

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Especialización en Biotecnología

PRODUCCIÓN DE BIOMASA GRANULAR AEROBIA RICA EN
POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DEL TRATAMIENTO DE AGUAS
RESIDUALES MUNICIPALES

IBI. Haiti Aixa Islas Pérez Negrón

Directora: Dra. Fajardo Ortiz María del Carmen
Co-asesor: Dr. Ulises Rojas Zamora



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00212

Matrícula: 2202800442

Producción de biomasa granular aerobia rica en polihidroxicanoatos a partir del tratamiento de aguas residuales municipales.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 31 del mes de enero del año 2022 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ
DR. ULISES ROJAS ZAMORA
DR. DANIEL DE LOS COBOS VASCONCELOS



siendo los dos primeros asesores de la alumna y lector el tercero, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA
DE: HAITI AIXA ISLAS PEREZ NEGRON

HAITI AIXA ISLAS PEREZ NEGRON
ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

ASESORA

DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

ASESOR

DR. ULISES ROJAS ZAMORA

LECTOR

DR. DANIEL DE LOS COBOS VASCONCELOS

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por su amor y apoyo incondicional en esta y todas las etapas de mi vida.

A mis hermanos que estuvieron presentes en la realización de esta meta, agradezco sus palabras motivadoras, sus consejos y su dedicación.

A mi directora la Dra. María del Carmen Fajardo y al Dr. Ulises Rojas, gracias por compartir conmigo su conocimiento, por su gran disposición ante cualquier inquietud y por su tolerancia, su guía fue pieza clave para la realización de cada etapa de este trabajo, al Dr. Daniel de los Cobos por su gran disposición y sus comentarios en la revisión de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio Denys y Marco por su compañerismo y gran apoyo en la etapa experimental de este proyecto.

Finalmente agradezco al proyecto SECTEI (9241C19) por el apoyo de beca recibido.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Tratamiento de aguas residuales	2
2.2 Reactores de lotes secuenciado	3
2.3 Lodos aerobios granulares	5
2.4 Papel de las EPS en la formación de biomasa granular aerobia	7
2.5 Producción de polihidroxialcanoatos	8
2.6 Síntesis de PHA	9
2.7 Sustratos utilizados en la producción de PHA	12
2.8 Aguas residuales municipales como fuente de sustratos para la producción de PHA	13
2.9 Cultivo de biomasa granular aerobia para la acumulación de PHA	14
3. Justificación	16
4. Objetivo General	17
5. Hipótesis	17
6. Metodología y técnicas analíticas	18
6.1 Reactor para la producción de biomasa granular	18
6.1.1 Inóculo e influente	19
6.2 Operación de un SBR a distintos ciclos de operación y variantes de aereación	19
6.2.1 Configuración del reactor	20
6.3 Técnicas analíticas	20
7. Resultados	23
7.1 Reactor para la producción de biomasa granular	23
7.1.1 Caracterización del influente	23
7.1.2 Desempeño del sistema de tratamiento en la remoción de contaminantes	24
7.1.3. Formación de biomasa granular aerobia	25
7.2 Operación de un SBR a distintos ciclos de operación y variantes de aereación	30
7.2.1 Caracterización del influente	30

7.2.2 Desempeño del sistema de tratamiento en la remoción de contaminantes	31
7.2.3 Formación de biomasa granular aerobia	32
8. Conclusiones	39
9. Referencias	40
Anexo 1	47
Anexo 2	48

1. Introducción

Las aguas residuales se producen como consecuencia de las distintas actividades humanas; estas se caracterizan por tener disueltas o en suspensión sustancias químicas, partículas o microorganismos que deterioran la calidad de los cuerpos receptores en donde se descargan, sobre todo si no se tratan adecuadamente para remover las sustancias o elementos potencialmente perjudiciales (Tchobanoglous et al., 2003). Se estima que a nivel mundial entre 80 y 95% del agua residual se descarga directamente a los ríos, lagos y océanos sin recibir tratamiento previo (Conagua, 2017), lo cual genera un grave problema de contaminación ambiental.

Las aguas residuales municipales son generadas en los núcleos de población; provienen de las viviendas, edificios públicos y son colectadas en los sistemas de alcantarillado urbanos y rurales. Sus principales contaminantes son el nitrógeno, fósforo, compuestos orgánicos, bacterias coliformes fecales y materia orgánica, entre otros (Jiménez *et al.*, 2010).

En el año 2019 se descargaron 7.9 millones de hm^3 de estos efluentes, de los cuales se recolectaron en el alcantarillado 6.79 millones de hm^3 y se trataron sólo 4.46 millones de hm^3 a un caudal de 141.48 (m^3/s), permitiendo la remoción de 0.96 miles de toneladas de DBO_5 como carga contaminante de las 2.13 miles de toneladas producidas (Conagua, 2019). Debido a esto, es necesario incrementar la cobertura de tratamiento de aguas residuales a partir de la selección e instalación de sistemas altamente eficientes y robustos en la remoción de contaminantes.

Los sistemas basados en lodos aerobios granulares (LAG) han demostrado ser una alternativa atractiva para sustituir los sistemas convencionales de lodos activados, pues a partir de su uso es posible la eliminación simultánea de materia orgánica y nutrientes biológicos, además de una excelente separación sólido-líquido en unidades de tratamiento compactas, lo que permite obtener efluentes clarificados con bajas concentraciones de sólidos suspendidos en sistemas que demandan poca área (Long et al., 2014). En este sentido, los LAG presentan distintas cualidades, tales como una buena capacidad de sedimentación, estructura compacta, alta resistencia a la toxicidad y capacidad para soportar tasas de carga orgánica de hasta $15 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (De Sousa et al., 2020).

Como una ventaja operativa adicional, el tratamiento de las aguas residuales a partir de sistemas de LGA pueden complementarse con la producción de biopolímeros en forma de polihidroxialcanoatos (PHA), los cuales se acumulan en el citoplasma celular de los microorganismos cuando utilizan como sustrato los contaminantes orgánicos presentes en el agua residual.

Con base en lo descrito, en el presente trabajo se analiza el proceso de granulación de la biomasa en un reactor secuencial intermitente a escala laboratorio, utilizando como influente aguas residuales municipales diluidas.

2. Antecedentes

2.1 Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de aguas residuales tiene como objetivo producir efluentes que no representen un peligro para la salud humana o daño al medio ambiente. El tratamiento convencional de aguas residuales es una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos para eliminar sólidos en suspensión y disueltos a partir de la descomposición biológica de la materia orgánica y nutrientes contenidos en las aguas residuales. Para lograrlo, se aplican diferentes procesos secuenciales, los cuales se clasifican en tratamiento preliminar, primario, secundario y terciario o avanzado (Ranjit et al., 2021).

Durante el tratamiento preliminar se eliminan los componentes que puedan afectar el mantenimiento o funcionamiento de los diferentes procesos; eliminando principalmente sólidos gruesos, grasa y aceites. En el tratamiento primario se remueven del agua una fracción de sólidos en suspensión y materia orgánica del agua residual; esto se realiza mediante operaciones físicas como tamizado y sedimentación. Posteriormente, en el tratamiento secundario se lleva a cabo la remoción de compuestos disueltos, los cuales generalmente representan la mayor fracción de contaminantes en las aguas residuales. Debido a ello, se considera al tratamiento secundario como la etapa más importante del proceso (Metcalf y Eddy, 1996). Los tratamientos secundarios no logran cumplir con las normativas para la reutilización de las aguas tratadas, por lo tanto, se les aplica un tratamiento terciario. Los procesos de tratamiento terciario incluyen principalmente coagulación, sedimentación, bio-filtro, filtración física o por membrana, ozonización y desinfección (Wang et al., 2018).

El tratamiento de aguas residuales con lodos activados es el tratamiento biológico más utilizado actualmente, sin embargo, las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales (PTAR) basadas en esta tecnología requieren una gran área debido a las diferentes etapas que las conforman. Esto se debe principalmente a la inclusión de un sedimentador primario de gran tamaño para la remoción de los contaminantes en forma particulada. Adicionalmente, el reactor secundario demanda altos costos de energía para la aereación de sólidos suspendidos volátiles, los cuales representan los microorganismos que se encargan de la biodegradación de los contaminantes (De Bruin et al., 2004). Por otra parte, en este proceso se requiere un tanque de separación secundario (tanque de decantación o sedimentación) para la separación de la biomasa del agua tratada (Ranjit et al., 2021), así como de líneas de remoción y de recirculación de lodos. La biomasa en estos sistemas está constituida por lodos activados, los cuales están integrados por millones de microorganismos auto-adheridos en estructuras llamadas flóculos, los cuales presentan una conformación dispersa que resulta en bajas velocidades de sedimentación. Debido a ello, usualmente se requiere de tiempos prolongados de sedimentación para lograr la separación eficiente de la biomasa del agua tratada.

Por lo antes expuesto, se ha optado por el diseño de tecnologías avanzadas de configuración más simple o con menores requerimientos de área, las cuales se caracterizan por presentar altas eficiencias en la remoción de contaminantes. Entre estas resaltan los reactores de biomasa granular aerobia, cuya biomasa tiene como principal ventaja altas velocidades de sedimentación en comparación a los flóculos y puede ser cultivada en sistemas más compactos como lo son los reactores secuenciados por lotes (Winkler et al., 2018).

2.2 Reactores de lotes secuenciado

A la fecha existen diferentes tecnologías biológicas para el tratamiento de aguas residuales, las cuales se adaptan a las características particulares de los diferentes tipos de aguas residuales que se producen, así como a las condiciones socioeconómicas de las distintas zonas en donde se instalan y a los requerimientos de calidad de agua tratada. En este sentido, una de las tendencias actuales es el diseño e instalación de sistemas robustos y eficientes que permitan generar agua de alta calidad con potencial de reuso. Entre estos, resaltan los reactores de lote secuenciado (SBR,

por sus siglas en inglés); los cuales presentan importantes ventajas en comparación a los sistemas convencionales de lodos activados, pues es una tecnología flexible, que representa menor costo operativo, menor demanda de área para su instalación, además de combinar las fases de nitrificación y desnitrificación en el mismo sistema (Lim et al., 2011). Su configuración por etapas permite incluir fases anóxicas y aerobias para la remoción simultánea de carbono y nutrientes, resultando así en sistemas altamente eficaces. Este proceso implica una gran reducción en el tamaño de la planta, pues una gran diferencia entre el uso de un SBR y un sistema convencional es que, en el último cada una de las etapas del tratamiento se hacen en tanques separados (Singh y Srivastava, 2011).

