex,max}$ no puede ser predecible.

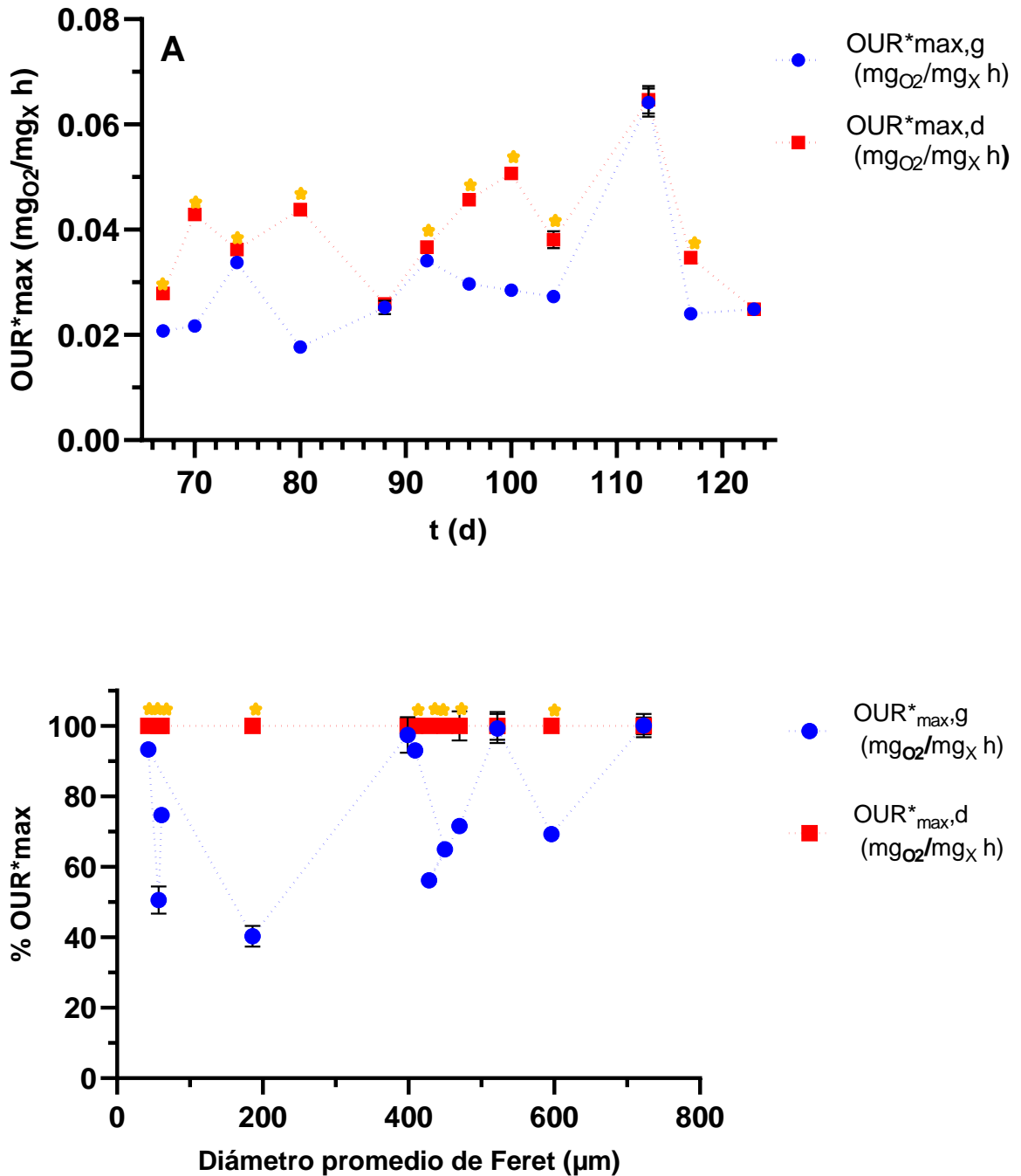


Figura 6.7 Valores de $OUR^*_{ex,max}$ aparentes e intrínsecos obtenidos en la experimentación; (A) $OUR^*_{ex,max}$ en función del tiempo; (B) % $OUR^*_{ex,max}$ en función del diámetro promedio de Feret. Los datos marcados con * indican diferencia significativa entre los parámetros ($p < 0.05$).

