



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

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Determinación de los parámetros cinéticos y
estequiométricos en biopelículas por respirometría *in situ***

Tesis que presenta

Enya Verónica Huerta Martínez

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Dr. Frédéric Thalasso**

Dr. Alberto Ordaz Cortés

CIUDAD DE MÉXICO.

FEBRERO 2021

Comité de Tesis

Directores de Tesis

Dr. Frédéric Thalasso Siret (Cinvestav-IPN, CDMX)

Dr. Alberto Ordaz Cortés (Universidad Mexiquense del Bicentenario, Tultitlán)

Asesores

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera (Cinvestav-IPN, CDMX)

Dr. Luc Dendooven (Cinvestav-IPN, CDMX)

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría que me fue otorgada.

Al Dr. Thalasso por su dirección y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Ordaz por su valiosas guía, consejos y enseñanzas.

A la M.C. Victoria Velázquez y al IBQ. Juan Corona por su asistencia técnica.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica del Área Biológica de LaNSE, en especial a la Biol. Ma. De Lourdes Rojas Morales por su colaboración en el desarrollo de la Microscopía Electrónica de Barrido de la biopelícula.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Janeth García, Daniel Luna, Estefani Mendoza y Maximiliano Pérez por su amistad.

Dedicatoria

A mis padres, por su infinito amor y apoyo incondicional.

Índice

Índice de Tablas y Figuras	i
Abreviaturas	iii
Resumen.....	1
Summary	3
1. Introducción.....	4
2. Justificación.....	7
3. Objetivos.	8
3.1. Objetivo general.....	8
3.2. Objetivos específicos.....	8
4. Materiales y métodos.	9
4.1. Estrategia experimental.	9
4.2. Configuración del reactor de biopelícula airlift.	10
4.3. Caracterización hidrodinámica del reactor.....	12
4.4 Sistema de microreactores.	13
4.5. Procedimientos analíticos.....	14
4.5.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO).	14
4.5.2 Peso fresco de la biopelícula.	14
4.6. Microscopía de la biopelícula.....	14
4.7. Métodos respirométricos y estimación de parámetros.....	14
4.7.1 Respirometría de pulso de sustrato en el reactor de biopelícula.....	14
4.7.2. Respirometría con pulsos de concentración creciente en los microreactores.	16
4.8. Factor de efectividad (η).....	18

4.9 Estimación de error y método estadístico.....	20
5. Resultados y Discusión.....	21
5.1 Caracterización hidrodinámica del reactor.....	21
5.2 Caracterización del reactor de biopelícula.....	22
5.2.1 Crecimiento de la biopelícula.....	24
5.2.2 MEB de la biopelícula.....	25
5.3 Respirimetría de la biopelícula y biomasa desagregada	25
5.3.1 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la biopelícula.....	27
5.3.2 Factor de efectividad.....	30
6. Conclusiones.....	33
7. Recomendaciones.....	35
8. Bibliografía.....	36

Índice de Tablas y Figuras

- Tabla 1. Estrategia experimental con biopelícula y biomasa desagregada.
- Tabla 2. Cronología de los experimentos respirométricos.
- Tabla 3. Matriz simplificada de ASM1.
- Tabla 4. Relación de velocidades U_{GR} , U_{LD} y Reynolds.
- Tabla 5. Peso fresco de la biopelícula.
- Tabla 6. Concentración de biomasa en el reactor y microreactores.
- Tabla 7. Parámetros estequiométricos y cinéticos de la biomasa desagregada.
- Tabla 8. Parámetros estequiométricos y cinéticos de la biopelícula (U_{GR} 0.55 cm s⁻¹).
- Tabla 9. Parámetros estequiométricos y cinéticos de la biopelícula (U_{GR} 0.73 cm s⁻¹).
- Tabla 10. Parámetros estequiométricos y cinéticos de la biopelícula (U_{GR} 1.47 cm s⁻¹).
- Tabla 11. Factor de efectividad.
- Figura 1. Etapas de la formación de la biopelícula.
- Figura 2. Reactor airlift empacado con placas cerámicas
- Figura 3. Arreglo sistema microreactores.
- Figura 4. Regresión lineal de Hannes-Woolf.
- Figura 5. Perfiles de oxígeno observados (A) en el reactor de biopelícula, (B) en el arreglo de microreactores con biomasa desagregada, durante el desarrollo experimental para determinación del K_{La} .
- Figura 6. Contaminación fúngica en el reactor.
- Figura 7. Micrografías de la biopelícula microbiana creciente sobre placas cerámicas como soporte: 25kV, (A) $\times 5,000$

magnificación, bar = $8 \mu m$; (B) $\times 10,000$ magnificación, bar = $1 \mu m$.

Figura 8 Perfiles de oxígeno observados después de la inyección de pulsos de acetato de sodio (A) en el reactor de biopelícula, (B) en el arreglo de microreactores con biomasa desagregada.

Figura 9 r_{O_2} máximo observado (A) de la biopelícula, (B) de la biomasa desagregada.

Abreviaturas

ASM1	Modelo de lodos activados	
C_b	Concentración de oxígeno disuelto de línea base	(mg O ₂ L ⁻¹)
C_0	Concentración inicial de oxígeno disuelto	(mg O ₂ L ⁻¹)
C_f	Concentración final de oxígeno disuelto	(mg O ₂ L ⁻¹)
C^*	Concentración de oxígeno disuelto en la saturación	(mg O ₂ L ⁻¹)
CSTR	Reactor Continuo de Tanque Agitado	
d_e	Diámetro externo	(cm)
d_f	Diámetro equivalente de la sección descendente	(cm)
d_i	Diámetro interno	(cm)
DQO	Demanda Química de Oxígeno	(mg DQO L ⁻¹)
K_{La}	Coficiente volumétrico de transferencia de masa	(h ⁻¹)
K_s	Constante de afinidad del sustrato	(mg DQO-S L ⁻¹)
MEB	Microscopía electrónica de barrido	
OUR	Tasa de consumo de oxígeno exógeno	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
OUR _{max}	Tasa máxima de consumo de oxígeno exógeno	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
OUR' _{max}	Tasa máxima de consumo de oxígeno exógeno observado	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
OUR' _e	Tasa máxima de consumo de oxígeno exógeno, observada con biopelícula	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
OUR' _i	Tasa máxima de consumo de oxígeno exógeno, observada sin biopelícula	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)

OD	Oxígeno disuelto	(mg O ₂ L ⁻¹)
pH _i	pH inicial	(-)
pH _f	pH final	(-)
r _{O2}	OUR en términos de biomasa	(mg O ₂ mg DQO-X ⁻¹ h ⁻¹)
r _{O2 max}	OUR _{max} en términos de biomasa	(mg O ₂ mg DQO-X ⁻¹ h ⁻¹)
r _{O2' max}	OUR' _{max} en términos de biomasa	(mg O ₂ mg DQO-X ⁻¹ h ⁻¹)
r _{O2'e}	OUR' _e en términos de biomasa	(mg O ₂ mg DQO-X ⁻¹ h ⁻¹)
r _{O2'i}	OUR' _i en términos de biomasa	(mg O ₂ mg DQO-X ⁻¹ h ⁻¹)
Re	Número de Reynolds	(-)
R _e	Resistencia a la transferencia de masa externa	(-)
R _i	Resistencia a la transferencia de masa interna	(-)
R _t	Resistencia a la transferencia de masa total	(-)
S	Sustrato	(mg DQO-S L ⁻¹)
Sp	Concentración del pulso de sustrato inyectado	(mg DQO-S L ⁻¹)
U _{GR}	Velocidad del gas en la sección ascendente	(cm s ⁻¹)
U _{LD}	Velocidad del líquido en la sección descendente	(cm s ⁻¹)
X	Biomasa	(mg DQO-X L ⁻¹)
Y _{O2/S}	Rendimiento de oxidación del sustrato	(mg O ₂ mg DQO-S ⁻¹)
Y _{X/S}	Rendimiento del crecimiento de la biomasa	(mg DQO-X mg DQO-S ⁻¹)
η	Factor de efectividad	(-)
η _e	Factor de efectividad externo	(-)
η _i	Factor de efectividad interno	(-)
μ _{max}	Velocidad específica máxima de crecimiento	(h ⁻¹)
A	Nivel de significancia	(0.05)
φ	Porosidad de los soportes	(1)
ν	Viscosidad cinemática del fluido	(m ² s ⁻¹)

Resumen.

Los bioreactores en los cuales la biomasa microbiana crece sobre un soporte, en forma de biopelícula, son frecuentemente utilizados para el tratamiento de aguas residuales. Esta configuración permite, entre otros, obtener una mayor concentración de biomasa, y por lo tanto una mayor eficiencia de remoción de los contaminantes. Adicionalmente, la presencia de biopelícula permite mejorar la resistencia del sistema ante presencia de compuestos inhibitorios y evita el fenómeno de lavado de biomasa.

El diseño y optimización de sistemas de biopelícula, requiere preferentemente de la caracterización cinética y estequiométrica. Con el objetivo de determinar la constante de afinidad del sustrato (K_s), velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}), coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno (K_La), velocidad máxima de consumo de oxígeno (OUR_{max}), rendimiento de oxidación de sustrato ($Y_{O_2/S}$) y rendimiento de crecimiento de la biomasa ($Y_{X/S}$), se desarrolló un reactor airlift en el cual se integró un soporte cerámico para el crecimiento de la biopelícula. Ese soporte se dispuso en forma de pequeños elementos suspendidos de forma independiente, de tal forma que se pudiera coleccionar uno o varios elementos de dicho soporte para su caracterización. La estrategia experimental consistió en caracterizar la biopelícula en el reactor (con limitaciones de transferencia), y la biomasa muestreada de elementos de soporte, desagregada (para eliminar resistencia de transferencia de masa) en un sistema de microreactores.

En esta tesis el reactor airlift se operó bajo diferentes condiciones de agitación (U_{GR} : 0.55, 0.73 y 1.47 $cm\ s^{-1}$) y se usó respirometría de pulsos para la caracterización de la biomasa. Se utilizó un método de respirometría *in situ* en el reactor airlift y respirometría de pulsos de concentración creciente en el sistema de microreactores con biopelícula desagregada. Por medio del análisis de varianza y la prueba de Tukey, se estudió el efecto del tiempo, método y condiciones de agitación sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos en la biopelícula y biomasa desagregada.

El arreglo experimental y la metodología empleada demostraron tener el potencial de elucidar el complejo proceso biológico y fisicoquímico de los sistemas de

biopelícula; proporcionando datos de alto rendimiento, menor desviación estándar con un esfuerzo experimental moderado, comparados con la respirometría tradicional.