El proceso que se realiza dentro de un SBR para el tratamiento de aguas residuales consta de 4 fases. En la fase de llenado el reactor se alimenta con aguas residuales crudas. La alimentación puede ser aerobia (con agitación) o anaerobia (estática). En la alimentación aerobia al entrar en contacto el agua cruda con la biomasa y en presencia de oxígeno, inmediatamente se inicia la etapa de reacción aerobia. Durante el llenado estático se agrega el agua a la biomasa, creando una situación de alto contenido de sustrato que favorece principalmente a los microorganismos acumuladores de fosfatos, los cuales son los responsables de la eliminación biológica de fósforo, para después iniciar la etapa de reacción aerobia. Durante la fase de reacción aerobia se lleva a cabo la eliminación biológica de los compuestos orgánicos. Una vez que concluye la etapa de reacción, se inactiva el sistema de aereación iniciando la fase de sedimentación, en la cual se permite la separación de la biomasa del agua tratada. Finalmente, una vez clarificado el efluente, este se extrae del sistema durante la fase de descarga, cerrando así un ciclo de operación (Dutta y Sarkar., 2015).

Además de las cualidades mencionadas de los sistemas SBR, dentro de estos reactores es posible la formación de lodo granular aerobio (LAG) la cual presenta propiedades estructurales superiores a las de los lodos activados, permitiendo así una operación eficiente de los SBR. En este sentido, los sistemas de biomasa granular aerobia se caracterizan por presentar altas tasas de degradación de contaminantes, altas velocidades de sedimentación y la capacidad de soportar choques de carga, lo que resulta en sistemas altamente compactos que operan con cortos tiempos de residencia hidráulico (Pronk et al., 2015). En comparación con el sistema de lodos

activados, la tecnología de LAG presenta una reducción del 20-25% en los costes operativos, 23% - 40% menos de consumo eléctrico y de 50% - 75% de reducción de los requisitos de espacio (Adav et al., 2008).

2.3 Lodos aerobios granulares

Los sistemas basados en lodos aerobios granulares (LAG) han demostrado ser una alternativa atractiva para el tratamiento eficiente de aguas residuales, pues a partir de su uso es posible la eliminación simultánea de materia orgánica y nutrientes biológicos ya que los gránulos están integrados por microorganismos, anóxicos, aerobios, aerobios facultativos, lo que permite obtener nitrificación simultánea (autótrofa), desnitrificación (anóxica), y eliminación de fosfato a partir de microorganismos acumuladores de polifosfato (Pishgar et al., 2020). Adicionalmente, sus propiedades físicas de compactación y alta densidad permiten una excelente separación sólido-líquido en un reactor compacto, lo que permite omitir el tanque de sedimentación de lodos, obteniendo efluentes clarificados con bajas concentraciones de sólidos suspendidos. En resumen, los LAG presentan una buena capacidad de sedimentación, estructura compacta, alta resistencia a la toxicidad y capacidad para soportar tasas de carga orgánica de hasta $15 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (De Sousa et al., 2020) además, de que tienen la capacidad de acumular polihidroxialcanoatos (PHA).

Estructuralmente, los LAG son gránulos en los que distintos microorganismos funcionales se agregan en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), compuestos inorgánicos y minerales (Figura 1) (Adav y Lee, 2008). Los gránulos aerobios, presentan una estructura densa, que les permite sedimentar a altas velocidades. Adicionalmente, su morfología compacta presenta una alta resistencia a la difusión de sustancias tóxicas o inhibitorias al interior del gránulo, por lo que se reporta que exhiben una alta tolerancia a este tipo de sustancias (Zhang et al., 2016).

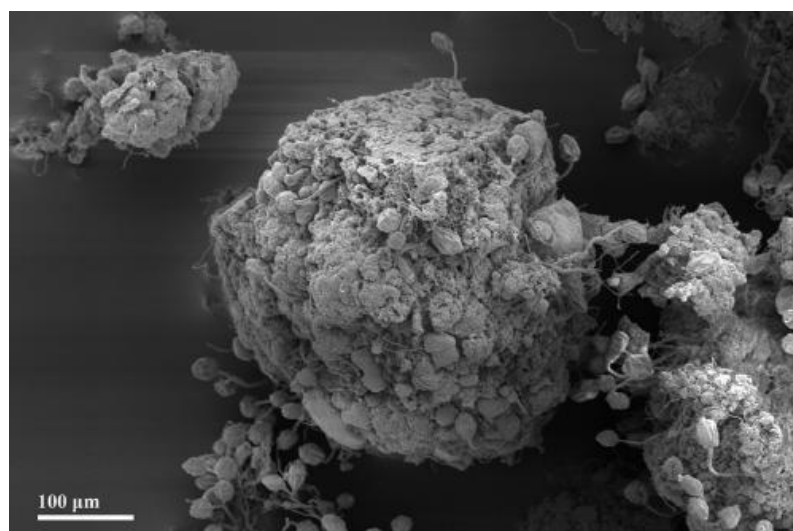


Figura 1. Estructura de un granulo aerobio formado por bacterias y sustancias poliméricas extracelulares (Pronk et al., 2017)

Para lograr cultivar LAG, se requiere aplicar distintas estrategias basadas en la aplicación de presiones de selección hidráulica y biológica (Long et al., 2014). Los factores operativos clave que promueven la granulación aeróbica en SBR consisten en la reducción gradual del tiempo de sedimentación, la operación con altas relaciones de intercambio volumétrico, breves períodos de alimentación y altas fuerzas hidrodinámicas de corte de entre 1.2 y 2.0 cm/s (Jungles et al., 2011). La aplicación conjunta de estos factores permite remover del sistema aquellos microorganismos con las menores velocidades de sedimentación, así como someterlos constantemente a condiciones de fricción hidráulica y alta turbulencia, lo que induce la formación de gránulos aerobios estables (De Sousa et al., 2020). La difusión de aire y sustrato son parámetros de importancia en el desarrollo de los gránulos, pues a medida que crecen en diámetro, la difusión de se ve limitada debido a la resistencia interna, lo que ocasiona que los microorganismos del núcleo consuman la capa de polisacárido extracelular como medida de supervivencia y entonces la estructura se debilite (Corsino, 2017).

Generalmente se considera que la biomasa ha granulado cuando el diámetro de los agregados es superior a 0.2 mm, y el sistema se considera granular completo cuando más del 80% de la biomasa está en forma de gránulos con una relación SVI30 / SVI5 superior al 90% (Liu et al., 2010).

Las diferencias entre las propiedades de los lodos activados y los lodos aerobios granulares se presentan en la Tabla 1. Como se observa el IVL es menor en el LGA, el IVL es un índice para medir el rendimiento de sedimentación de lodo activado, que puede reflejar la estructura suelta y el rendimiento de la compactación (Long et al., 2014), además de que estos tienen una mayor concentración de EPS las cuales promueven la adhesión de células y dan estabilidad a los gránulos. Estas características contribuyen para mejorar la velocidad de sedimentación de los gránulos (10- 90 m/h), la cual es considerablemente mayor a la de los lodos floculentos (2- 10 m/h) (De Sousa et al., 2018). Se ha observado que los LAG tienen la capacidad de almacenar polihidroxialcanoatos (PHA), los cuales son polímeros biodegradables, que se almacenan dentro de las células como reserva de energía (Lui y Tay 204; Gobi y Vadivelu, 2015; Tavera, 2021), estos biopolímeros son una alternativa para la sustitución de plástico de origen fósil (Kaur et al., 2017).

Tabla 1. Propiedades de los lodos activados y gránulos aerobios (Long et al., 2014)

	Contenido de agua (%)	IVL (ml/g)	SV ₃₀ /SV ₅	EPS (mg/g MLVSS)	PN/PS	MLVSS/MLSS	Ø (mm)
Lodos activados floculentos	99.3	99.7	0.6	62.6	0.34	0.56	0.13
Lodos aerobios granulares	98.4	54.9	0.94	253.7	1.56	0.69	1.61

PN/PS: relación proteína/carbohidratos; EPS: Sustancias Poliméricas Extracelulares; IVL; Índice volumétrico de lodos; MLVSS/MLSS: Relación Sólidos Suspendedos de Licor Mezclado/ Sólidos Suspendedos Volátiles de Licor Mezclado

2.4 Papel de las EPS en la formación de biomasa granular aerobia

La secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) se refiere principalmente a los productos de lisis celular e hidrólisis de macromoléculas que contienen proteínas, lípidos, ácido nucleico, y polisacáridos; pueden impulsar la agregación de microorganismos pues son un material pegajoso que funciona como pegamento promoviendo la formación de gránulos, además de que confieren estabilidad a los agregados microbianos (Li et al., 2020; Kim et al., 2014) En las EPS está presente una gran variedad de grupos funcionales de importancia para la unión de partículas, lo cual fomenta la formación de gránulos mediante interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas, con la ayuda de fuerzas hidrófobas, los flóculos de lodo se unen y establecer una estructura de red para favorecer la formación de gránulos

aeróbicos rápidamente (Deng et al., 2016). Las EPS pueden formar una capa protectora en las células, para evitar agresiones del ambiente externo, además funcionan como reserva de energía en periodos de poca disponibilidad de nutrientes (Li et al., 2002).

2.5 Producción de polihidroxicanoatos

La producción de PHA es una alternativa biotecnológica de bajo impacto ambiental que permite sustituir el uso de plásticos sintéticos. Son materiales basados en compuestos producidos mediante procesos biológicos fermentativos por distintos tipos de microorganismos (Chen, 2015).

La producción de polihidroxicanoatos es un bioproceso complejo en el que el rendimiento del producto depende de un conjunto de factores como la cepa y la ruta metabólica involucradas, parámetros de fermentación como temperatura, pH, fase de producción (metabolito secundario), fuente de carbono, y la condición de agotamiento de los nutrientes requeridos para la síntesis (Venegas y Ramírez, 2016).

Los PHA son almacenados en el citoplasma de la célula en forma de gránulos, con un diámetro en el rango de 0.2 a 0.5 μm (Kumar et al., 2020). Constan de un núcleo hidrófobo de cadenas de PHA y agua que actúan como plastificantes; este núcleo está cubierto por más enzimas hidrofílicas y proteínas estructurales que pueden formar una membrana proteica (Koller, 2018).

Estructuralmente, los PHA son poliésteres termoplásticos de monómeros de hidroxiaácido (HA) que están conectados por un enlace éster al grupo alquilo terminal de PHA (R), el cual puede variar de metilo (C1) a tridecilo (C13) (Figura 2), por lo que se han aislado más de 150 unidades de hidroxialcanoato con diferentes grupos R-terminales (Maninna et al., 2020). Las propiedades físicas de los PHA, y por ende su aplicación final, están influenciadas por la longitud de la cadena lateral y el tipo de grupo funcional, siendo los monómeros de cadena corta (SCL)-PHAs materiales rígidos altamente cristalinos mientras que los monómeros de cadena media (MCL)-PHA son materiales blandos, elásticos y viscosos (Mannina et al., 2020). Los PHA son insolubles en agua, lo que ayuda a resistir su hidrólisis, mientras que sus propiedades de hundimiento en el agua aceleran la biodegradación en ausencia de oxígeno (Kumar et al., 2020).