La Figura 6.8 muestra el resto de los parámetros aparentes e intrínsecos (μ_{\max} , K_s , $Y_{X/S}$) obtenidos durante la operación del SBR. En la Figura 6.8A se observa que el valor de μ_{\max} de los gránulos al aumentar su diámetro (de $43 \pm 10 \mu\text{m}$ a $186 \pm 23 \mu\text{m}$) disminuyó de $0.0434 \pm 0.0052 \text{ h}^{-1}$ a $0.0329 \pm 0.0032 \text{ h}^{-1}$. Este comportamiento se observó hasta un diámetro de $470 \pm 81 \mu\text{m}$. En general, se obtuvieron valores menores de μ_{\max} de los gránulos comparados con la biomasa disgregada, estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente (Beun et al., 2002; Vital-Jacome et al., 2016). Según Beun y colaboradores (2002) las bacterias con un lento crecimiento celular se ven forzadas a crecer en forma granular, por lo cual el comportamiento encontrado es típico en estos sistemas.

Los valores de K_s (Figura 6.8B) fueron erráticos y con una desviación estándar grande. Esos resultados pueden deberse a que este parámetro es muy sensible y al error relativo existente en su determinación. En el trabajo realizado por Ramírez-Vargas y colaboradores (2013) se reportan valores de K_s estimados a partir de diferentes métodos (1.15 ± 0.19 con pulsos de concentración creciente y 0.53 ± 0.282 con ajuste a modelo) en el cual se aprecia que el valor obtenido es muy variado y depende del método utilizado.

La Figura 6.8C muestra que el valor de $Y_{X/S}$ de los gránulos sufrió un decaimiento después del día 80, cuando presentaban un diámetro $>186 \mu\text{m}$. En general los valores aparentes e intrínsecos presentaron una pequeña diferencia significativa con una tendencia a valores mayores en los gránulos, el mismo comportamiento fue reportado por Vital-Jacome y colaboradores (2016). Estos resultados pueden deberse a la producción de exopolisacáridos o material de reserva (Li et al., 2008), lo cual ocasiona una oxidación incompleta del sustrato resultando en valores bajos de $Y_{O_2/S}$ y por ende valores de $Y_{X/S}$ altos. En general, la variación en los parámetros cinéticos y

estequiométricos obtenidos se debe a la actividad biológica de los gránulos en el día de la experimentación, así como a sus distintas características estructurales (Chiu *et al.*, 2006).