Summary

Bioreactors in which the microbial biomass grows on a support, in the form of a biofilm, are frequently used for wastewater treatment. This configuration allows, among others, to obtain a higher concentration of biomass, and therefore a greater efficiency of pollutants removal. Additionally, the presence of biofilm improves the resistance of the system to inhibitory compounds and eliminates the phenomenon of biomass washing out.

The design and optimization of biofilm systems preferably requires kinetic and stoichiometric characterization. In order to determine the substrate affinity constant (K_S), maximum specific growth rate (μ_{max}), volumetric oxygen mass transfer coefficient (K_{La}), maximum oxygen consumption rate (OUR_{max}), oxidation performance of substrate ($Y_{O_2/S}$) and biomass growth performance ($Y_{X/S}$), an airlift reactor was developed in which a ceramic support was integrated for the growth of the biofilm. This support was arranged in the form of small elements suspended independently, in such a way that one or more elements of said support could be collected for their characterization. The experimental strategy consisted in characterizing the biofilm in the reactor (with transfer limitations), and the sampled biomass of support elements, disaggregated (to eliminate mass transfer resistance) in a microreactor system.

In this thesis, the airlift reactor was operated under different stirring conditions (UGR: 0.55, 0.73 and 1.47 cm s⁻¹) and pulse respirometry was used for the characterization of the biomass. An in situ respirometry method was used in the airlift reactor and increasing concentration pulse respirometry in the disaggregated biofilm microreactor system. Through the analysis of variance and the Tukey test, the effect of time, method and stirring conditions on the kinetic and stoichiometric parameters in the biofilm and disaggregated biomass was studied.

The experimental setup and the methodology used proved to have the potential to elucidate the complex biological and physicochemical process of biofilm systems; providing high-throughput data, lower standard deviation with moderate experimental effort, compared to traditional respirometry.

1. Introducción.

Las biopelículas son complejas comunidades tridimensionales de microorganismos embebidos en una matriz de exopolisacáridos, adheridos a una superficie (Figura 1). Su presencia está asociada a infecciones, contaminación de alimentos, biocorrosión, bioincrustación, biolixiviación y biorremediación; por lo que su formación es un fenómeno estudiado en el medio natural, clínico e industrial.

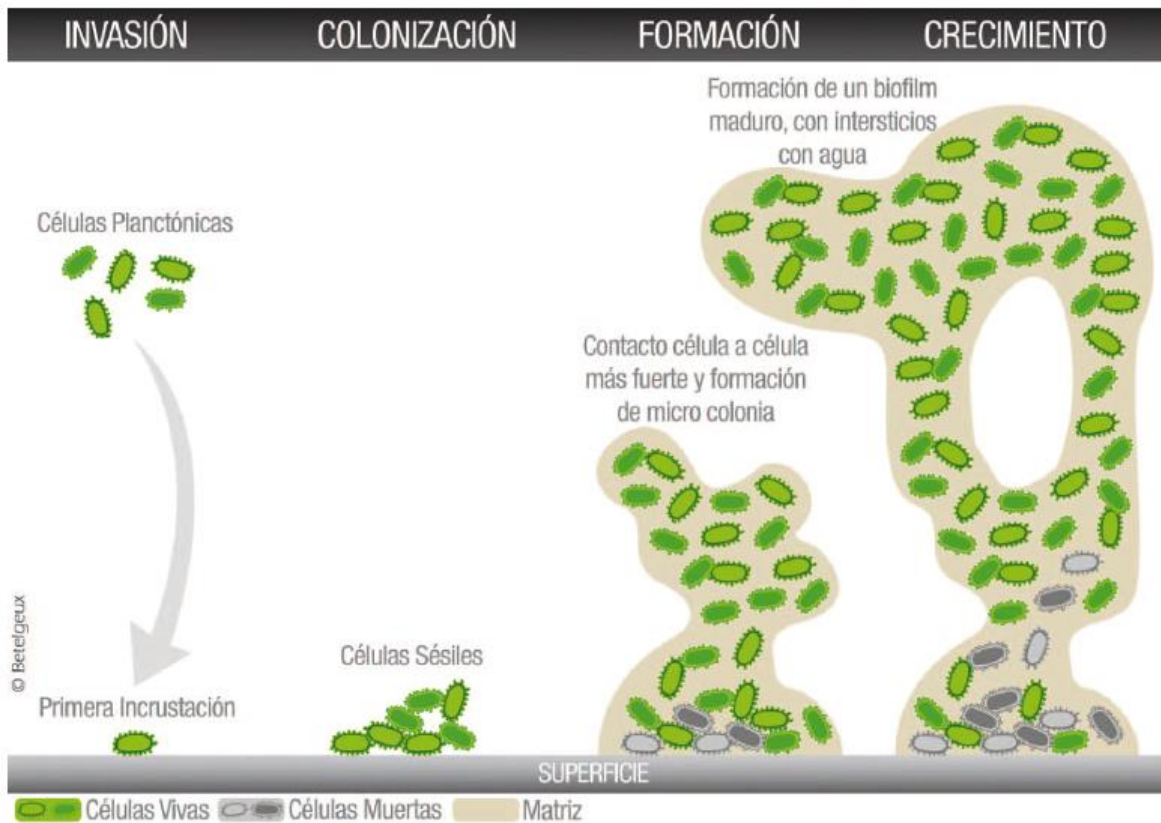


Figura 1. Etapas de la formación de la biopelícula. Fuente: Orihuel (2012).

Específicamente en los procesos de tratamiento de aguas residuales, los sistemas de biopelícula (reactores de lecho fijo, biofiltros y reactores de biopelícula) se consideran benéficos, ya que permiten un mayor tiempo de residencia de la biomasa, resistencia a los cambios ambientales, altas concentraciones de biomasa activa, mayor capacidad para degradar compuestos recalcitrantes, flexibilidad

operativa, bajos requerimientos de espacio, menor tiempo de retención hidráulica, tasa de crecimiento microbiano más lenta y por lo tanto, menor producción de lodos; en comparación con sistemas de biomasa suspendida (Araújo *et al.* 2016; Lazarova y Manem 2000).

Debido a que los procesos basados en biopelículas se controlan tanto por la transferencia de masa como por la cinética de sustrato u oxígeno limitante (Ordaz *et al.* 2019), su diseño y optimización, requiere preferentemente de la estimación de parámetros cinéticos, estequiométricos (Petersen *et al.* 2003).

La respirometría es un método frecuentemente usado para la determinación de dichos parámetros (Guisasola *et al.* 2005, Orupold *et al.* 2002 y Di Trapani *et al.* 2011), este método consiste en la medición indirecta de las tasas de consumo de sustrato mediante el seguimiento de la tasa de consumo de oxígeno exógeno (OUR) en condiciones bien definidas (Spanjers *et al.* 1999).

Diversos autores (Oliveira *et al.* 2009, Ramírez *et al.* 2013 y Esquivel *et al.* 2014) compararon y evaluaron la efectividad entre diferentes métodos respirométricos y técnicas basadas en las mediciones del sustrato limitante, concluyendo que las técnicas respirométricas de pulsos *in situ* requieren de un menor tiempo y esfuerzo experimental, la interpretación de datos experimentales es más sencilla y proporciona datos de alta calidad y confianza.

Las curvas de OUR reflejan la cinética del proceso de biodegradación aerobia permitiendo la estimación de parámetros cinéticos y estequiométricos a través del ajuste directo del modelo a una curva respirométrica, o mediante la técnica de pulsos de concentración creciente.

Es por ello que en este trabajo se plantea el uso respirometría de pulsos *in situ* y el modelo matemático de lodos activados (ASM1), para determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos: constante de afinidad del sustrato (K_s), velocidad máxima específica de crecimiento (μ_{max}), rendimiento de oxidación de sustrato ($Y_{O_2/S}$), rendimiento de crecimiento de la biomasa ($Y_{X/S}$) en un sistema modelo de biopelícula, a través del tiempo, bajo diversas velocidades superficiales del líquido,

dadas por las condiciones de agitación (U_{GR}), de un reactor airlift empacado. A la par, se contempla la toma de muestras de biopelícula, su desagregación y caracterización respirométrica (mismos parámetros que en el reactor de biopelícula) en un sistema de microreactores; método microrespirométrico con pulsos de concentración creciente. Con el fin de comparar entre la caracterización de la biopelícula en el reactor y la biopelícula desagregada, esperando poder determinar los parámetros intrínsecos (propios de los microorganismos) y extrínsecos (propios de la biopelícula) y, adicionalmente, determinar el factor de efectividad.

2. Justificación.

Las biopelículas tienen un papel muy importante en muchas áreas científicas y tecnológicas. Dada su complejidad estructural y dinámica, el diseño y operación de reactores de biopelícula requiere preferentemente de la caracterización cinética y estequiométrica (K_{La} , μ_{max} , K_s , $Y_{O_2/X}$, $Y_{X/S}$, OUR , OUR_{max}) y adicionalmente η para cuantificar la resistencia a la transferencia de masa (R_t) y medir el uso efectivo del espacio en las biopelículas (Y. Q. Liu *et al.* 2005).

Dichos parámetros pueden ser obtenidos de los respirogramas por ajuste al modelo ASM1 (en el reactor de biopelícula) y de los experimentos realizados por la inyección de pulsos de sustrato de concentración creciente (en los microreactores con biomasa desagregada), por ser una metodología adecuada, que permite una interpretación de datos experimentales más simple y resultados de alta confianza.

La metodología combinada de la respirometría de pulsos *in situ* y en microreactores tiene el potencial de elucidar el complejo proceso biológico y fisicoquímico de los sistemas de biopelícula; proporcionando datos de alto rendimiento y menor desviación estándar con un esfuerzo experimental moderado, comparados con la respirometría tradicional.

Adicionalmente, el arreglo experimental y la combinación de metodología propuesta en este proyecto, nunca se han aplicado para la caracterización de reactores de biopelícula.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos a través del tiempo, en un sistema modelo de biopelícula, bajo diferentes condiciones de agitación.

3.2. Objetivos específicos.

Establecer un biorreactor airlift con placas cerámicas discretas como medio de soporte para la fijación y el crecimiento de la biopelícula en su sección descendente, que permita hacer crecer una biopelícula modelo bajo condiciones de velocidad de recirculación del líquido controlables.

Operar el biorreactor airlift bajo condiciones de operación constantes, con un sistema modelo de tratamiento de aguas residuales, utilizando acetato como única fuente de carbono.