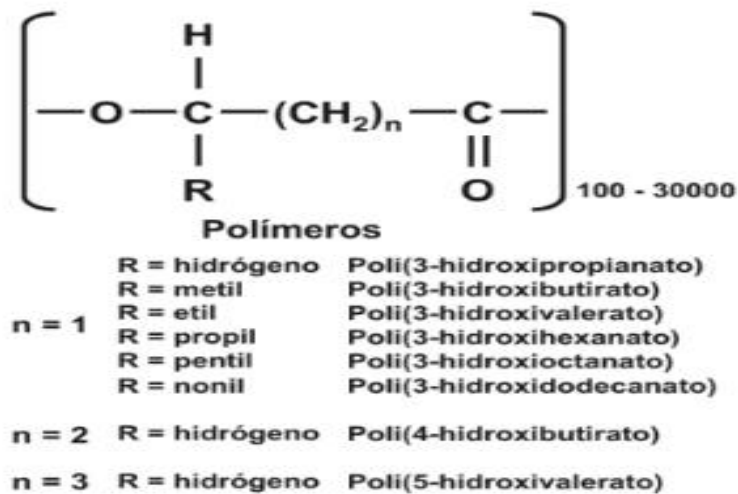


Figura 2. Estructura general de los PHA (Lee, 1996)

2.6 Síntesis de PHA

Los PHA, especialmente los polihidroxi butiratos (PHB), son sintetizados por distintos géneros de microorganismos procariotes y algunos eucariotes en condiciones de estrés, principalmente consistentes en la limitación de nutrientes (Kaur et al., 2019). La composición precisa de los PHA depende del tipo de bacteria y de la materia prima a partir de la cual se sintetizan; de hecho, hasta la fecha se han identificado ocho vías diferentes para la biosíntesis de PHA (Mannina et al., 2020). Bioquímicamente, la síntesis de PHA involucra la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, esta reacción es catalizada por β -cetotilasa (Figura 3). Posteriormente, una enzima llamada acetoacetil-CoA reductasa reduce la acetoacetil-CoA a (R) -3-hidroxi butiril-CoA, que es entonces utilizado como un monómero para polimerizar PHB por medio de la PHB sintasa.

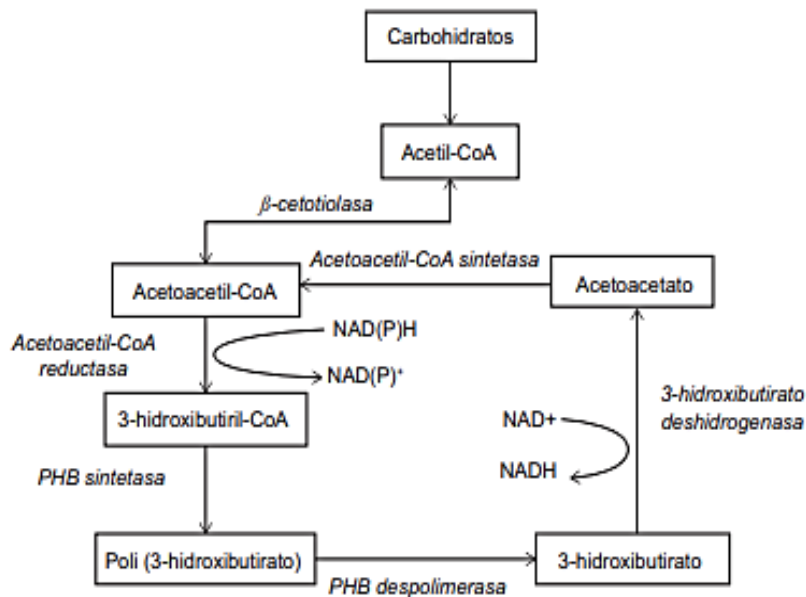


Figura 3. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos (Steinbüchel et al., 2001).

Una posible explicación a la acumulación de PHA en condiciones limitantes de nutrientes es la ruta que tome la acetil- CoA, pues esta enzima puede ser oxidada vía el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) o puede servir como sustrato para la síntesis de P3HB, esto depende de las condiciones ambientales, especialmente limitación por oxígeno, incrementando la relación NADH/NAD. La enzima citrato sintetasa y la isocitrato deshidrogenasa se inhiben por el NADH y en consecuencia la acetil-CoA no entra al CAT en la misma cantidad, por lo que es convertida a acetoacetil-CoA por la 3-cetotiolasa la que a su vez es inhibida por CoA. Cuando la cantidad de oxígeno es adecuada, la concentración de CoA es alta y la acetil-CoA entra al ciclo CAT mientras que la 3-cetotiolasa es inhibida y consecuentemente la síntesis de P3HB cesa (Kaur et al.,2017).

A nivel operativo, el proceso de producción de PHA se lleva a cabo a partir de la estrategia de alimentación dinámica aeróbica (ADF, por sus siglas en inglés) en sistemas SBR, la cual consiste en el cambio continuo en las condiciones de disponibilidad de sustrato, donde los microorganismos son expuestos alternadamente a condiciones de disponibilidad (saciedad) y ayuno de sustrato (Nancharaiyah y Reddy, 2018).

Normalmente el perfil que ilustra las curvas de tiempo de crecimiento y la producción de PHA durante la ADF consta de dos fases claramente distinguibles (Figura 4): la primera caracterizada por condiciones ricas en nutrientes (fase de saciedad), en donde se elimina el 90% de la DQO disponible y se observa el mayor incremento en el contenido de PHA y la fase de ayuno que se caracteriza por una disminución en la concentración de PHA, el cual, se utiliza como fuente de carbono para el mantenimiento de las necesidades energéticas, debido a que la fuente externa de carbono ya no está disponible para los gránulos aeróbicos (Gobi y Vadivelu 2014).

Los SBR son adecuados para operar bajo la estrategia ADF ya que durante la etapa de aereación es posible someter al cultivo a condiciones alternas de saciedad y ayuno. Esto facilita la selección de microorganismos con capacidad de acumulación PHA, los cuales almacenan este tipo de biomoléculas como fuente de sustrato y energía durante la etapa de ayuno (Gobi y Vadivelu, 2015).

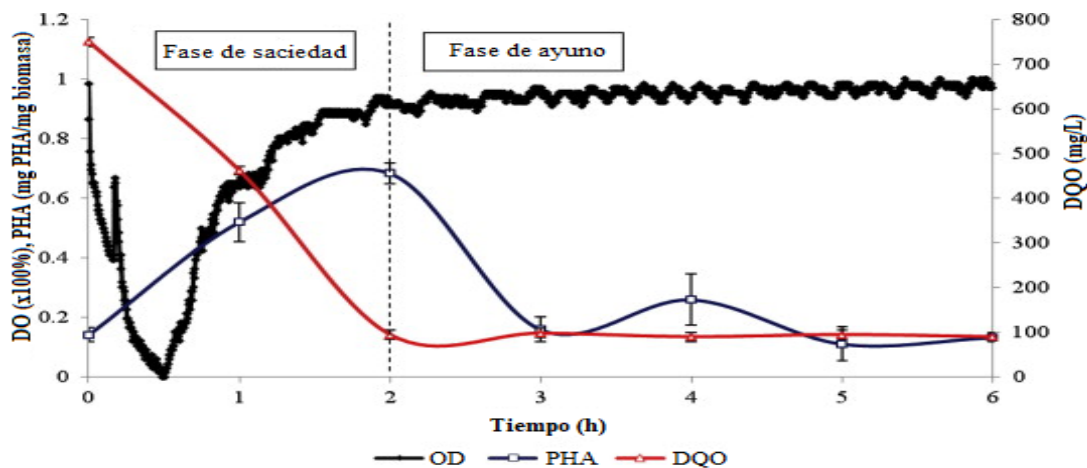


Figura 4. Perfil de crecimiento, acumulación de PHA y concentración de oxígeno disuelto respecto al tiempo en la etapa de ayuno y saciedad (Serafim et al., 2004).

La limitación de nitrógeno o fosfato da como resultado una actividad reducida de las vías anabólicas, lo que conduce a un exceso de ATP producido a partir de vías catabólicas; esto a su vez provoca la acumulación de acetil CoA, el cual es utilizado para la producción de PHA. Sin embargo, se ha observado que el agotamiento completo de un nutriente provoca el cese del crecimiento, por lo que se tiene que tomar en cuenta este efecto en el proceso de operación del reactor (Koller et al, 2020).

2.7 Sustratos utilizados en la producción de PHA

Uno de los factores de mayor impacto en el costo de producción de biopolímeros en forma de PHA es el tipo de sustrato utilizado (Kaur et al., 2017). La composición del sustrato es un factor clave en la acumulación de PHA; normalmente los sustratos puros más empleados son la glucosa y los ácidos grasos volátiles. Por ejemplo, la formación de PHA que consiste en monómeros que no son 3-hidroxybutirato (3HB) requiere ácidos grasos como precursores para la formación de otros monómeros SCL o MCL (Chen et al., 2020).

Inicialmente, los estudios en la producción de PHA estuvieron centrados en la utilización de medios sintéticos de alta pureza, ricos en sales de aniones de ácidos grasos volátiles, tales como el acetato, butirato, valerato, etc. (Kumar et al., 2020). Sin embargo, esto disminuía significativamente la rentabilidad del proceso de producción, por lo que se han buscado nuevas alternativas, evaluando la utilización de distintos medios residuales, como fuentes de sustrato.

Las melazas presentan una composición fisicoquímica que favorece el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* las cuales pueden acumular PHA a partir de alcanos, alquenos, alcoholes y ácidos carboxílicos (Venegas y Ramírez, 2016). Otros sustratos utilizados son los residuos lignocelulósicos, los cuales requieren pasos de pretratamiento / hidrólisis para liberar los azúcares que son posteriormente metabolizados por los microorganismos para producir los bioplásticos (González et al., 2013), así como los subproductos de la industria de glicerol, los cuales han sido utilizados para la producción de PHA con cultivos de *Pseudomonas putida* KT2442 (Solaiman et al., 2006).

Los aceites vegetales inducen altos coeficientes de rendimiento de biomasa celular y producción de PHA (0.6 a 0.8 g de PHA por g de aceite) debido a su mayor contenido de carbono por peso en comparación con los azúcares. Se sabe que diversas especies de bacterias producen PHA a partir de aceites vegetales como *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Cupriavidus necator*, Así mismo, la vinaza, un residuo altamente contaminante de la industria del etanol, ha sido utilizada para la producción de PHA por la arquea extremadamente halófila, *Haloferax mediterranei* (Kumar et al., 2020).

A pesar de que se han utilizado múltiples fuentes residuales altamente concentradas en materia orgánica para la síntesis y acumulación de PHA, una opción sustentable consistiría en el uso de aguas residuales municipales, las cuales se producen en grandes volúmenes en zonas rurales y urbanas. De esta forma, el tratamiento de este tipo de efluentes en sistemas biológicos de biomasa suspendida, como los de LAG, permitiría no sólo su estabilización y depuración, sino su aprovechamiento como fuente de sustrato para la generación de productos de valor agregado, como los PHA.