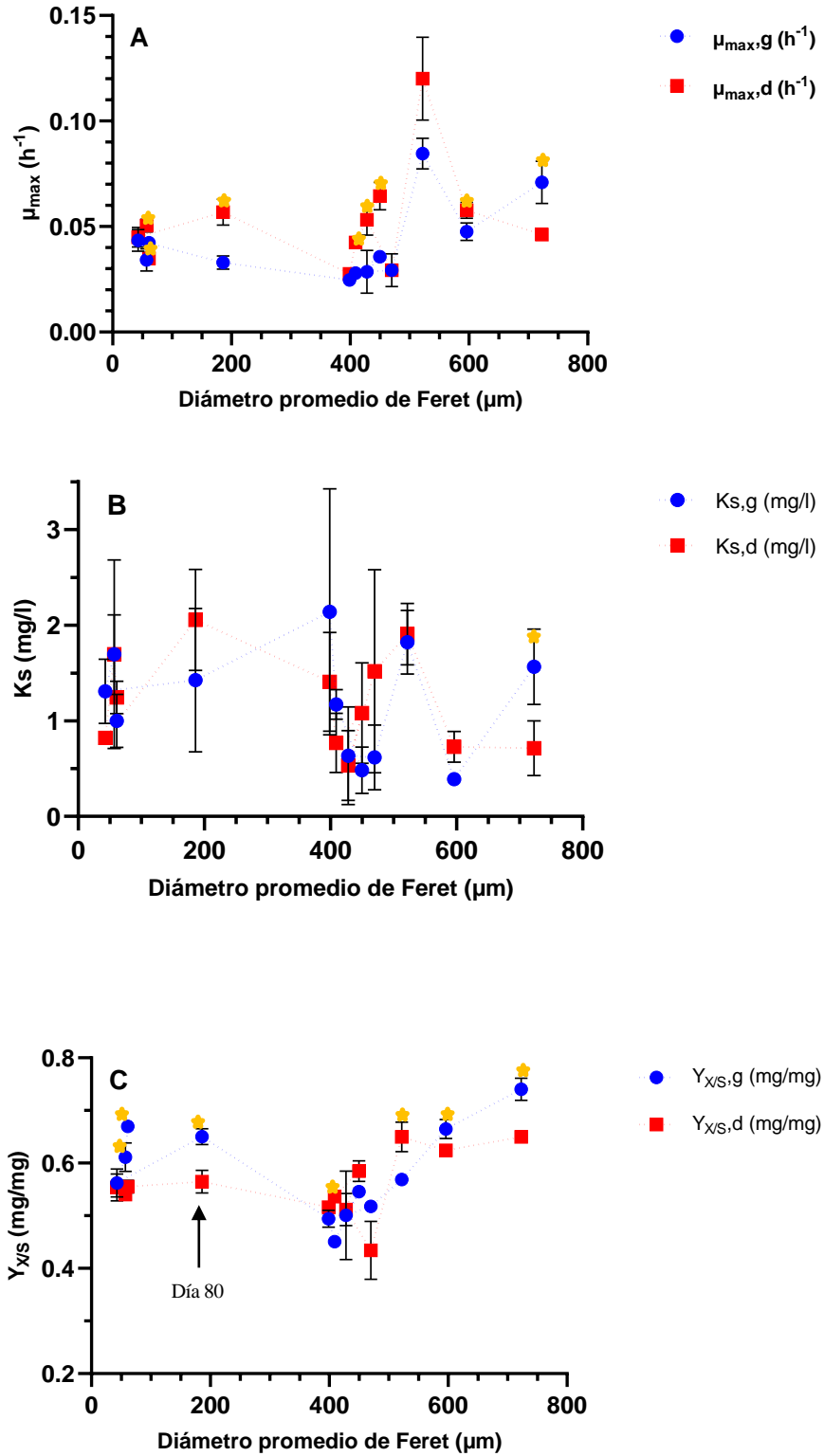


Figura 6.8 Parámetros cinéticos aparentes e intrínsecos obtenidos en la experimentación. (A) μ_{\max} ; (B) K_s ; (C) $Y_{X/S}$. Los datos marcados con * indican diferencia significativa entre los parámetros ($p < 0.05$).

6.4 Factor de efectividad

El factor de efectividad fue calculado de acuerdo con la ecuación 9. La Figura 6.9 muestra los valores obtenidos del factor de efectividad de los pulsos de 14 mgDQO/l. En esta figura se observa que los valores de η varían de 0.4 a 0.99 sin ninguna tendencia en relación al diámetro de los gránulos, esta oscilación en los valores se atribuye a los cambios estructurales y conformacionales que existían en los gránulos según su edad (gránulos maduros o gránulos jóvenes), por lo cual, en días como el 113 se obtuvieron valores de $\eta=0.99$ indicándonos que la resistencia a la transferencia de masa era nula, ya que los microorganismos del interior estaban inactivos y el consumo de sustrato solo se llevaba a cabo por los microorganismos de la superficie.

Los valores encontrados en este estudio discrepan de los reportados por Li y Liu (2005). Los autores llevaron a cabo una simulación matemática en la cual encontraron que en gránulos menores a 400 μm no existía resistencia a la transferencia de masa. Nosotros obtuvimos el valor más bajo de η (0.40) en gránulos de 186 μm .