Caracterizar la biopelícula y determinar mediante técnicas respirométricas *in situ* sus parámetros cinéticos y estequiométricos, a la par de la determinación de esos mismos parámetros en muestras de biopelícula desagregada proveniente del reactor de biopelícula.

Realizar el análisis de varianza, para determinar si hay diferencias significativas entre los parámetros estimados bajo diferentes metodologías y condiciones de agitación a través del tiempo.

4. Materiales y métodos.

4.1. Estrategia experimental.

Se empleó un reactor airlift empacado con soporte cerámicos en la sección descendente para el crecimiento de la biopelícula. En los días elegidos, se desarrolló la respirometría de pulsos en el reactor; las concentraciones de oxígeno disuelto (OD) de los respirogramas obtenidos fueron modelados en AQUASIM (EAWAG, Suiza), con el fin de determinar los parámetros cinéticos, estequiométricos con limitación en la transferencia de masa. Simultaneo al desarrollo de la respirometría en el reactor (Tabla 1), se estableció un sistema de microreactores (Microflask System, PreSens México), en los que se usó la respirometría de pulsos de concentración creciente y un ajuste a la curva de Hanes-Woolf para determinar los parámetros cinéticos, estequiométricos sin limitación en la transferencia de masa, i. e. en muestras de biopelícula desagregada.

Tabla 1. Estrategia experimental con biopelícula y biomasa desagregada.

Reactor	Biomasa	Método respirométrico	Modelo matemático
Airlift empacado	Biopelícula	De pulso	ASM1
Microreactores	Biomasa desagregada	De pulsos de concentración creciente	Hannes-Woolf

La Tabla 2 muestra la cronología para llevar a cabo simultáneamente experimentos respirométricos en el reactor de biopelícula y los microreactores.

Tabla 2. Cronología de los experimentos respirométricos.

Fecha del experimento	Días de crecimiento de la biopelícula	Procedimiento que se realizó
26/Marzo/2020	17	Respirometría <i>in situ</i> y Microrespirometría

01/Abril/2020	23	Respirometría <i>in situ</i> y Microrespirometría
07/Abril/2020	29	Respirometría <i>in situ</i> y Microrespirometría
13/Abril/2020	35	Respirometría <i>in situ</i> y Microrespirometría

4.2. Configuración del reactor de biopelícula airlift.

Una columna de vidrio (0.122 m de diámetro interno, 0.745 m de altura), con un tubo interno (0.076 m de diámetro interno, 0.378 m de altura) fue usado como reactor airlift (Figura 2). En la sección descendente se establecieron 12 hileras cada una con 5 placas cerámicas (cada placa midió 0.02 m de ancho, 0.04 m de altura y 0.006 m de profundidad y 0.00232 m² de superficie) como soporte para el crecimiento de la biopelícula. El volumen de trabajo del reactor empacado fue de 4 L. El reactor fue diseñado con el propósito de mantener constante el nivel y la velocidad superficial de líquido, sin que burbujas de aire afecten el crecimiento de la biopelícula (desprendimiento).

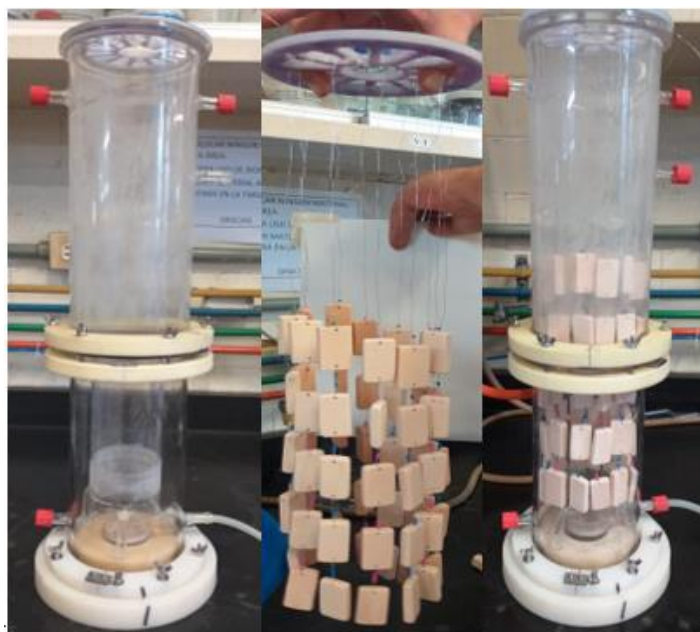


Figura 2. Reactor airlift empacado con placas cerámicas.

El reactor fue inoculado con 1 L de efluente de un reactor aerobio de gránulos y 3 L de agua residual sintética que contenían 0.36 g L^{-1} de acetato de sodio (CH_3COONa) como única fuente de carbono. La composición del agua residual sintética fue (g L^{-1}): KH_2PO_4 (0.0255), K_2HPO_4 (0.0326), $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0754), NH_4Cl (0.11), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.00867), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.0364), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.00025), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.00003539), H_3BO_4 (0.0000572), ZnCl_2 (0.0000203), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ (0.0000347) y EDTA (0.0000555).

La operación del biorreactor se inició por lotes durante 24 h con aireación, previo a la operación en continuo del reactor. Durante la operación en continuo del reactor se alimentó, por medio de una bomba peristáltica (Masterflex Cole Palmer, Modelo 7554), un caudal constante de aguas residuales sintéticas a 1.8 L h^{-1} que corresponde a una tasa de dilución de 0.045 h^{-1} . La aireación se suministró a un caudal de 1 vvm, a través de dos difusores cerámicos colocados en la parte inferior del reactor. El pH se mantuvo a 7.8 ± 0.8 con la adición de H_3PO_4 1M. El reactor se mantuvo a temperatura ambiente $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. El oxígeno disuelto se monitoreo a través de un medidor de oxígeno de fibra óptica (OXY-1 SMA Trace, PreSens Precision Sensing GmbH) para usar con parches (Oxygen Sensor Spots PSt3, PreSens

Precision Sensing GmbH), usando el software PreSens Measurement Studio (PMS2, PreSens Precision Sensing GmbH) para calibración del sensor y la adquisición de datos.

4.3. Caracterización hidrodinámica del reactor.

Previo a la inoculación, el reactor empacado se caracterizó hidrodinámicamente, mediante la velocidad lineal del líquido en la sección descendente (U_{LD}), a valores de velocidad de aireación en la sección ascendente (U_{GR}) de 0.55, 0.73, 1.47 y 2.2 cm s^{-1} . La U_{LD} se determinó por quintuplicado con una técnica de video; se añadió al reactor 5 mL de una solución de fenolftaleína al 1%. El pH se ajustó a 7, luego, se inyectó un pulso de NaOH 1M en la parte superior de la sección descendente, lo que provocó el viraje de color de la fenolftaleína, de incoloro a violeta. La cámara de video siguió el cambio de color durante el descenso del líquido y la U_{LD} se determinó a partir del análisis de las imágenes.

Se determinó el número de Reynolds (Re) en la sección descendente de acuerdo con la ecuación (1), donde ν es la viscosidad cinemática del fluido ($0.897 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ a 25° C , (Geankoplis, 2003) y df es el diámetro equivalente de la sección descendente, determinado a partir de los diámetros interno y externo de la sección descendente, di y de , respectivamente, y asumiendo la porosidad $\phi; = 1$.

$$Re = \frac{U_{LD} * df}{\nu} = \frac{U_{LD} * \sqrt{(de^2 - di^2)} * \phi}{\nu} \quad (1)$$

A partir de esa caracterización, se eligieron tres condiciones de U_{LD} : 11.77, 14.20 y 19.39 cm s^{-1} , para los experimentos respirométricos realizados posteriormente en el reactor.

La transferencia de masa en el reactor de biopelícula como en los microreactores de biomasa desagregada, se caracterizó por medio de la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($K_L a$), medido a través del método dinámico. La ecuación 2 describe el balance de masa de oxígeno disuelto entre el oxígeno proporcionado por aireación continua y la tasa de absorción de oxígeno exógeno.

$$\frac{dC}{dt} = K_L a * (C^* - C) - OUR \quad (2)$$

Donde C^* representan la concentración de oxígeno disuelto en la saturación y C la concentración de oxígeno al tiempo t .

4.4 Sistema de microreactores.

Como se describe en la Figura 3, se utilizó un sistema de microreactores de 24 pozos (Microflask System, PreSens, México), cada pozo incluye un sensor fluorométrico de OD precalibrado (OxoDish, PreSens, México), acoplados al 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).

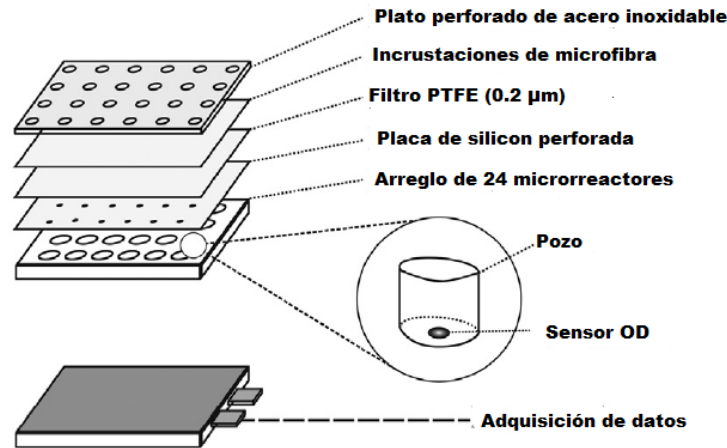


Figura 3. Arreglo sistema microreactores. Fuente: Modificado de Esquivel *et al.* 2013.

En cada pozo se inyectó una muestra de 1.4 mL de biopelícula desagregada y suspendida en medio mineral y se añadió una perla de vidrio (5mm de diámetro) a fin de mejorar la mezcla y transferencia de masa. El sistema de microreactores se colocó en una incubadora a una temperatura y agitación fija de 25 °C y 110 rpm.

4.5. Procedimientos analíticos.

4.5.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Para monitorear el reactor, se determinó la DQO por triplicado en el influente, efluente y reactor por medio del método colorimétrico de reflujó cerrado (APHA/AWWA/WPCF, 1999). La DQO total se determinó midiendo la DQO de una muestra homogénea, mientras que la DQO soluble se determinó midiendo la DQO del sobrenadante de una muestra centrifugada (1500 rpm, durante 10 minutos). La DQO insoluble se estimó como la diferencia entre la DQO total y soluble. Dado que agua residual sintética no contenía sólidos suspendidos, se consideró que la DQO insoluble era biomasa (X) y la DQO soluble como la concentración de sustrato (S).