2.8 Aguas residuales municipales como fuente de sustratos para la producción de PHA.

Las actividades humanas que requieren el uso de agua producen como desecho aguas residuales, las cuales se caracterizan por tener disueltas o en suspensión sustancias químicas, partículas o microorganismos que deterioran la calidad del agua de los ríos, lagos, presas o zonas costeras en donde se descargan, sobre todo si no se tratan adecuadamente para remover las sustancias o elementos potencialmente perjudiciales. Se estima que a nivel mundial entre 80 y 95% del agua residual se descarga directamente a los ríos, lagos y océanos sin recibir tratamiento previo (Conagua, 2017). Las aguas residuales municipales son generadas en los núcleos de población, provienen de las viviendas, edificios públicos y son colectadas en los sistemas de alcantarillado urbanos y rurales. Las aguas residuales municipales contienen distintos tipos contaminantes en intervalos abiertos de concentración: nitrógeno (20- 85 mg/L), fósforo (4- 15 mg/L), demanda química de oxígeno (DQO) (250- 1000 mg/L), bacterias coliformes fecales (10^6 - 10^9 NMP/100 mL) (Metcalf y Eddy, 1996).

En el año 2019 se descargaron 7.9 (millones de $\text{hm}^3/\text{año}$) de aguas residuales, de los cuales se recolectaron en el alcantarillado 6.79 (millones de $\text{hm}^3/\text{año}$) y se trataron 4.46 millones de $\text{hm}^3/\text{año}$ a un caudal de 141.48 (m^3/S), (Figura 5), lo que generó una carga contaminante de 2.13 millones de toneladas de DBO_5 y se removieron en los sistemas de tratamiento 0.96 millones de toneladas (Conagua, 2019).

Debido a lo anterior, se buscan opciones de tratamiento para minimizar las descargas de aguas residuales y mitigar los peligros de contaminantes (Rashid et al., 2021). Debido a su composición, la producción de PHA a partir de este tipo de efluente proporciona una alternativa económicamente viable, por su composición fácilmente

fermentable y se ha reportado que usando aguas residuales como sustrato se ha acumulado hasta 50 % de PHA en peso seco celular (Liu et al., 2011).

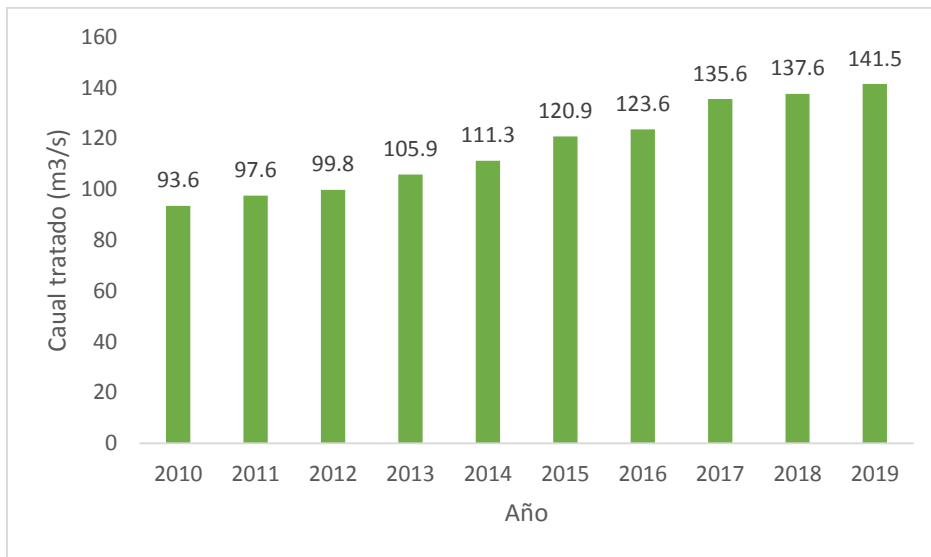


Figura 5. Caudal de agua tratado (2010-2019) Conagua, 2019

2.9 Cultivo de biomasa granular aerobia para la acumulación de PHA

Las primeras investigaciones sobre la síntesis de PHA se llevaron a cabo utilizando como inóculo cepas puras de microorganismos con capacidad de acumulación de biopolímeros (Kaur et al. 201). Sin embargo, una alternativa reciente es la síntesis a partir de cultivos mixtos, debido a su condición de fermentación simplificada (Chen et al., 2015). Los cultivos mixtos aplicados en la síntesis de PHA consisten generalmente de lodos provenientes del tanque de aireación en sistemas de lodos activados, los cuales contienen agregados de microorganismos en forma de flóculos, con bajas propiedades de compactación y sedimentación. Una alternativa para potencializar la producción de PHA consiste en el uso de biomasa con mayores propiedades de compactación y sedimentación, como los lodos aerobios granulares (Figura 6).

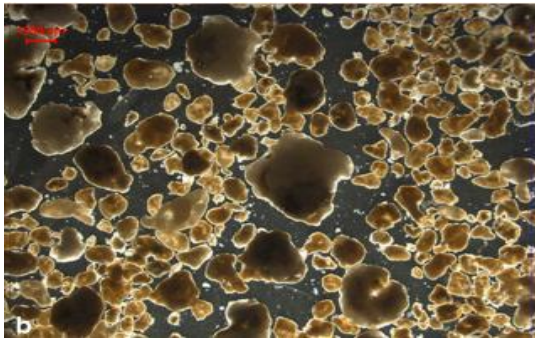


Figura 6. Vista estereoscópica de lodos aerobios granulares (Bueno, 2020)

Los microorganismos que acumulan PHA generalmente son seleccionados a partir de la aplicación de la estrategia de alimentación dinámica aeróbica (ADF) (Serafim et al., 2004). La estrategia ADF también se utiliza para el cultivo de LAG en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Vjayan y Vadevelu, 2017), pues ha sido reportado que la existencia de fases de ayuno de sustrato permite la selección de microorganismos acumuladores de fosfatos y glucógeno, los cuales brindan una alta estabilidad estructural a los lodos granulares (Pronk et al., 2015).

La aireación constituye la variable de mayor demanda de energía en la producción de PHA basada en la estrategia ADF por biomasa granular, pues se requiere oxígeno para la degradación del sustrato y acumulación de PHA, así como para producir las fuerzas de corte hidrodinámicas necesarias para la granulación aeróbica (Gobi y Vadivelu, 2015). No obstante, la reducción de la aereación durante el período de ayuno puede contribuir a importantes reducciones de energía y costos para la producción comercial de PHA (Vjayan y Vadevelu, 2017).

Al cultivar gránulos aerobios en un SBR, el tamaño del granulo es de gran importancia, ya que la producción de PHA es totalmente dependiente de la difusión de sustrato. El proceso de difusión que ocurre en gránulos aerobios pequeños es más rápido y produce un mayor contenido de PHA (Gobi y Vadivelu, 2015). Mientras que en gránulos más grandes el área de contacto eficaz del sustrato es limitada, solamente las células en el límite están directamente expuestas al sustrato, se espera que estas células acumulen mayor cantidad de PHA. Por otro lado, los microorganismos en el núcleo de los gránulos tienden a sintetizar más productos de almacenamiento para mantener la actividad metabólica, debido a la baja disponibilidad de sustrato (Corsino, 2017), por lo que, la acumulación de PHA por las células debajo de la primera capa depende de la

difusión del sustrato. En consecuencia, con un número limitado de células que participan en el proceso de acumulación de PHA en gránulos grandes, la cantidad de PHA que se acumula disminuye en comparación con pequeños gránulos. (Gobi y Vadivelu, 2015). Es de gran interés el uso de gránulos aeróbicos por su alta eficiencia en el tratamiento de aguas residuales y su potencial en acumulación de PHA a partir de las mismas (Zahang et al., 2015).

3. Justificación

Las aguas residuales contienen contaminantes que afectan la calidad del ambiente y representan un riesgo a la salud humana cuando son descargadas directamente sobre los cuerpos receptores. Debido a ello, es necesario su depuración a partir de la operación de sistemas de tratamiento robustos y eficientes que permitan generar efluentes que cumplan con los límites máximos permisibles establecidos en la normativa vigente. En México, en el año 2019 se descargaron 7.9 millones de hm^3 de aguas residuales, de los cuales se recolectaron en el alcantarillado 6.79 millones de hm^3 y se trataron 4.46 millones de hm^3 a un caudal de 141.48 m^3/s , generando una carga contaminante de 2.13 millones de toneladas de DBO_5 , de las cuales se removieron en los sistemas de tratamiento 0.96 millones de toneladas (CONAGUA, 2019).

En la actualidad el sistema de tratamiento biológico convencional más utilizado es el de lodos activados, sin embargo esta tecnología presenta diversas desventajas, entre las que resaltan una alta demanda de área para su instalación debido al requerimiento de la implementación de sedimentadores primarios y secundarios, un costo elevado del proceso debido a las altas demandas energéticas, así como la operación con biomasa floculenta con bajas velocidades de sedimentación (2-10 m/h) y un tamaño de partícula menor a 0.2 mm (De Sousa et al., 2018). Debido a esto, se ha dado impulso al desarrollo de nuevas tecnologías con mejores características, como los sistemas basados en LGA, los cuales presentan altas propiedades de sedimentación y compactación, así como la capacidad de remoción de los contaminantes presentes en las aguas residuales a una alta tasa, bioconvirtiéndolos y almacenándolos en forma de biopolímeros dentro del citoplasma celular. La producción de biopolímeros en forma de PHA en lodos aerobios granulares usando como sustrato aguas residuales municipales,

representa una opción sustentable para el reemplazo de plásticos y productos poliméricos de origen fósil cuya disposición en el ambiente después de su uso genera un grave problema de contaminación ambiental.

Con base en lo anterior, el presente trabajo analiza el proceso de cultivo de biomasa granular y su capacidad de acumulación de polihidroxialcanoatos en un reactor de lotes secuenciado (SBR), utilizando como influente aguas residuales municipales.

4. Objetivo General

Evaluar el proceso de granulación de la biomasa y su capacidad de acumulación de biopolímeros en forma de PHA en un SBR alimentado con aguas residuales municipales.

4.1. Objetivos particulares

- Determinar la composición fisicoquímica las aguas residuales municipales utilizadas como influente.
- Evaluar el proceso de granulación de la biomasa bajo distintas condiciones de operación en el SBR.
- Analizar la capacidad de acumulación de PHA en la biomasa aerobia granular.

5. Hipótesis

La estructura compacta de los lodos aerobios granulares permitirá obtener mayores rendimientos de acumulación de biopolímeros que los observados en la biomasa floculenta, esperando rendimientos de entre 10- 40 % de PHA/ g de PCS.