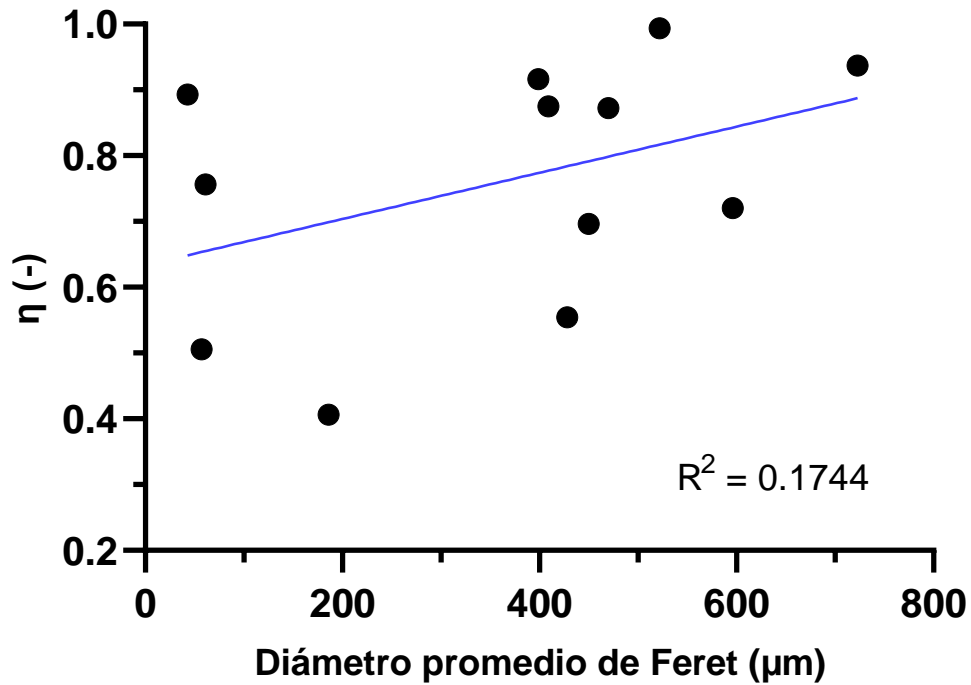


Figura 6.9 Valores de η encontrados a lo largo de la operación del SBR. Experimentos realizados con pulsos de sustrato de 14 mgDQO/l.

En la Figura 6.10 se graficaron valores de η obtenidos en ciertos días contra la concentración del pulso inyectado. En la gráfica se observó una tendencia entre la concentración del sustrato y el valor de η . Entre mayor era la concentración de sustrato menor el valor del factor de efectividad obtenido. Este comportamiento reafirma la existencia de limitaciones en la transferencia de masa, es decir, entre mayor sustrato disponible hay en el medio mayor es el tiempo de consumo. Comportamientos similares fueron reportados por Chou y colaboradores (2011) donde presentan valores de η decrecientes al aumentar el valor de la carga orgánica.