4.5.2 Peso fresco de la biopelícula.

Previo a cada procedimiento respirométrico en el reactor, se extrajo una hilera de soportes cerámicos. Las 5 placas cerámica se escurrieron durante exactamente 5 minutos para eliminar el excedente líquido, posteriormente, cada placa fue pesada. El peso fresco de la biopelícula creciente se estimó de la diferencia del peso húmedo del soporte cerámico sin biopelícula y el peso húmedo del soporte cerámico con biopelícula.

4.6. Microscopía de la biopelícula.

El noveno día de crecimiento de la biopelícula, se retiró una hilera de soportes cerámicos del reactor; la biopelícula en crecimiento de una de las cinco placas fue tratada de acuerdo con el protocolo utilizado por Araújo y colaboradores en 2016, para posteriormente observar la conformación de la biopelícula a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

4.7. Métodos respirométricos y estimación de parámetros.

4.7.1 Respirometría de pulso de sustrato en el reactor de biopelícula.

Durante la operación continua del reactor se desarrollaron 5 experimentos respirométricos, correspondientes a los días 17^o, 23^o, 29^o y 35^o de crecimiento de la biopelícula, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- i. Se detuvo la alimentación del reactor mientras la aireación se mantuvo.

- ii. Conforme el sustrato en el sistema se agotaba, la concentración de OD aumentó hasta alcanzar un estado pseudo-estacionario, correspondiente al estado de respiración endógena (concentración de OD de línea base, C_b).
- iii. Se extrajo una hilera de soportes cerámicos, para el desarrollo de la microrespirometría.
- iv. Se inyectaron en el reactor 5 mL de una solución de 15 mg DQO L⁻¹ de acetato de sodio; el consumo del pulso de sustrato provocó el descenso de la concentración de OD. Una vez que se agotó el sustrato el sistema regreso al estado estacionario anterior. Este procedimiento fue replicado con un segundo pulso con la misma concentración de sustrato.
- v. Se midió por duplicado el $K_L a$ del sistema, con el método dinámico.

El procedimiento se repitió para los valores de U_{GR} de 0.55, 0.73 y 1.47 cm s⁻¹.

Con base en los respirogramas obtenidos de la respirometría de pulsos *in situ*, se determinaron las curvas de OUR con la ecuación 3.

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

Posteriormente, usando el software AQUASIM (Reichert, 1994), se describió la cinética del proceso a través del modelo de lodos activados (ASM1) y cuya matriz simplificada se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Matriz simplificada de ASM1.

Modelo	Componentes del proceso	S	X	C	Cinética
ASM1	Crecimiento	$-1/Y_{X/S}$	1	$-Y_{O_2/S}/Y_{X/S}$	$\mu_{max} * X * \frac{S}{S + K_S}$
	Respiración endógena		-1		$b_h * X$

El procedimiento de ajuste del modelo ASM1 que usa AQUASIM para la determinación de los parámetros cinéticos: constante de afinidad del sustrato (K_S) y

la tasa de crecimiento específica máxima (μ_{max}), está basado en el Método Runge-Kutta con optimización de Marquardt.

Los parámetros estequiométricos: rendimiento de oxidación del sustrato ($Y_{O_2/S}$) y el rendimiento de crecimiento de biomasa ($Y_{X/S}$) se determinaron a partir de la interpretación directa del área del respirograma de acuerdo con las ecuaciones 4 y 5; donde S_p es la concentración del pulso de sustrato exógeno inyectado.

$$Y_{O_2/S} = \frac{\int_0^t OUR dt}{S_p} = \frac{K_L a \int_0^t (C_b - C) dt}{S_p} \quad (4)$$

$$Y_{X/S} = 1 - Y_{O_2/S} \quad (5)$$

4.7.2. Respirometría con pulsos de concentración creciente en los microreactores.

Una vez que el reactor de biopelícula alcanzó un estado pseudo estacionario (al parar la alimentación y mantener la aireación), se retiró una de las hileras de soportes cerámicos y se determinó el peso fresco de la biopelícula creciendo en las 5 placas cerámicas.

Posteriormente la biopelícula de las 5 placas se desagregó con un cepillo en un volumen de 100 mL de medio mineral fresco.

Seguimos el protocolo para la microrespirometría de pulsos de concentración creciente, descrito por Esquivel *et al.* (2013) y que se menciona brevemente a continuación:

- i) Cada pozo del sistema de microreactores se llenó con 1.4 mL de la solución de biomasa lavada en medio mineral
- ii) La operación del sistema de microreactores operó hasta que se observó una lectura de OD estable, que corresponde al estado de respiración endógena.
- iii) En cada pozo se inyectó un pulso de 0.1 mL de una solución de acetato de sodio, la concentración de OD se midió hasta que volvió al estado estable anterior.

La estrategia experimental consistió en inyectar cuatro concentraciones de pulso de sustrato (7, 17, 24 y 31 mg DQO L⁻¹), incluido un control sin adición sustrato (cada concentración se prueba en cuatro pozos).

- iv) Se midió el $K_L a$ de cada pozo, con el método dinámico.

De los respirogramas obtenidos, se determinaron los parámetros estequiométricos y cinéticos de la biomasa desagregada (OUR'_{max} , $Y_{O_2/S}$ y $Y_{X/S}$), descritos por las ecuaciones 2, 3, 4 y 5.

Para la determinación de los parámetros cinéticos, se usó el método de inyección de pulsos de concentración creciente. Este método considera que la concentración de sustrato es el factor limitante de la cinética microbiana (Ramírez et al. 2013). Por lo anterior, se determinó la tasa máxima de consumo de oxígeno exógeno observado (OUR'_{max}) a diferentes concentraciones de sustrato (S_p). Mediante linealización de Hanes Woolf (Figura 4), se determinaron OUR_{max} y K_S .

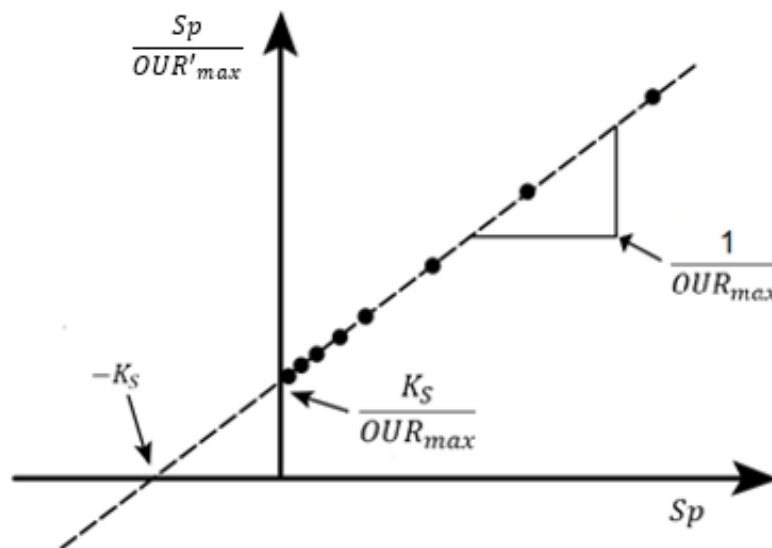


Figura 4. Regresión lineal de Hanes Woolf.

$$\frac{S_p}{OUR_{max}} = \frac{1}{OUR_{max}} * S_p + \frac{K_S}{OUR_{max}} \quad (6)$$

Mientras que μ_{max} fue determinada con la ecuación 7, donde, X es la concentración de biomasa.

$$\mu_{max} = OUR_{max} * \frac{Y_{X/s}}{X * Y_{O2/s}} \quad (7)$$

4.8. Factor de efectividad (η).

Dada la diferencia de concentración de biomasa en reactor de biopelícula y los microreactores, a modo de poder comparar ambos sistemas, se determinaron los OUR_{max} específicos (expresados por unidad de peso de biomasa; $r_{O2\ max}$):

$$r_{O2\ max}' = \frac{OUR'_{max}}{X} \quad (8)$$

El factor de efectividad global (η) se determinó a partir de la relación entre la tasa máxima de consumo de oxígeno exógeno observada con biopelícula ($r_{O2\ max}'$) y la tasa máxima de consumo de oxígeno exógeno observada con biomasa desagregada ($r_{O2\ max}$), como se indica en la ecuación 10:

$$\eta = \frac{r_{O2\ e}'}{r_{O2\ i}'} \quad (9)$$

Las biopelículas están sujetas a una limitación de transferencia de masa interna y externa, descritas por el factor de efectividad interno (η_i) y externo (η_e), de acuerdo con la ecuación 10 y 11 respectivamente:

$$\eta_i = \frac{r_{O2\ i}'}{r_{O2\ max}} \quad (10)$$

$$\eta_e = \frac{r_{O2\ e}'}{r_{O2\ max}} \quad (11)$$

Donde $r_{O2\ i}'$ y $r_{O2\ e}'$ son las tasas de consumo de oxígeno exógeno observadas con limitación de transferencia de masa interna y externa, respectivamente, y que también pueden ser expresadas por la tasa sin limitación multiplicada por un término de resistencia mediante las ecuaciones 12 y 13:

$$r_{o2'i} = \frac{1}{1 + R_i} * r_{o2max} \quad (12)$$

$$r_{o2'e} = \frac{1}{1 + R_e} * r_{o2max} \quad (13)$$

Donde R_i y R_e son las resistencias a la transferencia de masa internas y externas, respectivamente. Esto quiere decir que, para una resistencia infinita, la tasa observada sería igual a cero, mientras que para una resistencia nula la tasa observada sería igual a r_{o2max} .

De igual forma, la ecuación 10, también puede expresarse en términos de resistencia, donde R_t es la suma de las resistencias de transferencia de masa interna y externa (Ec. 14).

$$r_{o2'max} = \frac{1}{1 + R_t} * r_{o2max} = \frac{1}{1 + R_i + R_e} * r_{o2max} \quad (14)$$

Por lo que las ecuaciones 9 a 11, pueden expresarse como:

$$\eta = \frac{r_{o2'max}}{r_{o2max}} = \frac{1}{1 + R_i + R_e} = \frac{1}{1 + R_t} \quad (15)$$

$$\eta_i = \frac{r_{o2'i}}{r_{o2max}} = \frac{1}{1 + R_i}; R_i = \frac{1}{\eta_i} - 1 \quad (16)$$

$$\eta_e = \frac{r_{o2'e}}{r_{o2max}} = \frac{1}{1 + R_e}; R_e = \frac{1}{\eta_e} - 1 \quad (17)$$

Sustituyendo R_i y R_e en la ecuación 15, obtenemos:

$$\eta = \frac{1}{\frac{1}{\eta_i} + \frac{1}{\eta_e} - 1} \quad (18)$$

Por su parte, la contribución de la resistencia interna ($\%R_i$) y resistencia externa ($\%R_e$) a la resistencia total es descrita por las ecuaciones 19 y 20.

$$\%R_i = \frac{R_i}{R_i + R_e} \quad (19)$$

$$\%R_e = \frac{R_e}{R_i + R_e} \quad (20)$$

4.9 Estimación de error y método estadístico.

Los datos de OD obtenidos de los experimentos respirométricos fueron suavizados a través del método del promedio móvil ponderado.