6. Metodología y técnicas analíticas

El presente proyecto analiza la operación de un reactor de lotes secuenciado (SBR) sometido a distintas presiones de selección para lograr el cultivo de biomasa granular aerobia partir de un inóculo de lodos floculentos. La metodología desarrollada se muestra en el siguiente diagrama de bloques (Figura 7)

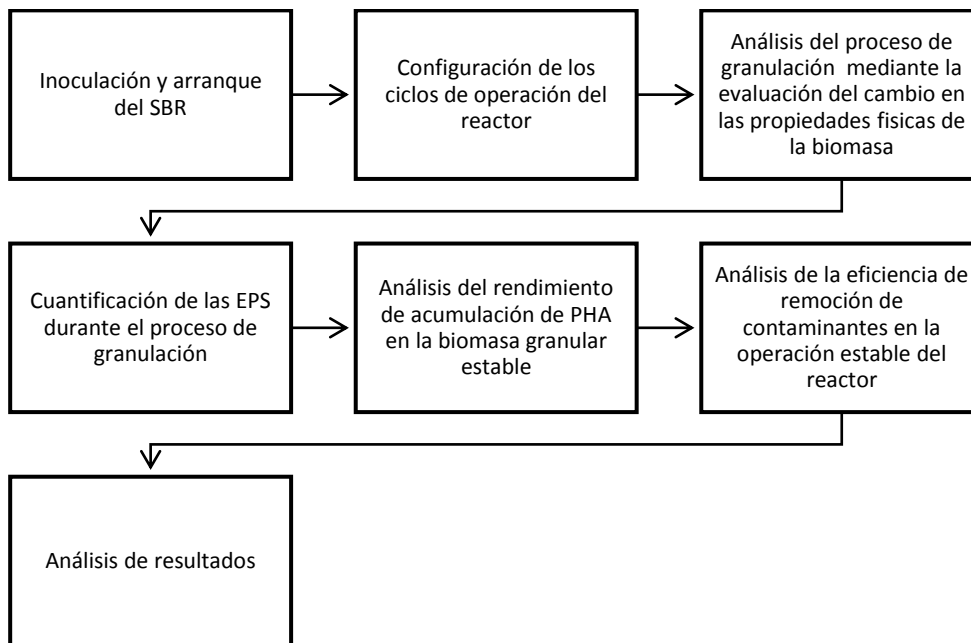


Figura 7. Diagrama de actividades

6.1 Reactor para la producción de biomasa granular

El SBR consistió en una columna de acrílico (Figura 8) con una relación altura diámetro (H/D) de 10, con un volumen de 2.8 L. El reactor se mantuvo aireado durante la etapa de reacción. El flujo de aireación aplicado fue de 3.8 L/min y un coeficiente de transferencia de oxígeno (kLa) de 0.038 min, alcanzando una concentración de oxígeno disuelto de 6.94 ± 0.01 mg/L

El SBR trabajó en ciclos consecutivos integrados por etapas de alimentación anaerobia, aireación, sedimentación y descarga. La configuración de los ciclos y la duración de cada una de las etapas se describe en la Tabla 2. Durante la operación del SBR, se mantuvo una relación de intercambio volumétrico del 50%. El efluente fue drenado a partir de un puerto colocado a la mitad de la altura de trabajo (Figura 8).

Para inducir la granulación de la biomasa se aplicó una estrategia de reducción gradual en el tiempo de sedimentación, con la cual se logró la retención de las partículas de biomasa más densas dentro del sistema y el lavado de las partículas con las menores propiedades de sedimentación. Esta estrategia se complementó con la inclusión de periodos de ayuno de sustrato durante la fase de aeración y con la aplicación de una alta velocidad superficial de flujo de aire de 1.43 cm/s, lo que genera condiciones de estrés para la secreción de EPS microbianas que permiten la autoadhesión de los microorganismos en núcleos densos para evitar su lavado del sistema. Se considera que la aplicación de estos parámetros en conjunto permite la formación de biomasa granular aerobia estable.

Tabla 2. Configuración de los ciclos de operación del SBR

	Fase de arranque	Fase de operación estable
Ciclo (h)	4	3
Llenado anaerobio (min)	10	10
Reacción aerobia (min)	210	155
Sedimentación (min)	10	5
Descarga (min)	10	10

6.1.1 Inóculo e influente

El reactor se alimentó con aguas residuales municipales provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) “Cerro de la Estrella” en la Alcaldía Iztapalapa con una concentración promedio de 265.98 ± 168.28 mg de DQO/L. Las muestras fueron obtenidas a partir del cárcamo de bombeo de la PTAR, posteriormente fueron transportadas al laboratorio para el análisis de su composición fisicoquímica y almacenadas a una temperatura de 3 ± 2 °C.

Para su arranque, el reactor fue inoculado con una muestra de lodos activados floculentos proveniente de la misma PTAR, la cual se concentró a para su arranque a un valor de 2.86 g-SSV/L.

6.2 Operación de un SBR a distintos ciclos de operación y variantes de aereación

Se realizó un segundo experimento en el mismo reactor, operándolo bajo los mismos valores de los parámetros de aeración y volumen de intercambio que el experimento anterior. Sin embargo, en este segundo experimento se prolongó la duración de la

etapa de alimentación anaerobia para favorecer la hidrólisis del sustrato en forma particulada y el posterior consumo de los productos de solubilización. Así mismo, se incrementó el tiempo de duración de la fase de aireación con respecto al primer experimento en diferentes etapas de operación con la finalidad de analizar la influencia de este parámetro en el proceso de granulación y las propiedades de la biomasa.

6.2.1 Configuración del reactor

Se utilizó el mismo reactor que en el experimento anterior, el cual se inoculó con una muestra de lodos activados proveniente de la PTAR cerro de la estrella. El reactor operó bajo las mismas presiones de selección, sin embargo, la duración de los ciclos durante la etapa de arranque se acortó a sólo 2 h, considerando un tiempo de llenado anaerobio de 27 min, resultando en un corto periodo de ayuno (Tabla 3). Posteriormente, la duración de los ciclos se fue aumentando, hasta llegar a un total de 6 horas en la etapa III. Durante el experimento se analizaron los mismos parámetros descritos en el primer experimento previo para evaluar el proceso de granulación y el desempeño del sistema de tratamiento en la remoción de contaminantes.

Tabla 3. Configuración de los ciclos de operación del SBR

Días de operación	Etapa I (0-41)	Etapa II (42-55)	Etapa III (56-82)
Ciclo (h)	2	3	6
Llenado anaerobio (min)	27	27	27
Reacción aerobia (min)	73	139	320
Sedimentación (min)	10	4	3
Descarga (min)	10	10	10

6.3 Técnicas analíticas

Durante el desarrollo del experimento se evaluó la evolución en las propiedades de la biomasa a partir de la determinación del índice volumétrico de lodos (IVL) y la velocidad de sedimentación (Vsed) de acuerdo con APHA (1998), así como la densidad con base en el método propuesto por Beun et al. (2002). Por otra parte, la identificación de los PHA se llevó a cabo a partir del método espectrofotométrico propuesto por Gobi y Vadivelu (2015) (Tabla 4).

Tabla 4. Técnicas analíticas para la determinación de los parámetros

Parámetro	Referencia o instrumento
Caracterización de aguas grises y tratadas	
DQOt, DQOs, P-PO ₄ ³⁻ , SST, N-NH ₄ ⁺	APHA (1998)
Surfactantes aniónicos	Jurado et al., (2006)
Propiedades físicas de la biomasa	
Índice volumétrico de lodos (IVL)	APHA (1998)
Velocidad de sedimentación	APHA (1998)
Densidad de biomasa	Beun et al., (2002)
Composición de la biomasa	
EPS (SMP-eEPS)	Le-Clech et al., (2006)
Morfología	
Microscopía óptica	Cámara digital
Acumulación e identificación de biopolímeros	
	Gobi y Vadivelu (2015)

El análisis y cuantificación de sustancias poliméricas extracelulares se llevó a cabo de acuerdo con el método de extracción por calentamiento en dos pasos descrito por Le-Clech *et al.* (2006), evaluando el contenido de proteínas y carbohidratos. Para la determinación se toma una muestra de sólidos solubles de licor mezclado, y se centrifuga 25 minutos a 3000 rpm; el sobrenadante se filtra (1.2 µm) para obtener los productos microbianos solubles; al sedimento se le agrega agua desionizada y se mezcla durante 10 minutos para re suspender la biomasa, posteriormente la solución se calienta durante 10 minutos a 80 °C y se centrifuga a 3000 rpm durante 25 minutos, el sobrenadante se filtra (1.2 µm) para así obtener las sustancias poliméricas extracelulares ligadas al gránulo, como concentración de carbohidratos y proteínas (Anexo 2), midiendo las absorbancias a 490 nm y 660 nm, respectivamente .

La determinación de la acumulación de PHA en la biomasa del SBR se evaluó con base a la metodología reportada por Gobi y Vadivelu (2015). Por cada 10 mL de licor mezclado se adicionaron 5 gotas de formaldehído al 7%, posteriormente se secó la muestra a 150 °C por 24 horas en un crisol, se raspó la muestra seca y homogenizó en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se pesaron por duplicado muestras de 160 mg, y se transfieren a botellas serológicas. Para la digestión de las células se agregaron 1.1

mL de hipoclorito y 1 mL de cloroformo por cada 20 mg de biomasa seca, se sellaron las botellas serológicas con una capa de teflón, una de Parafilm y una segunda capa de teflón. Se agitó en un agitador orbital por 2.5 horas a 200 rpm a 30 °C. Posteriormente, se transfirió la muestra a tubos de centrifuga y se centrifugó por 15 min a 6000 rpm, se formaron tres capas; la primera de hipoclorito, la segunda de restos celulares y la tercera de cloroformo enriquecido con PHA. Se recuperó la fase de cloroformo y se transfirió a una botella serológica a peso constante, se adicionaron 2 gotas de metanol hasta formar un precipitado. Se selló nuevamente con teflón, Parafilm y una segunda capa de teflón y se refrigeró por 24 horas, posteriormente se agregaron 2 gotas de metanol, se calentó a baño maría a 60 °C hasta llegar a evaporación (Anexo 1).

7. Resultados

7.1 Reactor para la producción de biomasa granular

7.1.1 Caracterización del influente

Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de 17 lotes distintos de agua residual utilizados como influente para el SBR durante todo el proceso experimental (Tabla 6). El contenido promedio de materia orgánica en forma de demanda química de oxígeno total (DQO_T) coincide con el valor promedio reportado por Tchobanoglous et al. (2003) para aguas residuales municipales de baja concentración. Sin embargo, se observó que la DQO soluble representa sólo el 34.2 % de la DQO total, lo que indica que existe una alta fracción de sustrato en forma particulada que podría afectar el desempeño del sistema de tratamiento. En cuanto a las concentraciones promedio de amonio 37.59 ± 16.57 mg/L y fosfato 6.73 ± 1.91 mg/L, están dentro de los intervalos observados por Guimaraes et al. (2017), lo que corresponde a altas concentraciones de estos contaminantes; esta característica puede contribuir a la formación de gránulos. La caracterización fisicoquímica de los diferentes lotes de agua residual muestra una alta variabilidad en su composición, lo cual se debió a la variación en la concentración de los nutrientes inducida por los cambios estacionales pues, en temporada de lluvias esta concentración disminuyó considerablemente. En este sentido, se puede observar en la Tabla 5 que la concentración total de materia orgánica disminuyó considerablemente en temporadas de lluvias en comparación con el promedio en épocas de secas, lo cual puede ser un factor que afecte el proceso de operación del sistema debido a la escasez de fuente de sustrato en el influente.