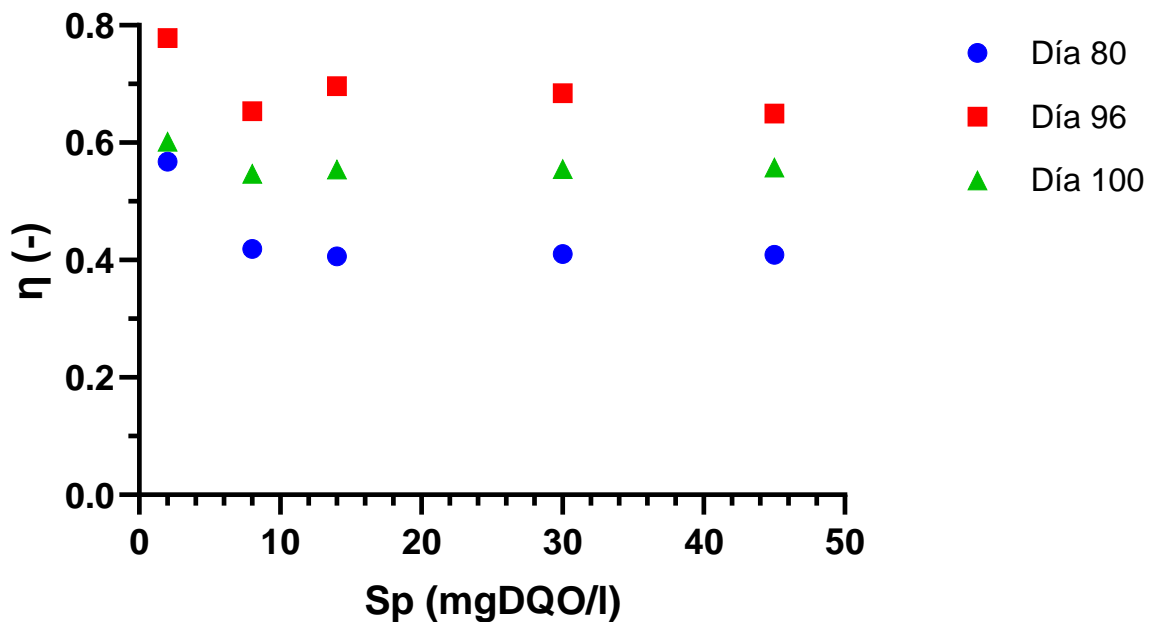


Figura 6.10 Valores de η encontrados con diferentes concentraciones de sustrato en diferentes días (80, 96 y 100).

En general, los resultados anteriores demuestran que el reactor fue operado con éxito durante 123 días. El método respirométrico fue bueno con desviaciones estándar aceptables entre réplicas, así como la linealización usada para el cálculo de los parámetros cinéticos. A pesar de esto, los gránulos presentaron un comportamiento errático el cual atribuimos a su dinámica estructural y conformacional. Esta dinámica se vio reflejada en los parámetros cinéticos y estequiométricos obtenidos a lo largo del experimento, razón por la cual no se observó ninguna tendencia en el factor de efectividad.

7 Conclusiones

Los parámetros cinéticos y estequiométricos aparentes e intrínsecos de gránulos aerobios de

diferentes geometrías y tamaños fueron calculados exitosamente mediante microrespirometría. La diferencia entre los respirogramas obtenidos de gránulos y biomasa disgregada nos confirman la existencia de resistencia a la transferencia de masa. Sin embargo, en ciertos días de operación del reactor esta diferencia no fue observada. Este comportamiento lo atribuimos a las diferencias estructurales y conformacionales que pueden sufrir los gránulos a lo largo del tiempo.

Los valores encontrados de η , OUR_{max} , μ_{max} , $Y_{X/S}$ y K_s durante la experimentación nos sugieren un comportamiento impredecible en la dinámica de los gránulos con fluctuaciones importantes en su estructura.

8 Bibliografia

- Adav S. Sunil, Lee Duu-Jong, Show Kuan-Yeow, Tay Joo-Hwa. (2008). Aerobic granular sludge: Recent advances. *Biotechnology advances* 26: 411-423.
- APHA. (1999). *Standar methods for examination of water and wastewater (20th Editi.)*. Washington: American Public Health Association American Water Works Association.
- Arrojo B., Mosquera-Corral A., Garrido J. M., Mendez R. (2004). Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors, *Water Res.* 38: 3389–3399.
- Badino, A. (2000). Improving KLa determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 75: 469–474
- Betts J., Baganz F. (2006). Miniature bioreactors: current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories* 5:21
- Beun J. J., Hendriks A., Van Loosdrecht M. C. M., Morgenroth E., Wilderer P. A., Heijnen J. J. (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Wat. Res.* 33(10): 2283-2290
- Beun J. J., Hendriks A., Van Loosdrecht M., Morgenroth E., Wilderer P., Heijnen J. (1998). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Wat. Res.* 33: 2283 -2290.
- Beun J. J., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J. J. (2002). Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research* 36: 702–712.
- Bishop P. L., Gibbs J. T., Cunningham B. E. (1997). Relationship between concentration and hydrodynamic boundary layers over biofilms. *Environmental Technology*, 18(4): 375-385.
- Chiu Z. C., Chen M. Y., Lee D. J., Tay S. T.-L., Tay J. H., Show K. Y. (2006). Diffusivity of Oxygen in Aerobic Granules. *Biotechnology and Bioengineering* 94.
- Chou Hsin-Hsien, Huang Ju-Sheng, Tsao Chun-Wen, Lu Yen-Chun. (2011). Comparative influential effects of mass transfer resistance in acetate-fed and glucose-fed sequential aerobic sludge blanket reactors. *Chemical Engineering Journal* 174: 182– 189
- Dahalan F., Abdullah N., Yuzir A., Olsson G., Salmiati, Hamzah M., Mohd Din M. F., Siti Aqlima Ahmad, Khalil K. A., Anuar A. N., Zainon Noor Z., Ujang Z. (2015). A proposed aerobic granules size development scheme for aerobic granulation process. *Bioresource Technology* 181: 291–296
- Esquivel-Rios I., Ramirez-Vargas R., Hernandez-martinez G., Vital-Jacome M., Ordaz A., Thalasso F. (2014). A microrespirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic cultures. *Biochemical engineering journal* 83: 70– 78.
- Gobi K., Vadiveu V. M. (2015). Dynamics of polyhydroxyalkanoate accumulation in aerobic granules during the growth-disintegration cycle. *Bioresource Technology* 196: 731-735