Se estimó el error estándar de los valores calculados de R_e , U_{LD} , K_{La} , K_S , μ_{max} , $Y_{O_2/S}$ y $Y_{X/S}$.

Se realizó el análisis de varianza y prueba Tukey con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, para comparar los parámetros cinéticos y estequiométricos (K_S , μ_{max} , $Y_{O_2/S}$ y $Y_{X/S}$) respecto al tiempo, condiciones de agitación y metodología empelada.

5. Resultados y Discusión.

5.1 Caracterización hidrodinámica del reactor.

De acuerdo con Re (Ec. 1), al aumentar la U_{GR} , la turbulencia aumenta en la sección descendente del reactor airlift, causando incrementos en U_{LD} , la Tabla 4 muestra la relación lineal entre U_{GR} , U_{LD} y Re.

Tabla 4. Relación de velocidades U_{GR} , U_{LD} y Reynolds.

U_{GR} (cm s ⁻¹)	U_{LD} (cm s ⁻¹)	Re	K_{La} (h ⁻¹)
0.55	11.77 ± 0.48	11483 ± 64	18.8 ± 5.09
0.73	14.20 ± 0.21	13852 ± 917	21.40 ± 7.77
1.47	19.39 ± 0.28	18914 ± 1868	29.17 ± 10.66

Diversos autores (Simões *et al.* 2007, Dreszer *et al.* 2014, y Vrouwenvelder *et al.* 2010) señalan que el desarrollo de biopelículas en condiciones turbulentas incrementa la actividad metabólica bacteriana debido a las condiciones de estrés hidrodinámico y en consecuencia se generan más células por unidad de área que las generadas en flujo laminar.

En este protocolo experimental, el régimen del flujo fue turbulento para las 3 velocidades establecidas, y tal como se espera de un reactor de agitación neumática, el aumento en U_{GR} impactó positivamente en el K_{La} (Figura 5A), mientras que en el arreglo de microreactores (Figura 5B) el K_{La} fue constante debido a que se mantuvo la agitación de 110 rpm a lo largo de los experimentos.

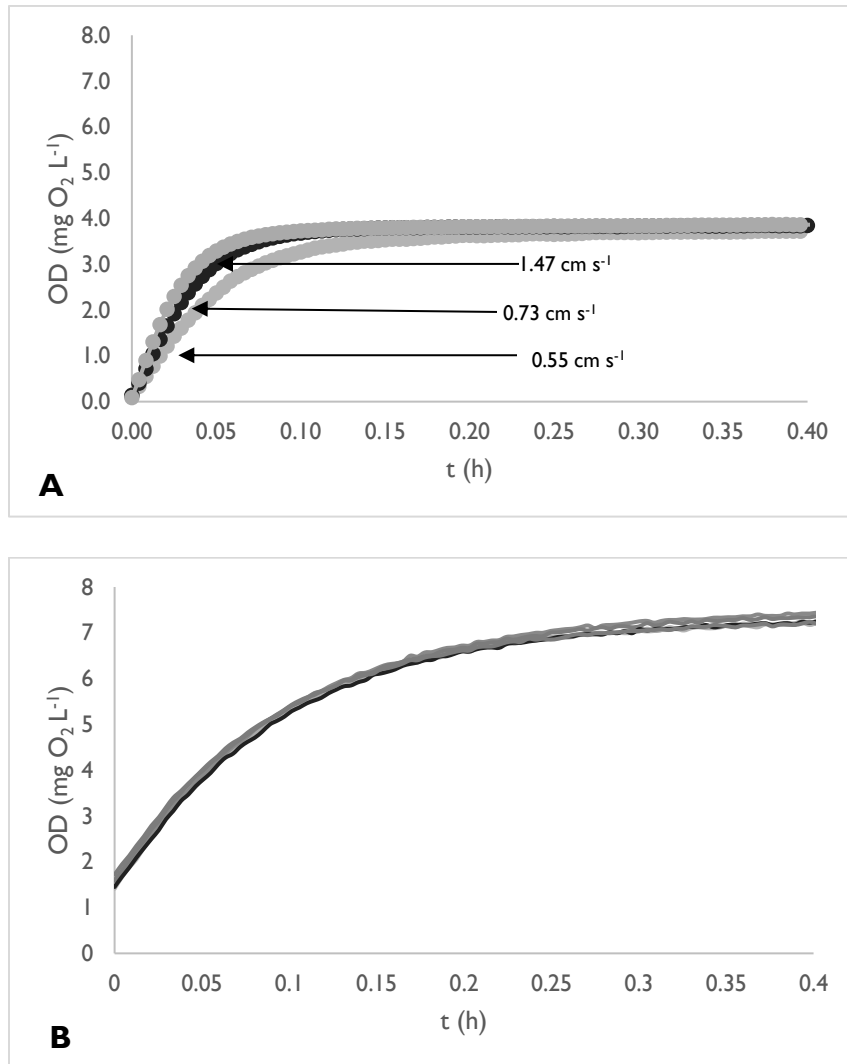


Figura 5. Perfiles de oxígeno observados (A) en el reactor de biopelícula, (B) en el arreglo de microreactores con biomasa desagregada, durante el desarrollo experimental para determinación del K_{La} .

5.2 Caracterización del reactor de biopelícula.

El reactor airlift fue inoculado y operado en continuo durante 39 días bajo condiciones constantes de alimentación, pH, temperatura y aireación/agitación. El reactor se mantuvo en un régimen de lavado, con la adición de 1.8 L h^{-1} de agua residual sintética y salida por desborde, a fin de promover el crecimiento de la biopelícula adherida a los soportes cerámicos y evitar el crecimiento de biomasa suspendida.

El influente mantuvo una concentración de 355.75 ± 16.28 mg DQO-S L⁻¹ y por medio de la determinación de la DQO soluble del efluente del reactor se corroboró el consumo del sustrato en el reactor de biopelícula. Conforme la concentración de biomasa crecía en el reactor, la DQO del efluente disminuyó progresivamente, presentando una eficiencia de remoción estable durante toda la operación (82-100% de remoción del DQO).

El día 26 se presentaron problemas operacionales, fallas en el control de pH propiciaron crecimiento fúngico en el reactor (Figura 6).

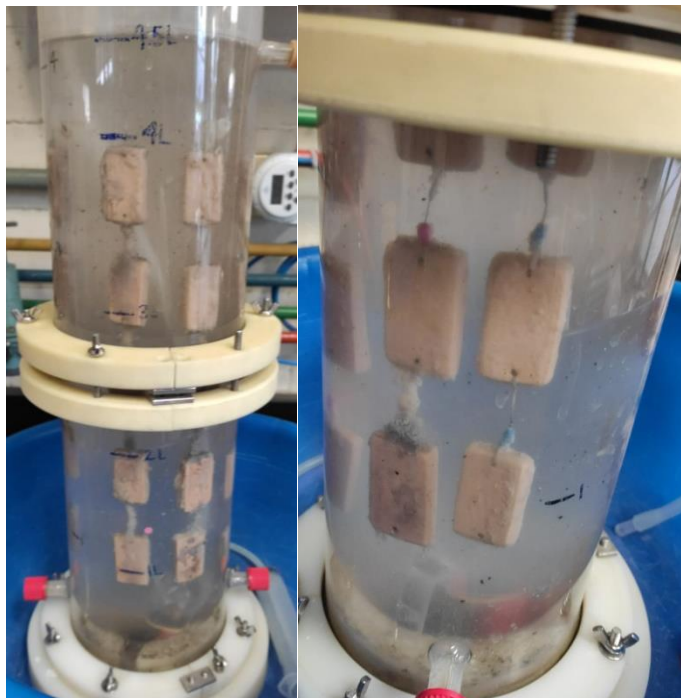


Figura 6. Contaminación fúngica en el reactor.

Con el propósito de eliminar la contaminación, se tomaron las siguientes medidas:

1. Se detuvo la alimentación y aireación en el reactor.
2. Los soportes cerámicos con la biopelícula se retiraron y colocaron en medio mineral.
3. Se lavó el reactor y sus partes móviles.
4. Se añadieron 4 L de agua residual sintética fresca.
5. Los soportes cerámicos con la biopelícula fueron reintroducidos al reactor.

6. Se estabilizó el pH del medio a 7 con la adición de H_3PO_4 1M.

7. Se reinició la alimentación y aireación en el reactor

Se cree que los eventos del día 26 tuvieron efectos sobre las determinaciones efectuadas el día 29.

5.2.1 Crecimiento de la biopelícula.

El crecimiento de la biomasa fue monitoreado a través del tiempo (Tabla 5), estimando el peso fresco de la biopelícula.

Tabla 5. Peso fresco de la biopelícula.

Día	Peso fresco (g)
9	0.49 ± 0.12
17	1.69 ± 1.01
23	1.93 ± 0.68
29	1.50 ± 0.22
35	1.71 ± 0.18
40	1.12 ± 0.12

Se cree que el descenso en el peso fresco de la biopelícula el día 29 está relacionado a los problemas operacionales del día 26.

La concentración de biomasa en cada experimento respirométrico y microrespirométrico (Tabla 6) se estimó por medio de la DQO insoluble, considerando el volumen de los reactores, el número de hileras de soportes en el reactor de biopelícula y la dilución de la biomasa en los microreactores.

Tabla 6. Concentración de biomasa en el reactor y microreactores.

Día	[X] microreactor (mg DQO L ⁻¹)	[X] reactor (mg DQO L ⁻¹)
17	231.97	57.99
23	318.50	63.70
29	567.30	99.28

5.2.2 MEB de la biopelícula.

El día 9 de operación del reactor y crecimiento de la biopelícula, se retiró una hilera de placas cerámicas y se seleccionó una de las placas como muestra para la microscopía electrónica de barrido. Las micrografías (Figura 7) muestran una comunidad muy diversa de microorganismos, en su mayoría bacterias de células muy redondeadas, posiblemente estafilococos, estreptococos y micobacterias.