Tabla 5. Caracterización del agua residual

Parámetro	Unidades	Secas	Luvias	Promedio
DQO total	mg DQO _T /L	360.87 ± 183.4	148.55 ± 49.81	265.98 ± 168.28
DQO soluble	mg DQO _S /L	103.7 ± 36.26	67.11 ± 20.78	83.41 ± 38.91
Amonio	mg N-NH ₄ ⁺ /L	47.70 ± 17.79	27.60 ± 11.2	37.59 ± 16.57
Fosfato	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	7.54 ± 1.70	5.26 ± 1.42	6.73 ± 1.91
Surfactantes	mg Surfactantes/L	7.24 ± 3.35	5.83 ± 3.62	6.53 ± 3.34
SST	mg SST/L	246.72 ± 233.1	93.07 ± 71.07	156.63 ± 148

7.1.2 Desempeño del sistema de tratamiento en la remoción de contaminantes

El reactor operó por un periodo total de 120 días, durante los cuales se evaluó su desempeño con respecto a la remoción de contaminantes. En el caso de la remoción de DQO total fue del 83.2%, valor cercano al obtenido por Coma et al. (2012), obtenidos en un SBR para la producción de polihidroxicarboxilatos. Así mismo, se observó un alto desempeño en la remoción de sustrato en forma particulada, con una eficiencia de remoción de sólidos suspendidos totales (SST) del 83.2 % (Tabla 6). Las altas eficiencias de remoción de materia particulada es una característica típica reportada para los sistemas de LAG, en los cuales el sustrato particulado es hidrolizado en la superficie de los gránulos, convirtiéndose en productos solubles que son almacenados intracelularmente en forma de polímeros. Este proceso se ve especialmente favorecido cuando la hidrólisis se lleva a cabo durante la etapa de llenado anaerobio (Pronk et al., 2015), pues cuando la hidrólisis se lleva a cabo bajo condiciones aerobias, los productos solubilizados son consumidos localmente en la parte externa de los gránulos, evitando con ello su difusión a las partes internas, con lo que se debilita la estructura granular y se afecta el proceso de acumulación de biopolímeros.

Por otra parte, se observó una baja remoción de especies fosfatadas, las cuales bajo condiciones óptimas de operación pueden alcanzar valores superiores al 90% en sistemas granulares (Aday et al., 2008). Posiblemente, este comportamiento estuvo relacionado con los cortos periodos de alimentación anaerobia aplicados durante los ciclos de operación (10 min), pues se ha reportado que periodos anaeróbicos cortos en el proceso provocan acumulación de nitritos en el reactor y bajas remociones de fosfatos (De Sousa et al., 2020). En el caso contrario, la aplicación de extensos periodos de llenado anaerobio favorece la selección de bacterias acumuladoras de glucógeno y fosfatos, las cuales contribuyen especialmente en la producción de biopolímeros en forma de PHA y en la remoción de especies fosfatadas. Así mismo, se favorecen procesos de hidrólisis que pueden contribuir a incrementar la remoción de sustrato nitrogenado en forma compleja.

Tabla 6. Eficiencia de remoción de contaminantes en el SBR

Parámetro	Influyente (mg/L)	Efluente (mg/L)	Eficiencia (%)
DQO total	265.98 ± 168.28	39.7 ± 25.9	83.2 ± 11.2
DQO soluble	107.2 ± 3.6	29.8 ± 21.4	60.1 ± 22.1
Surfactantes	7.6 ± 3.6	1.3 ± 0.6	74.1 ± 18.1
Amonio	52 ± 10.4	8.6 ± 9.7	80.5 ± 20.2
Fosfato	7.3 ± 1.4	3.5 ± 0.5	43.5 ± 13.7
SST	156.63 ± 148	19.6 ± 16.6	83.2 ± 17.2

7.1.3. Formación de biomasa granular aerobia

El reactor fue inoculado con lodos activados provenientes de la PTAR “Cerro de la Estrella”, con una concentración de 2.86 g de SSV/L. Después de la inoculación se aplicaron presiones de selección hidráulicas y biológicas adecuadas para el crecimiento de biomasa granular aerobia, entre las que resaltan la aplicación de altas fuerzas de corte de 1.43 cm/s, largos periodos de ayuno y la disminución gradual del tiempo de sedimentación. Esto provocó un intenso lavado de la biomasa con las propiedades de sedimentación más pobres en los primeros 15 días de operación, permitiendo la retención de las partículas más densas dentro del sistema, alcanzando una velocidad de sedimentación promedio de 13.5 ± 3 m/h, valor que se mantuvo relativamente estable hasta finalizar el experimento (Figura 9). A partir de esta estrategia se logró observar los primeros gránulos a los 10 días de operación, de tal forma que para este día la biomasa estuvo constituida por una mezcla de flóculos y gránulos (Figura 10 (b)). Estos primeros gránulos sirvieron como núcleos para el crecimiento de gránulos estables, por lo que con el transcurso de los días de operación se observó un crecimiento en la fracción y tamaño de los gránulos (Figura 10 (c)). Este fenómeno sucedió cuando los ciclos de operación aplicados fueron de 4 h, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Liu y Tay, 2006, quienes, al comparar diferentes tiempos de ciclo, observaron la formación de gránulos estables y de buen tamaño (>2mm) en periodos 4 horas de duración.

A pesar de observar el crecimiento de gránulos estables en un corto tiempo, la concentración de biomasa dentro del reactor se mantuvo baja después del lavado intenso de las partículas ligeras observado durante los días arranque (Figura 9). Este fenómeno se debió a la baja concentración de sustrato en las aguas (0.148 g DQO/L) durante los días 63-120, que correspondieron con días de muestreo en épocas de lluvia, de tal forma que durante dicho periodo la concentración de contaminantes se encontraba considerablemente diluida, lo que limitó el crecimiento de los microorganismos. Adicionalmente, el influente presentó un porcentaje promedio de DQO particulada de 65.8 % (Figura 11), por lo que se infiere que las bajas concentraciones de sustrato soluble, fácilmente biodegradable, contribuyeron o limitaron el crecimiento de la biomasa granular aerobia (Metcalf y Eddy., 1996). En sistemas de este tipo, el sustrato particulado se hidroliza principalmente en la superficie de los gránulos, limitando la difusión del sustrato al núcleo de los gránulos (Pronk et al., 2015). En conjunto, se considera que estos factores evitaron el crecimiento de la biomasa, manteniendo valores de concentración de biomasa dentro del reactor cercanos a 0.3 g de SSV/L durante la mayor parte de la experimentación.

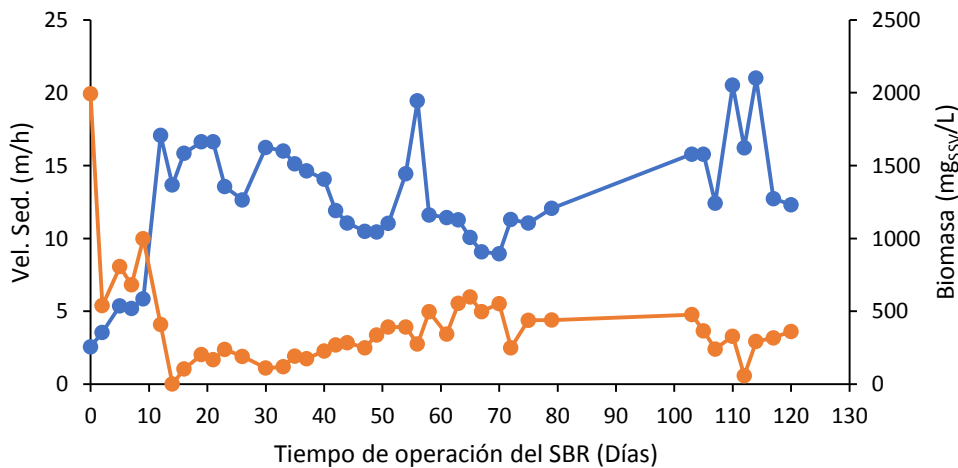


Figura 9. Perfil de la velocidad de sedimentación (●) y concentración de biomasa dentro del reactor (●).

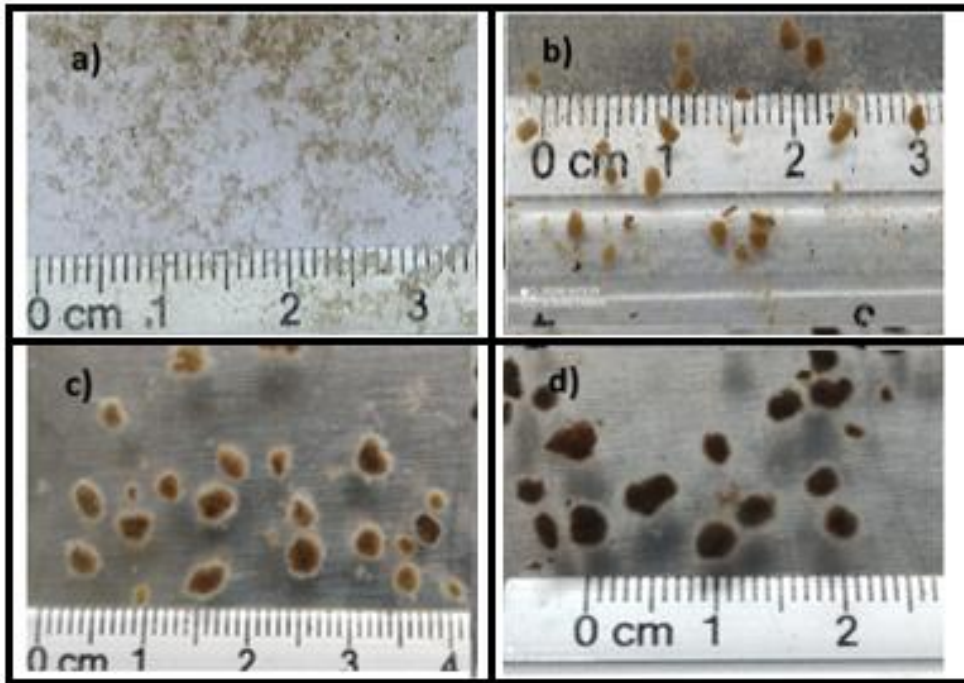


Figura 10. a) Inóculo, b) Biomasa día 10, c) Biomasa día 45 y d) Biomasa día 120

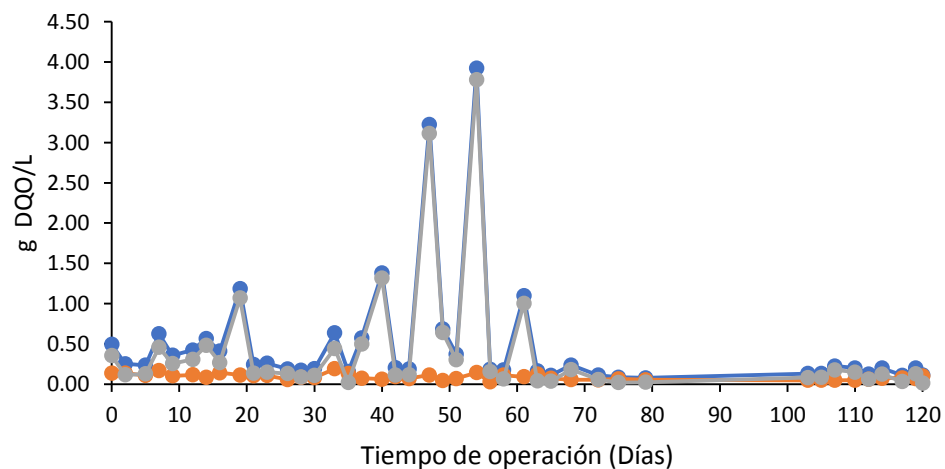


Figura 11. Perfil de concentración de DQO total (●), soluble (●) y particulada (●)

A partir de los primeros 10 días de operación la velocidad de sedimentación se estabilizó, alcanzando un valor promedio de 13.53 ± 3.02 m/h. En cuanto al IVL, se observó una mejora considerable, alcanzando un valor promedio de 132.16 mL/g-SST (Figura 9, Tabla 8). Estas mejoras en las propiedades de sedimentación y compactación

de la biomasa coincidieron con la aparición de los primeros gránulos durante el mismo periodo, lo que indica que las presiones de selección a las que se sometió la biomasa contribuyeron a la formación de gránulos con propiedades considerablemente mayores que las observadas en la biomasa floculenta utilizada como inóculo (Tabla 7).