- Isett K., George H., Herber W., Amanullah A. (2007). Twenty-Four-Well Plate Miniature Bioreactor High-Throughput System: Assessment for Microbial Cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(5)
- Kong Z, Vanrolleghem P, Verstraete W. 1994. Automated respiration inhibition-kinetics analysis (ARIKA) with a respirographic biosensor. *Water Sci Technol* 30(4): 275–284.
- Kong Z., Vanrolleghem P., Willems P., Verstraete W. (1996) Simultaneous determination of inhibition kinetics of carbon oxidation and nitrification with a respirometer. *Water Res.* 30: 825-836
- Lee Duu-Jong, Chen Yu-You, Kuan-Yeow Show, Whiteley C., Joo-Hwa Tay. (2010). Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation. *Biotechnology Advances* 28: 919–934
- Li Y., Liu Y., Shen L., Chen F. (2008). DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications. *Enzyme and Microbial Technology* 43: 349–354
- Li Y., Liu Yu. (2005). Diffusion of substrate and oxygen in aerobic granule. *Biochemical Engineering Journal* 27: 45–52
- Li Z. H., Kuba T., Kusuda T. (2006). Aerobic granular sludge: a promising technology for decentralised wastewater treatment. *Water Science & Technology* 53(9): 79–85
- Liu Li, Sheng Guo-Ping, Liu Z., Li W., Zeng R., Lee D., Liu J., Yu H. (2010). Characterization of multiporous structure and oxygen transfer inside aerobic granules with the percolation model. *Environ. Sci. Technol.* 44: 8535-8540
- Liu Y. Q., Liu Y., Tay J. H. (2005). Relationship between size and mass transfer resistance in aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology* 40: 312–315
- Liu Y. Q., Tay J. H. (2007). Influence of cycle time on kinetic behaviors of steady-state aerobic granules in sequencing batch reactors. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 516–522
- Liu Yu, Tay Joo-Hwa. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water research* 36: 1653-1665.
- Liu Yu, Tay Joo-Hwa. (2004). State of art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology advances* 22: 533-563.
- Liu Yu. (2006). Mechanisms of aerobic granulation. *Waste Management Series* 6: 85-98.
- Log Bei, Yang Chang-zu, Pu Wen-hong, Yang Jia-kuan, Liu Fu-biao, Zhang Li, Zhang Jing, Cheng Kai. (2015). Tolerance to organic rate by aerobic granular sludge in a cyclic aerobic granular reactor. *Bioresource Technology* 182: 314-322.
- Melo, L. F. (2005). Biofilm physical structure, internal diffusivity and tortuosity. *Water Science and Technology*, 52(7): 77–84.
- Oliveira, C., Ordaz, A., and Alba, J. (2009). Determination of kinetic and stoichiometric parameters of *Pseudomonas putida* F1 by chemostat and in situ pulse respirometry. *Chemical Product and Process Modeling*, 4(2): 1–14.