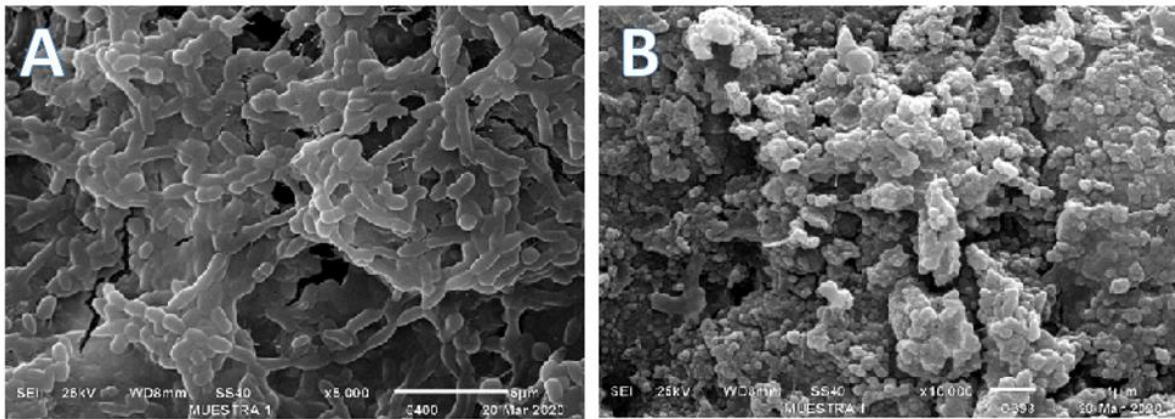


Figura 7. Micrografías de la biopelícula microbiana creciente sobre placas cerámicas como soporte: 25kV, (A) $\times 5,000$ magnificación, bar = $8 \mu m$; (B) $\times 10,000$ magnificación, bar = $1 \mu m$.

Está bien documentado (Stoodley *et al.* 1999, Beyenal y Lewandowski, 2002 y Teodósio *et al.* 2011) que la estructura y el contenido de la biopelícula también se ven afectados por el régimen del flujo, asociando altas turbulencias con una mayor producción de exopolisacáridos.

5.3 Respirimetría de la biopelícula y biomasa desagregada

Durante la operación continua del reactor se desarrollaron 4 experimentos respirométricos; correspondientes a los días 17, 23, 29 y 35 de crecimiento de la biopelícula.

A través del seguimiento de la tasa de consumo de oxígeno y el balance de masa (Ec. 2) fue posible medir indirectamente de las tasas de consumo de sustrato. La

Figura 8A muestra un ejemplo de los perfiles de oxígeno observados el día 23, después de la inyección de un pulso de sustrato (solución de acetato de sodio 15 mg DQO L⁻¹) a las U_{LD}: 11.77, 14.20 y 19.39 cm s⁻¹ en el reactor de biopelícula. Simultáneamente se llevó a cabo la respirometría con la biomasa de la biopelícula desagregada en el arreglo de microreactores, la Figura 8B muestra los perfiles de oxígeno observados después de la inyección de pulsos de concentración creciente (solución de acetato de sodio 7, 17, 24 y 31 mg DQO L⁻¹).

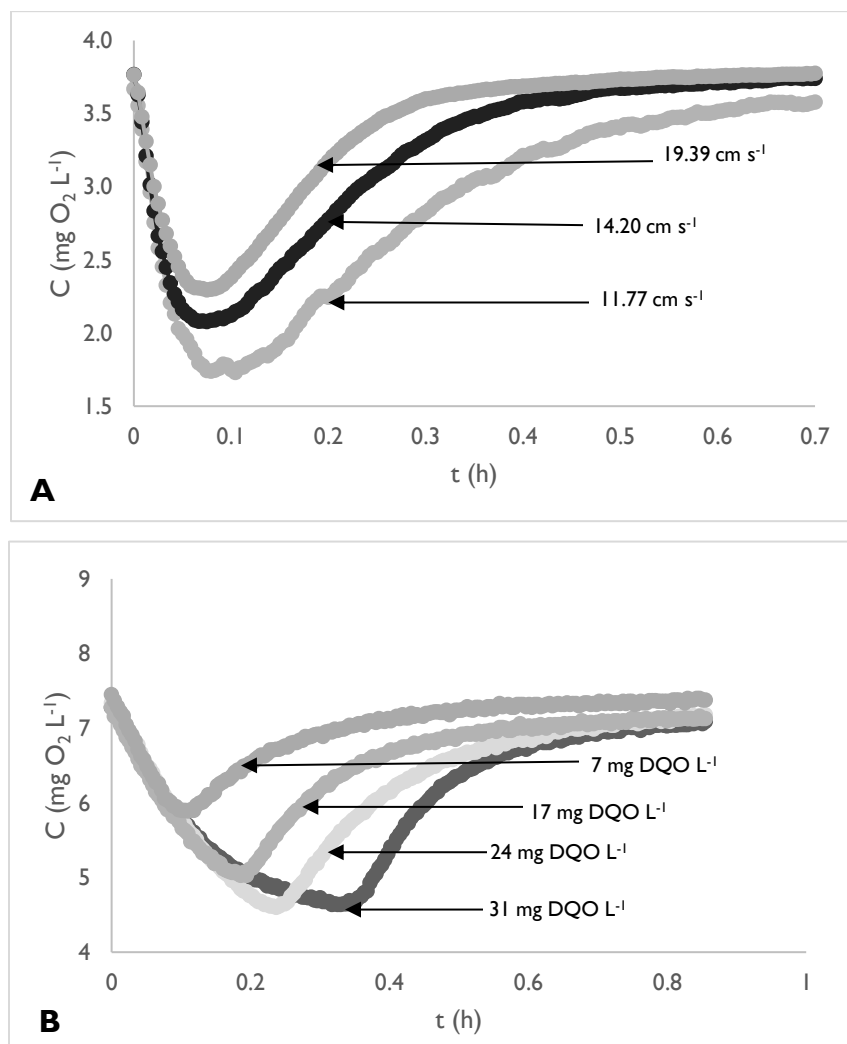


Figura 8. Perfiles de oxígeno observados después de la inyección de pulsos de acetato de sodio (A) en el reactor de biopelícula, (B) en el arreglo de microreactores con biomasa desagregada.

En el reactor de biopelícula (Figura 8A) es posible observar que el aumento de la velocidad U_{LD} propicia un descenso más pronunciado en la concentración de oxígeno que se interpreta como un mayor consumo de sustrato. Por su parte, al mantener la velocidad de agitación en el sistema de microreactores (Figura 8B) la curva del descenso en la concentración de oxígeno se prolonga respecto al tiempo a mayor concentración de pulso de sustrato inyectado.

5.3.1 Parámetros cinéticos y estequiométricos de la biopelícula.

El principal propósito de este trabajo fue determinar los parámetros cinéticos de un sistema modelo de biopelícula, usando una novedosa combinación de métodos respirométricos a fin de obtener datos de calidad y confianza con un menor esfuerzo experimental. Los resultados obtenidos de dicha caracterización se muestran en la Tabla 7 para el caso de la caracterización de las muestras en microbioreactores y en las Tablas 8, 9 y 10 para el caso de los experimentos de respirometría “in situ” a diferentes velocidades de aireación.

Tabla 7 Parámetros estequiométricos y cinéticos de la biomasa desagregada

	Día 17	Día 23	Día 29	Día 35
$Y_{O_2/S}$	0.631 ± 0.127	0.305 ± 0.052	0.406 ± 0.143	0.212 ± 0.049
$Y_{X/S}$	0.368 ± 0.127	0.695 ± 0.052	0.594 ± 0.143	0.788 ± 0.049
K_S	9.748 ± 2.698	2.181 ± 1.469	$5.276 \pm 2.563^*$	2.450 ± 1.655
μ_{max}	0.022 ± 0.002	0.016 ± 0.0005	$0.002 \pm 0.001^*$	0.005 ± 0.001

Tabla 8. Parámetros estequiométricos y cinéticos de la biopelícula ($U_{GR} 0.55 \text{ cm s}^{-1}$).

	$U_{GR} 0.55 \text{ cm s}^{-1}$			
	Día 17	Día 23	Día 29	Día 35
$Y_{O_2/S}$	0.617 ± 0.085	0.780 ± 0.014	0.805 ± 0.009	0.493 ± 0.002
$Y_{X/S}$	0.383 ± 0.085	0.220 ± 0.014	0.195 ± 0.009	0.507 ± 0.002
K_S	26.456 ± 14.891	27.939 ± 2.181	$3.275 \pm 1.282^*$	9.537 ± 1.140
μ_{max}	0.041 ± 0.013	0.703 ± 0.047	$0.057 \pm 0.010^*$	0.478 ± 0.021

Tabla 9. Parámetros estequiométricos y cinéticos de la biopelícula ($U_{GR} 0.73 \text{ cm s}^{-1}$).

$U_{GR} 0.73 \text{ cm s}^{-1}$				
	Día 17	Día 23	Día 29	Día 35
$Y_{O_2/S}$	0.835 ± 0.050	0.822 ± 0.024	0.336 ± 0.010	0.280 ± 0.001
$Y_{X/S}$	0.165 ± 0.050	0.178 ± 0.024	0.664 ± 0.010	0.720 ± 0.001
K_S	24.845 ± 18.029	23.188 ± 9.067	$2.499 \pm 0.759^*$	10.314 ± 2.161
μ_{max}	0.064 ± 0.036	0.057 ± 0.007	$0.263 \pm 0.056^*$	0.934 ± 0.117

Tabla 10. Parámetros estequiométricos y cinéticos de la biopelícula ($U_{GR} 1.47 \text{ cm s}^{-1}$).