Por otra parte, se observó una acumulación de 13.23 % de PHA/ g de PCS en la muestra de biomasa usada como inóculo; valor que no se esperaba encontrar pues esta biomasa proviene de un sistema de lodos activados en el que el influente es alimentado de forma continua, por lo que la biomasa no es sometida a periodos de ayuno que induzcan a la acumulación de biopolímeros. Sin embargo, las bajas concentraciones de contaminantes observadas en el agua residual indican que el sistema de tratamiento operó bajo condiciones limitantes de sustrato, lo que posiblemente indujo la selección de microorganismos acumuladores de PHA. Con respecto a estos resultados, se observó un incremento del 3% en la capacidad de acumulación de biopolímeros de biomasa granular aerobia, el rendimiento es bajo, lo que también se atribuye a las bajas concentraciones de biomasa. Sin embargo, es importante indicar que el análisis de cuantificación de PHA en la biomasa granular realizó una sola vez, debido a la limitante que representó la baja concentración de biomasa en el reactor.

Tabla 7. Propiedades de la biomasa

Parámetro	Unidades	Inóculo	Biomasa granular (Día 10-120)
Concentración de biomasa	g-SSV/L	2.86	0.361 ± 0.136
IVL	mL/g-SST	185.6	132.16 ± 57.43
Velocidad de sedimentación	m/h	2.6	13.53 ± 3.02
PHA	% PCS	13.23	16.042

PSC: Peso Seco Celular

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) provocan la adhesión y agregación de las células, lo que acelera significativamente la granulación de la biomasa (Zhang et al.,2016), por tanto, el aumento en la concentración de las EPS se correlaciona con la formación de gránulos estables. En el presente trabajo, la concentración de EPS en la biomasa granular aerobia presentó un aumento casi 10 veces mayor con respecto a la

concentración del inóculo (Tabla 8). Se puede observar que el mayor incremento se dio en los primeros 20 días de operación (Figura 12), lo que concuerda con la formación de los gránulos y la estabilidad de estos, y demuestra que el incremento en la concentración de EPS favoreció el proceso de granulación. La caracterización de las EPS mostró una relación $PN/PS > 1$, lo que resulta una característica positiva para la formación y la estabilidad de los gránulos, pues las proteínas contribuyen mayormente al aumento de la hidrofobicidad reduciendo las repulsiones electrostáticas (Li et al., 2006; Corsino et al., 2017).

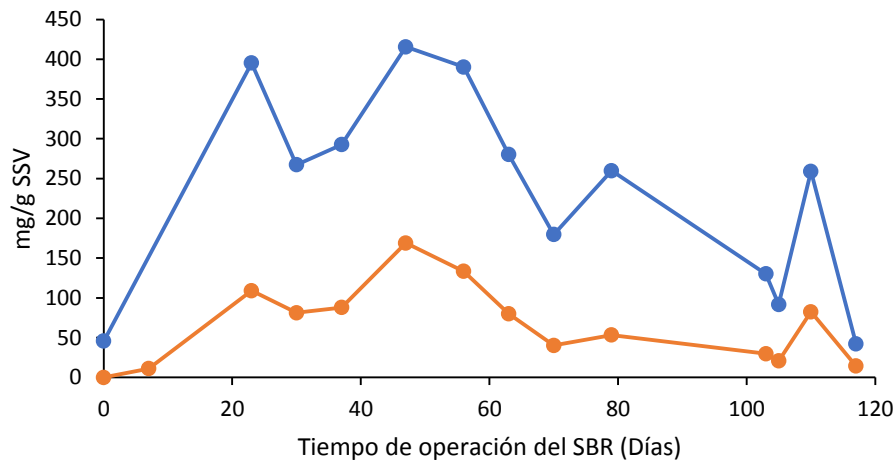


Figura 12. Sustancias poliméricas extracelulares, perfil de concentración de proteína (●) y concentración de carbohidratos (●)

Tabla 8. Concentración de EPS en el inoculo y en La biomasa granular aerobia

EPS (mg gSSV ⁻¹)	Arranque	Biomasa Granular
Proteína soluble (SMP)	1.06	29.25 ± 30.77
Proteína (eEPS)	45.54	267.88 ± 126.25
Carbohidratos solubles	0.05	286.70 ± 112.52
Carbohidratos (eEPS)	0.00	27.56 ± 22.84
Proteínas totales	47.15	315.95 ± 128.87
Carbohidratos totales	0.05	104.03 ± 14.73
EPS (SMP)	1.66	53.06 ± 35.76
EPS (eEPS)	45.64	363.18 ± 142.68
EPS totales	47.20	419.99 ± 168.45

7.2 Operación de un SBR a distintos ciclos de operación y variantes de aireación

7.2.1 Caracterización del influente

Durante el desarrollo del primer experimento se observó la formación y crecimiento de biomasa granular en un periodo considerablemente corto (20 días). Sin embargo, las condiciones de operación no permitieron el crecimiento de en la concentración de biomasa por encima de un valor de 0.3 g-SSV/L después del día 10 de operación, lo que afectó la estabilidad operacional del sistema. Como se indicó previamente, es posible que este fenómeno se haya debido a la baja concentración de sustrato en el agua residual utilizada como influente, así como a la alta fracción de material particulado contenida en el mismo, el cual tiene que ser inicialmente hidrolizado para poder ser aprovechado por los microorganismos.

Con base en lo anterior, se llevó a cabo un segundo experimento aplicando las mismas condiciones de flujo de aireación y volumen de intercambio que en el experimento previo. Sin embargo, se incrementó el tiempo de duración de la etapa de llenado anaerobio a 27 minutos y se varió el tiempo de aireación en etapas, lo que resultó en ciclos iniciales de 2 h de duración, que se incrementaron hasta un valor de 6 h en el curso de 11 semanas (Tabla 9). El experimento fue diseñado para evaluar el efecto del incremento en la etapa de ayuno sobre las propiedades de la biomasa y el proceso de granulación, tomando como referencia los resultados obtenidos previamente.

Durante el experimento se utilizó como influente agua residual proveniente de la misma PTAR. La caracterización de los 11 lotes utilizados mostró una concentración de materia orgánica promedio de 255.61 ± 160.51 mg de DQO/L, la cual, de acuerdo con la clasificación de Metcalf y Eddy (1996), se considera una concentración baja. En cuanto a los fosfatos se observó una concentración baja, de acuerdo con la misma clasificación, lo que puede ser perjudicial para el proceso de granulación, pues las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y fosfato contribuyen a la difusión de sustrato al núcleo de los gránulos lo que facilita la granulación (Bengtsson et al., 2018).

Tabla 9. Caracterización del agua residual

Parámetro	Unidades	Promedio
DQO total	mg DQO _T /L	255.61 ± 160.51
DQO soluble	mg DQO _S /L	82.8 ± 38.86
Amonio	mg N-NH ₄ ⁺ /L	37.94 ± 12.65
Fosfato	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	4.18 ± 1.45
Surfactantes	mg surfactantes/L	10.05 ± 4.66
SST	mg SST /L	160.86 ± 184

7.2.2 Desempeño del sistema de tratamiento en la remoción de contaminantes

El reactor operó por 82 días en los cuales se evaluó su desempeño con respecto a la remoción de contaminantes. En este caso la remoción de DQO total fue del 72.47 %, la cual es menor en comparación al primer experimento, sin embargo, se observó un aumento del 10 % en la eficiencia de la DQO soluble. En cuanto al amonio, la eficiencia aumentó en comparación al experimento uno, lo que se puede atribuir al aumento del tiempo en el periodo de alimentación anaerobia. Sin embargo, la eficiencia de remoción de fosfatos se mantuvo baja (16.37 ± 12.3 %) inferior a la eficiencia observada en el primer experimento (43.5 ± 13.7). Posiblemente, la baja eficiencia de remoción de especies fosfatadas obtenida a partir de la operación del SBR en ambos experimentos se debió a una naturaleza recalcitrante de este tipo de sustancias en el influente, pues de acuerdo con Van Haandel y Van der Lubbe (2012), una etapa de llenado anaerobio

cercana al 25% es suficiente para obtener altas eficiencias de remoción de dichos compuestos.

Tabla 10. Eficiencia de remoción de contaminantes en el SBR

Parámetro	Influente (mg/L)	Efluente (mg/L)	Eficiencia (%)
DQO total	255.61 ± 160.51	43.81 ± 26.08	72.84 ± 28.85
DQO soluble	82.02 ± 38.86	21.81 ± 17.71	71.47 ± 26.46
Surfactantes	10.05 ± 4.6	3.27 ± 1.47	64.0 ± 15.93
Amonio	37.94 ± 12.68	1.51 ± 3.83	94.1 ± 15.1
Fosfato	4.18 ± 1.45	3.47 ± 0.9	16.37 ± 12.3
SST	160.86 ± 184	63.83 ± 92	61.43 ± 35.16

7.2.3 Formación de biomasa granular aerobia

El reactor se inoculó con lodos activados del mismo origen que los obtenidos en el primer experimento, a una concentración de 4.27 g de SSV/L. Así mismo, se aplicaron las mismas estrategias de disminución paulatina en el tiempo de sedimentación y aplicación de altos flujos de aireación para seleccionar aquellas partículas con las mejores velocidades de sedimentación e inducir la secreción de EPS, con lo cual se esperaba obtener una rápida granulación. Sin embargo, en comparación con el primer experimento, el tiempo de ayuno aplicado durante la primera etapa fue prácticamente nulo, ya que tiempos de llenado anaerobio de 27 min y un tiempo total de duración de ciclo de 2 h, se considera que siempre existió sustrato disponible durante la fase de aireación.