- Ordaz, A., Oliveira, C. S., Aguilar, R., Carrión, M., Ferreira, E. C., Alves, M., and Thalasso, F. (2008). Kinetic and stoichiometric parameters estimation in a nitrifying bubble column through “in-situ” pulse respirometry. *Biotechnology and bioengineering*, 100(1): 94–102.
- Ordaz, A., Ramirez R., Hernández-Martinez G., Carrión, M., Thalasso, F. (2019). Characterization of kinetic parameters and mass transfer resistance in an aerobic fixed-bed reactor by in-situ respirometry. *Biochemical Engineering Journal* 146: 194–202.
- Ramirez-Vargas R., Ordaz A., Carrión M., Hernández-Paniagua I. Y., Thalasso F. (2013). Comparison of static and dynamic respirometry for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of a nitrifying process. *Biodegradation* 24: 675–684.
- Ramirez-Vargas R., Vital-Jacome M., Camacho-Perez E., Hubbard L., Thalasso F. (2014). Characterization of oxygen transfer in 24-well microbioreactor system and potential respirometric applications. *Journal of Biotechnology* 186: 58-65.
- Riefler R. G., Ahlfeld D. P., Smets B. F. (1997). Respirometric Assay for Biofilm Kinetics Estimation: Parameter Identifiability and Retrievalability. *Biotechnology and bioengineering* 57
- Rittmann B. E., Pettis M., Reeves H. W., Stahl D. A. (1999). How biofilm clusters affect substrate flux and ecological selection. *Wat Sci Tech* 39(7): 99-105
- Sarma Jyoti S., Tay Hwa Joo, Chu Angus. (2017). Finding knowledge gaps in aerobic granulation technology. *Trends in Biotechnology* 35(1): 66-78
- Spanjers H., Vanrolleghem P. (1995) Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Wat Sci. Tech* 31: 105-114
- Spanjers H., Vanrolleghem P., Olsson G., Dold P. (1996) Respirometry in control of the activated sludge process. *Wat Sci. Tech* 34: 117-126
- Spanjers, H, Takacs, I., and Brouwer, H. (1999). Direct parameter extraction from respirograms for wastewater and biomass characterization. *Water Science and Technology*, 39(4): 137–145
- Tay j. H., Liu Q. S., Liu Y. (2002) Characteristics of Aerobic Granules Grown on Glucose and Acetate in Sequential Aerobic sludge Blanket Reactors. *Envioremental Technology* 23: 931-936
- Toh S. K., Tay J. H, Moy B y P., Ivanov V., Tay S. T. L. (2003). Size-effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 687–695.
- Vanrolleghem P., Sin G., Gernaey V. (2004) Transient Response of Aerobic and Anoxic Activated Sludge Activities to Sudden Substrate Concentration Changes. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 277-290.
- Vanrolleghem P., Spanjers H. (1998). A hybrid respirometric method for more reliable assessment of active sludge model parameter. *Wat Sci. Tech* 37: 237-246
- Vital-Jacome M. (2017). Aplicaciones de la microrrespirometría para la caracterización de bioprocesos. Tesis de doctorado, Departamento De Biotecnología CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México.

Vital-Jacome M., Buitrón G., Moreno-Andrade I., Garcia-Rea V., Thalasso F. (2016) Microrespirometric determination of the effectiveness factor and biodegradation kinetics of aerobic granules degrading 4-chlorophenol as the sole carbon source. *Journal of Hazardous Materials* 313: 112–121.

Walton W. H. (1948). Feret's statistical diameter as a measure of particle size. *Nature* 162: 329–330.

Wolfbeis Otto S. (2015). Luminescent sensing and imaging of oxygen: Fierce competition to the Clark electrode. *Bioessays* 37: 921–928

Zhang Quanguo, Hu Jianjun, Lee Duu-Jong. (2016). Aerobic granular processes: Current research trends. *Bioresource technology* 210: 74-80.

Zhou D., Niu S., Xiong Y., Yang Y., Dong S. (2014). Microbial selection pressure is not a prerequisite for granulation: Dynamic granulation and microbial community study in a complete mixing bioreactor. *Bioresource Technology* 161: 10