$U_{GR} 1.47 \text{ cm s}^{-1}$				
	Día 17	Día 23	Día 29	Día 35
$Y_{O_2/S}$	0.857 ± 0.108	0.668 ± 0.039	0.463 ± 0.015	0.169 ± 0.014
$Y_{X/S}$	0.147 ± 0.108	0.332 ± 0.039	0.537 ± 0.015	0.831 ± 0.014
K_S	8.631 ± 0.704	5.913 ± 4.935	$3.728 \pm 1.045^*$	11.680 ± 8.708
μ_{max}	0.046 ± 0.003	0.644 ± 0.199	$0.362 \pm 0.047^*$	1.486 ± 0.879

Los primeros parámetros obtenidos en ambos sistemas fueron $Y_{O_2/S}$ (Ec. 4) y $Y_{X/S}$ (Ec. 5) que se estimaron del área de los respirogramas y el balance de masa. Para el caso de la biomasa desagregada llevada a cabo con muestras obtenidas en 4 diferentes días de la operación del bioreactor de biopelícula se observó que al día 17 el $Y_{O_2/S}$ fue significativamente más alto en comparación con el resto de las fechas. De igual forma el $Y_{X/S}$ fue significativamente más bajo en el día 17 a comparación del resto de los días, lo que sugiere un mayor proceso de crecimiento celular en el soporte conforme pasa el tiempo. En el caso del reactor de biopelícula se observó también un aumento significativo del rendimiento celular conforme pasa el tiempo. Esta tendencia es más clara para el caso del experimento a $U_{GR} = 1.47 \text{ cm s}^{-1}$, debido a que a esta velocidad de aireación se puede tener mejores condiciones de mezclado en el sistema así como mayor penetración tanto del oxígeno como del sustrato al interior de la biopelícula.

En cuanto a la diferencia de los valores obtenidos de $Y_{O_2/S}$ y $Y_{X/S}$ entre la biomasa desagregada y el reactor de biopelícula se determinó, mediante un análisis de varianza y prueba Tukey, que a un determinado día de experimentación no existen

diferencias significativas entre ambos tipos de experimentos. Lo anterior sugiere que la estequiometría de la oxidación de sustrato y crecimiento celular no es afectada por las condiciones hidrodinámicas ni la escala, esto está en conformidad con lo reportado por Ordaz et al. (2019)

En el caso de K_s y μ_{max} de la biopelícula, se estimaron por ajuste del modelo ASM1 a los respirogramas obtenidos en la respirometría de pulsos “in situ” mientras que en la biomasa desagregada se empleó respirometría de pulsos de concentración creciente.

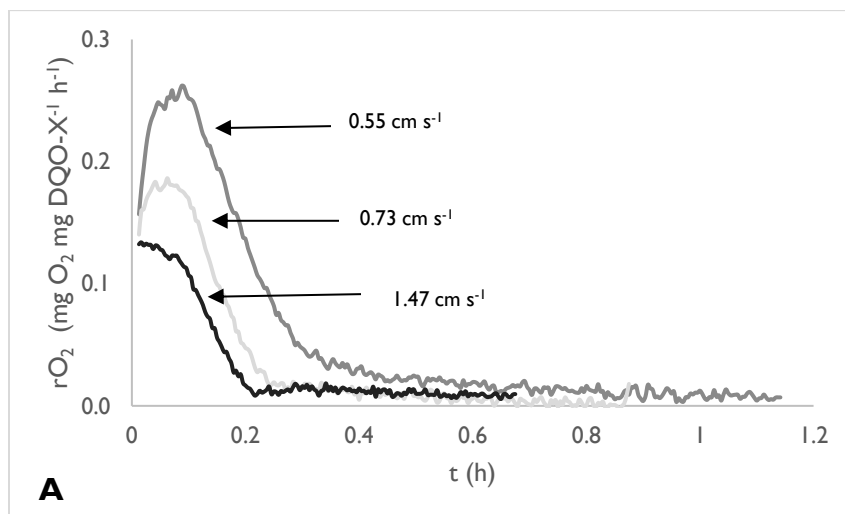
Los valores promedio de K_s globalmente mostraron una tendencia a la baja conforme pasaba el tiempo de operación del biorreactor lo cual indica mayor afinidad de los microorganismos por el acetato. Esto se observa de igual forma en las muestras de biomasa desagregada caracterizadas en los microreactores. En el caso de la biopelícula se observó una diferencia significativa en el caso de los valores obtenidos a una $U_{GR} = 1.47 \text{ cm s}^{-1}$ durante los primeros dos días de experimentación, donde se obtuvieron rangos de valores similares a los de la biomasa desagregada. Los valores promedio observados durante la caracterización de la biomasa desagregada, con excepción del día 17, no mostraron diferencias significativas y fueron menores en comparación con los experimentos obtenidos en la biopelícula, lo cual habla de importantes efectos de la biopelícula sobre la caracterización cinética del proceso de biodegradación de acetato. Melo *et al.* (2005) señalaron que la disminución de K_s está ligada al aumento de U_{GR} ó U_{LD} , ya que al reducirse la capa límite por agitación, hay una menor resistencia externa y se favorece el consumo de sustrato.

En el caso de μ_{max} se observaron diferencias importantes entre los valores obtenidos en la biomasa desagregada y los experimentos “in situ” en la biopelícula, siendo estos últimos mayores. La determinación de μ_{max} en el caso de los experimentos con biomasa desagregada se realizó con la ecuación 7 la cual depende de la concentración de biomasa determinada a partir de la muestra de biopelícula, la diferencia en valores con la biopelícula sugiere que no fue representativa esta muestra de la biopelícula del biorreactor y por ello la diferencia estimada con

respecto de los experimentos con la biopelícula. No se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos a diferentes días con la biomasa desagregada mientras que si hubo una tendencia al aumento en los valores promedio obtenidos en la biopelícula conforme pasaba el tiempo. Los valores obtenidos de μ_{\max} son similares a lo reportado en literatura (Kim, Choi y Pachepsky, 2010 y Ordaz *et al.* 2019).

5.3.2 Factor de efectividad.

Adicionalmente se buscó cuantificar las limitaciones de transferencia de masa al interior y exterior de la biopelícula, por medio de la estimación de η de la biopelícula. Para tal efecto, se determinó el OUR máximo observado bajo las mismas concentraciones de sustrato en la biopelícula (Figura 9 A) y biomasa desagregada (Figura 9B). Los OUR_{\max} observados se muestran en términos de biomasa ($r_{O_2}'_{\max}$ observado) con la finalidad de poder comparar ambos sistemas.



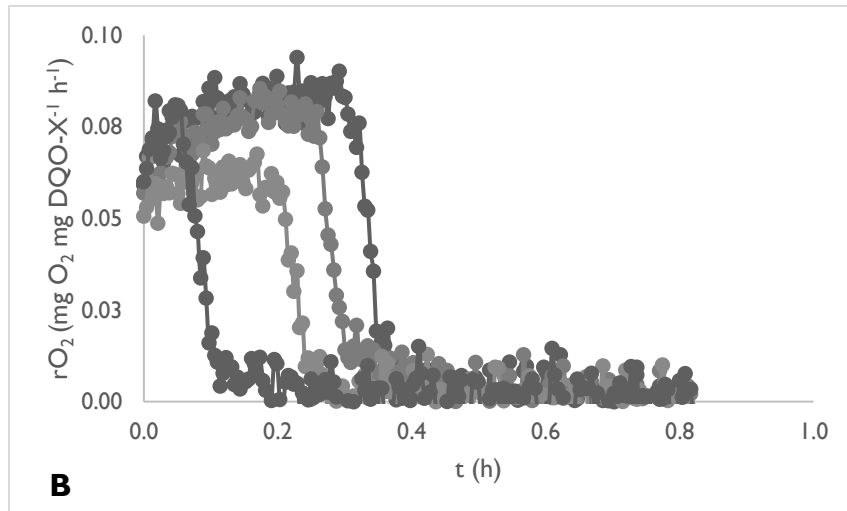


Figura 9. r_{O_2} máximo observado (A) de la biopelícula, (B) de la biomasa desagregada.

Contrario a lo esperado, la biopelícula mostró una r_{O_2} superior a la biomasa desagregada. Las diferencias de magnitud entre el $r_{O_2}'_i$ y $r_{O_2}'_e$ (Tabla 11) indican que los datos de biomasa desagregada con los del reactor no son comparables debido quizás a la dificultad de obtención de una muestra representativa. A pesar de que se observó una distribución homogénea de la biopelícula sobre los soportes del bioreactor no se tiene un control estricto sobre la cantidad exacta de biomasa en cada hilera de azulejos. Se tiene en literatura reportes de que la obtención de muestras representativas de reactores de biopelícula es prácticamente imposible de realizar (Yang *et al.* 2000, Subramanian *et al.* 2020 y Da Silva *et al.* 2020).

Tabla 11. Factor de efectividad.

U_{GR} ($cm\ s^{-1}$)	$r_{O_2}'_i$ ($mg\ O_2\ mg\ DQO-X^{-1}\ h^{-1}$)	$r_{O_2}'_e$ ($mg\ O_2\ mg\ DQO-X^{-1}\ h^{-1}$)	η
0.55		0.875 ± 0.086	12.687
0.73	0.070 ± 0.002	1.006 ± 0.055	14.588
1.47		0.953 ± 0.023	13.821

Dado que la tasa máxima de consumo de oxígeno exógeno, observada con biopelícula es superior a la observada en la biomasa desagregada, las estimaciones de η resultan superiores a 1.

Parece ser que una muestra de la biopelícula no es representativa al llevarla a la escala de los microreactores; debido probablemente a la complejidad estructural y metabólica de la biopelícula. Por lo que no fue posible estimar los factores de efectividad η_i y η_e y por consiguiente la contribución de la resistencia $\%R_i$ y $\%R_e$ a la resistencia total.

6. Conclusiones.

Previamente, diversos autores (Ni *et al.* 2008, Trojanowicz *et al.* 2009, Ordaz *et al.* 2012 y Vital *et al.* 2016) han determinado parámetros cinéticos y estequiométricos de sistemas modelo de biopelículas usando técnicas respirométricas, inclusive a distintas velocidades de flujo de líquido (De Beer *et al.* 1996, Arnaldos *et al.* 2018, Ordaz *et al.* 2019). No obstante, ninguno de esos autores ha conjugado dos métodos distintos de respirometría y modelado para la determinación de los parámetros cinéticos y estequiométricos de una biopelícula bajo condiciones diversas condiciones U_{GR} , siguiendo el crecimiento de la biopelícula a través del tiempo.

La combinación de respirometría de pulsos in situ en un reactor de biopelícula y microrespirometría con pulsos de concentración creciente con muestras desagregadas de esa misma biopelícula, se planteó con la idea de determinar los parámetros K_S , μ_{max} , $Y_{O_2/S}$ y $Y_{X/S}$ de la biopelícula (parámetros aparentes) y su forma desagregada (parámetros intrínsecos). Con esa estrategia novedosa los parámetros fueron estimados exitosamente.

Sin embargo, se encontró que esta metodología no es funcional si se desea comparar las tasas máximas de consumo de oxígeno exógeno en la biopelícula ($r_{O_2'e}$) y de su forma desagregada ($r_{O_2'i}$) para estimar las limitaciones en la transferencia de masa interna y externa.

La primera razón es probablemente la dificultad de tomar una muestra representativa de todo el sistema, resultando en que los resultados obtenidos con la muestra de biomasa disgregada no sean representativos del reactor. Una segunda razón es probablemente la diferencia de condiciones y magnitud entre los dos métodos respirométricos empleados. Esa diferencia de condición puede inducir cambios metabólicos en los cultivos, haciendo que no sean estrictamente comparables. En efecto, en microrespirometría de biopelícula disgregada, la biomasa está suspendida en una dispersión homogénea, mientras que en el reactor, la biopelícula se debe ver como un sistema dinámico heterogéneo. Esa diferencia podría explicar la ausencia de una directa correlación entre los dos métodos respirométricos, para la determinación del factor de efectividad.

Desafortunadamente, en la ausencia de un método de referencia, no podemos concluir de forma satisfactoria sobre el impacto del método sobre los propios parámetros.

7. Recomendaciones.

Estimar el espesor y densidad de la biopelícula a través del tiempo y relacionarlo con la transferencia de masa interna.

Con el fin de mejorar la estimación de la concentración de biomasa de la biopelícula, se recomienda realizar análisis para conocer el porcentaje exopolisacáridos que conforman la biopelícula.

Podría ser interesante correlacionar los rendimientos $Y_{O_2/S}$ y $Y_{X/S}$ con el porcentaje de biomasa activa y los exopolisacáridos que conforman la biopelícula.

Para un análisis más completo de la dinámica poblacional y metabólica del consorcio que conforma la biopelícula, se recomienda realizar estudios de metagenómica.

8. Bibliografía.

- American Water Works Association. (1999). *Standar Metods for the Examination of water and wastewater*. APHA American Public Health Association.
- Andersson, S., Kuttuva, R., Land, C., & Dalhammar, G. (2008). Biofilm formation interactions of bacterial strains found in wastewater treatments system. *FEMS Microbiol. Len*, 1(283), 83-90.
- Araújo, P. A., Malheiro, J., Machado, I., Mergulhao, F., Melo, L., & Simoes, M. (2016). Influence of Flow Velocity on the Characteristics of *Pseudomonas fluorescens* Biofilms. *J. Environ. Eng.* doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870
- Arnaldos, A., Rehman, U., Naessens, W., Amerlinck, Y., & Nopens, I. (2018). Understanding the effects of bulk mixing on the determination of the affinity index: consequences for process operation and design. *Water Sci. Technol.*, 77(3), 576-588.
- Beyenal, H., & Lewandowski, Z. (2002). Internal and external mass transfer in biofilms grown at various flow velocities. *Biotechnology Progress* 18, 55-61.
- Caldwell, D. H., & Langelier, W. F. (1948). *Manometric measurement of the biochemical oxygen demand of sewage*. University of California, Riverside.
- Carvalho, L., Carrera, J., & Chamy, R. (2002). Nitrifying activity monitoring an kinetic parameters detrmiation in biofilm airlift reactor by respirometry. *Biotechnol. Lett.*, 24, 2063-2066.
- Da Silva, G., Pennafirme, P., Da Costa Pereira, D., Waite, C., Lopes, R., Lima, I., & Crapez, M. (2020). Monitoring of bacterial community structure and growth: An alternative tool for biofilm microanalysis. *Biofilm*, 2, 100034. doi:https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100034.
- De Beer, D., Stoodley, P., & Lewandowski, Z. (1996). Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilm. *Water Research*, 30, 2761-2765.

Di Trapani, D., Capodici, M., Cosenza, A., Di Bella, G., Mannina, G., Torregrossa, M., & Viviani, G. (2011). Evaluation of biomass activity and wastewater characterization in a UCT-MBR pilot plant by means of respirometric techniques. *Desalination*, 269, 190-197.

Dreszer, C., Fleming, H., Zwijnenburg, A., Kruithof, J., & Vrouwenvelder, J. (2014). Impact of biofilm accumulation on transmembrane and feed channel pressure drop: Effects of crossflow velocity, feed spacer and biodegradable nutrient. *Water Res.*, 200-211.

Esquivel-Rios, I., Ramirez-Vargas, R., Hernandez-Martínez, G. R., 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*, 70-78.

Geankoplis, C. (2003). *Transport processes and separation process principles*.

Guisasola, A., Sin, G., Baeza, J., Carrera, J., & Vanrolleghem, P. (2005). Limitations of ASM1 and ASM3: a comparison based on batch oxygen uptake rate profiles from different full-scale wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.*, 52, 69-77.

Kim, J.-W., Choi, H., & Pachepsky, Y. (2010). Biofilm morphology as related to the porous media clogging. *Water Research*, 40, 1193-1201.

Knobelsdorf, J., & Mujeriego, R. (1997). Crecimiento bacteriano en las redes de distribución de agua potable: Una revisión bibliográfica. *Ingeniería del Agua*, 4(2), 17-28.

Lazarova, V., & Manem, J. (2000). Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment. En J. Bryers, *Biofilms II: Process analysis and applications* (págs. 159-206). New York: Wiley-Liss.

Liu, Y., Liu, Y., & Tay, J. (2005). Relationship between size and mass transfer resistance in aerobic granules. *Lett. App. Microbiol.*, 53-64.

Luong, J. H. (1983). Determination of effectiveness factor for immobilized cells on solid supports. *Eur. J. Appl. Microbiol Biotechnol*(18), 249-253.

Melo, L. (2005). Biofilm physical structure, internal diffusivity and tortuosity. *Water Science and Technology*, 77-84.

Ni, B., Han Qing Yu, H., & Sun, Y. (2018). Modeling simultaneous autotrophic and heterotrophic growth in aerobic granules. *Water Research*, 42, 1583.

NMX-AA-034-SCFI-2015 . (2015). *Analisis de agua- Medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- Método de prueba*. México, D. F.

Oliveira , C. S., Ordaz, A., Ferreira, E. C., Alves, M., & Thalasso, F. (2011). In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities. *Biochemical Engineering Journal* 58-59, 12-19. doi:10.1016/j.bej.2011.08.001

Oliveira, C., Ordaz, A., Ferreira, E., Alves, M., & Thalasso, F. (2011). In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities. *Biochemical Engineering Journal*, 12-19.

Ordaz , A., Oliveira, C. S., Alba, J., Carrión, M., & Thalasso , F. (2011). Determination of apparent kinetic and stoichiometric parameters in a nitrifying fixed-bed reactor by in situ pulse respirometry. *Biochemical Engineering Journal* 55, 123-130. doi:https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.03.015

Ordaz , A., Oliveira, C. S., Quijano, G., Ferreira, E. C., Alves, M., & Thalasso, F. (2011). Kinetic and stoichiometric characterization of a fixed biofilm reactor by pulse respirometry. *Journal of Biotechnology* 157, 173-179. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.10.015

Ordaz, A., Oliveira , C., Quijano, G., Ferreira , E., Alves, M., & Thalasso, F. (2012). Kinetic and stoichiometric characterization of a fixed biofilm reactor by pulse respirometry. *Journal of Biotechnology*, 157, 173-179.

Ordaz, A., Ramírez, R., Hernandez-Martínez, G. R., 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*, 194-202.

Orihuel-Iranzo, E. J. (2012). Nuevas herramientas para la detección y eliminación de biofilms. *Jornadas sobre Salas Blancas II, ANICE*, (págs. 42-46). Madrid. Recuperado el Septiembre de 2020

Orupold, K., Masirin, A., & Tenno, T. (2001). Estimation of biodegradation of phenolic compounds on activated sludge by respirometry. *Chemosphere*, 2001, 1273-1280.

Paul, E., Ochoa, J., Pechaud, Y., Liu, Y., & Liné, A. (2012). Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water Research* 46 (17), 5499-5508. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.029>

Petersen, B., Gernaey, K., Henze, M., & Vanrolleghem, P. (2003). Calibration of activated sludge models: A critical review of experimental designs. En S. N. Reineke (Ed.), *Biotechnology for the Environment: Wastewater Treatment and Modeling, Waste Gas Handling. Focus on Biotechnology* (Vol. 3C, págs. 101-186). Dordrecht: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-94-017-0932-3_5

Ramirez-Vargas, R., Ordaz, A., Carrion, M., Ferreira, E., Alves, M., & Thalasso, F. (2013). Comparison of static and dynamic respirometry for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of nitrifying proces. *Biodegradation*, 4, 675-684.

Reichert, P. (1994). AQUASIM, Tool for simulation and data analysis of aquatic system. *Water Sci. Tech.*, 21-30.

Simões, M., Pereira, M., Sillankorva, S., Azeredo, J., & Vieira, M. (2007). The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Biofouling*, 249-258.

Spanjers, H., Brouwer, H., & Takacs, I. (1999). Direct parameter extraction from respirograms for wastewater and biomass characterization. *Water Sci. Technol.*, *39*, 137-145.

Stoodley, P., Dodds, P., Boyle, J., & Lappin-Scott, H. (1999). Influence of hydrodynamic and nutrients on biofilm structure. *J. Appl. Microbiol.*, *85*(S1), 19S-28S.

Subramanian, S., Huiszoon, R., Chu, S., Bentley, W., & Ghodssi, R. (2020). Microsystems for biofilm characterization and sensing – A review. *Biofilm*, 100015. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100015>

Teodósio, J., Simões, M., Melo, L., & Mergulhao, F. (2011). Flow cell hydrodynamics and their effects on E. coli biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow. *Biofouling*, *27*(1), 1-11.

Trojanowicz, K., Styka, W., & Baczynski, T. (2009). Experimental Determination of Kinetic Parameters for Heterotrophic Microorganisms in Biofilm under Petrochemical Wastewater Conditions. *Polish J. of Environ. Stud.*, *18*, 913-921.

Vanrolleghem, P., & Spanjers, H. (1998). A hybrid respirometric method for more reliable assessment of activated sludge model parameter. *Water Sci. Technol.*, *37*, 237-246.

Vital Jacome, M., Buitrón, G., Moreno Andrade, I., García 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 Hazard Mater*, *313*, 112-121.

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

Vrouwenvelder, J., Buijter, J., Riviere, M., Van der Meer, W., Van Loosdrecht, M., & Kruithof, J. (2010). Impact of flow regime on pressure drop increase and biomass accumulation and morphology in membrane systems. *Water Res.*, 3(44), 689-702.

Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G., & Lewandowski, Z. (2000). Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 39, 109-119.