En este caso, la concentración de biomasa dentro del reactor se mantuvo en valores de entre 1.38 - 1.88 g SSV/L durante las primeras dos etapas de operación. Sin embargo, al incrementar el tiempo de duración de los ciclos a 6 h, durante la Etapa III, se provocó un intenso lavado de la biomasa del reactor. En este sentido, se considera que los cortos tiempos de duración de los ciclos, aplicados durante la primera etapa, indujeron una disponibilidad continua de sustrato durante la etapa de aireación, lo que permitió mantener una concentración estable de biomasa dentro del sistema. Posteriormente, con el incremento en la duración de los ciclos, los tiempos de ayuno se prolongaron considerablemente, lo que limitó el crecimiento de la biomasa, provocando una

disminución considerable en la concentración hasta valores cercanos a 0.3 g de SSV/L; concentración que coincide con la observada en el primer experimento.

Durante la operación del reactor se observó un efecto importante de la duración de los ciclos sobre las propiedades de la biomasa. De tal forma que la minimización o nulificación de los periodos de ayuno durante la Etapa I evitó la formación y crecimiento de gránulos aerobios, por lo que la biomasa estuvo constituida predominantemente por flóculos. Posteriormente, con el incremento en la duración de los ciclos durante la Etapa II se lograron observar los primeros gránulos a los 56 días de operación (Figura 12 (A)). Sin embargo, al término de esta etapa, la biomasa seguía estando conformada predominantemente por flóculos. Finalmente, al extender la duración de los ciclos a 6 h (Etapa III), se pudo observar un incremento considerable en la fracción de gránulos aerobios, hasta que para el día 80, los flóculos habían sido totalmente sustituidos por gránulos estables, los cuales se mantuvieron hasta el final del experimento (Figura 12 (F)).

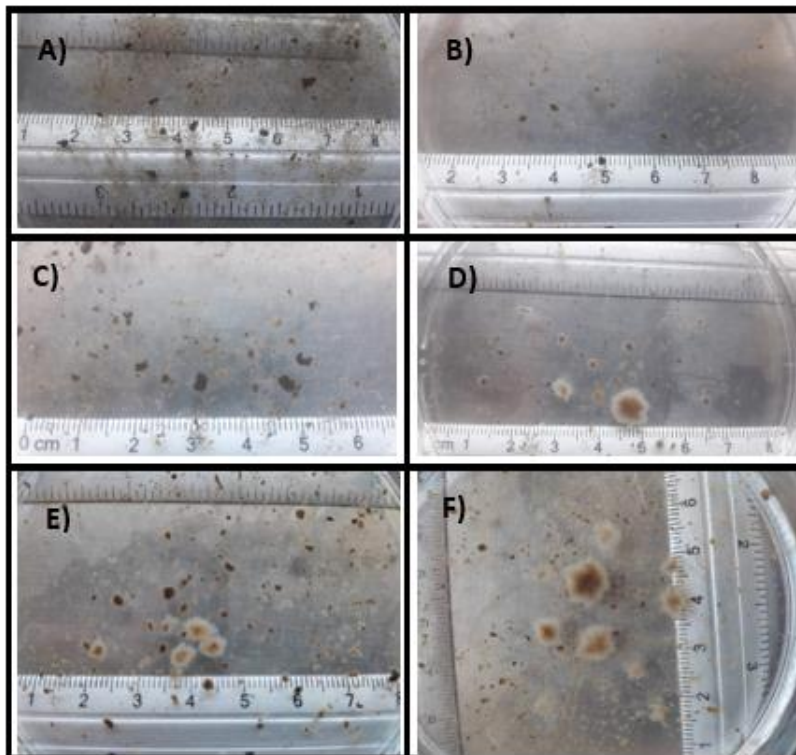


Figura 12. A) Biomasa día 56, B) Biomasa día 61, C) Biomasa día 68, D) Biomasa día 70, E) Biomasa día 77, F) Biomasa día 82.

La velocidad de sedimentación tuvo un ligero incremento en la Etapa I del experimento, sin embargo, el mayor aumento se observó en la Etapa III, durante la cual la biomasa estaba constituida por gránulos. Este parámetro continuó aumentando conforme los gránulos fueron creciendo y mejorando sus propiedades de compactación hasta llegar a un valor promedio de 14.25 m/s (Figura 13), el cual se encuentra dentro del intervalo reportado por Winkler et al (2018) para LGA.

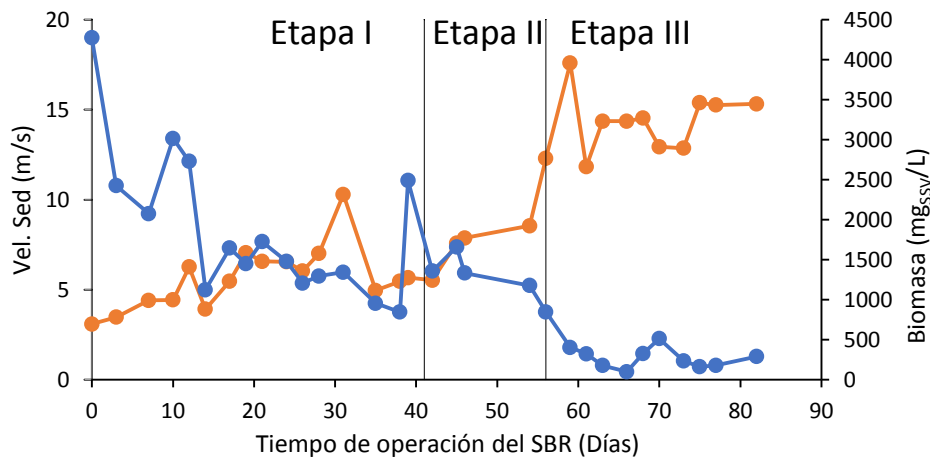


Figura 13. Perfil de la velocidad de sedimentación (●) y concentración de biomasa dentro del reactor (●).

El análisis de las propiedades de la biomasa mostró una disminución en el IVL de 37.60 a 22.59 mL/g-SST al aumentar la duración de la etapa de ayuno durante la Etapa II (Tabla 11), lo que indica una mejora en las propiedades de compactación de la biomasa. Adicionalmente, estos valores fueron mejores que los obtenidos en el primer experimento. Posteriormente, no fue posible evaluar el cambio en el IVL durante la Etapa III, debido a las concentraciones tan bajas de biomasa que se observaron.

Tabla 11. Propiedades de la biomasa en las tres etapas de operación

Parámetro	Unidades	Etapa I	Etapa II	Etapa III
Concentración de biomasa	g-SST/L	1879.84 ± 882.54	1381.88 ± 174.75	323.36 ± 200.7
IVL	mL/g-SST	37.60 ± 17.65	22.59 ± 8.10	-----
Velocidad de sedimentación	m/h	5.67 ± 1.69	7.39 ± 1.13	14.25 ± 1.60
PHA	% PCS	13.57 ± 2.95	17.38	20.52 ± 0.06

PCS: Peso Seco Celular

El análisis de la acumulación de biopolímeros en la biomasa reveló un 13.57 % de PHA/g de PCS en la biomasa floculenta utilizada como inóculo. Posteriormente, conforme transcurrió el proceso de granulación, el valor de esta variable incrementó hasta alcanzar un promedio de 20.52 % de PHA/g de PCS en la Etapa III del experimento (Figura 14). Esto evidencia una mayor capacidad de acumulación de biopolímeros en la biomasa granular en comparación con la biomasa floculenta, lo cual representa una ventaja biotecnológica adicional de los sistemas de lodos aerobios granulares.

Posiblemente, la mejora en el rendimiento de acumulación se debió a la estructura compacta de los LGA y a su composición microbiana, que incluye microorganismos aerobios en la superficie del granulo y facultativos y anaerobios en la región interna, tales como los microorganismos acumuladores de fosfatos (PAO) y de glucógeno (GAO), los cuales biotransforman la materia orgánica fácilmente biodegradable en PHA durante la etapa de llenado anaerobio, para posteriormente utilizarlo como fuente de sustrato y energía en la subsecuente etapa de reacción aerobia (Pronk et.,2015). En este sentido, los biopolímeros en forma de PHA permiten el mantenimiento de los microorganismos en los periodos de ayuno. Es por ello que el diseño de los ciclos considerando una fase de alimentación anaerobia, en conjunto con la aplicación de periodos de ayuno durante la etapa aerobia, fomenta y potencializa la selección de microorganismos acumuladores de PHA.

A pesar de la mejora en el porcentaje de acumulación de PHA en la biomasa granular, el rendimiento observado en presente estudio fue menor al reportando en otros trabajos (Tabla 12). Esto se atribuye a la baja concentración de sustrato en las aguas residuales municipales usadas como influente, que provocó que la concentración de sustrato fuera limitante durante la mayor parte del periodo de operación. En ese sentido Liu et al. (2005) reportan un rendimiento de acumulación del 18 al 44% utilizando un influente rico en fenol, con una concentración de materia orgánica de 0.5 g/L, mientras que con influentes industriales considerablemente más concentrados en materia orgánica se logran alcanzar rendimientos de acumulación superiores al 50% (Gobi y Vadivelu, 2015; Sánchez et al., 2016). Sin embargo, cuando se utilizan aguas residuales municipales o domésticas, los rendimientos de acumulación observados son generalmente menores.

De esta forma Karakas et al. (2020) reportan una acumulación máxima de 10 % de PHA/ de PSC, utilizando como influente aguas residuales domésticas, la cual incluso es menor al rendimiento reportando en el presente estudio. Por ello, se puede inferir que la concentración de sustrato en el influente es una variable determinante en el proceso de acumulación de PHA. Así mismo, se considera conveniente estudiar el perfil de acumulación de PHA durante todo un ciclo para determinar la máxima acumulación de PHA; pues los porcentajes de acumulación comúnmente reportados corresponden con el análisis de muestras obtenidas al final de los ciclos, en las cuales una fracción del PHA acumulado ya fue consumida durante el tiempo de ayuno.

Tabla 12. Comparación de los rendimientos de PHA en este estudio con los reportados en otras referencias

Referencia	Tipo De Sistema	Influente	g-DQO/L	TRH (h)	% de PHA/g de PCS
Gobi y Vadivelu, 2015	SBR SBR acoplado a una membrana	Agua residual proveniente de la fabricación de aceite de palma	3.64	16	66-87
Karakas et al., 2020		Aguas residuales domesticas Aguas residuales sintéticas	1.19	---	10
Liu et al 2005	SBR	(Etanol como fuente de carbono)	0.5	10	18-44
Wosman et al.,2016	SBR	Acetato y Fenol	0.5	8	50
Sánchez et al.,2016	SBR	Lixiviados de residuos orgánicos	5.1	24	56.2
Este estudio	SBR	Aguas residuales municipales	0.255	12	4-21

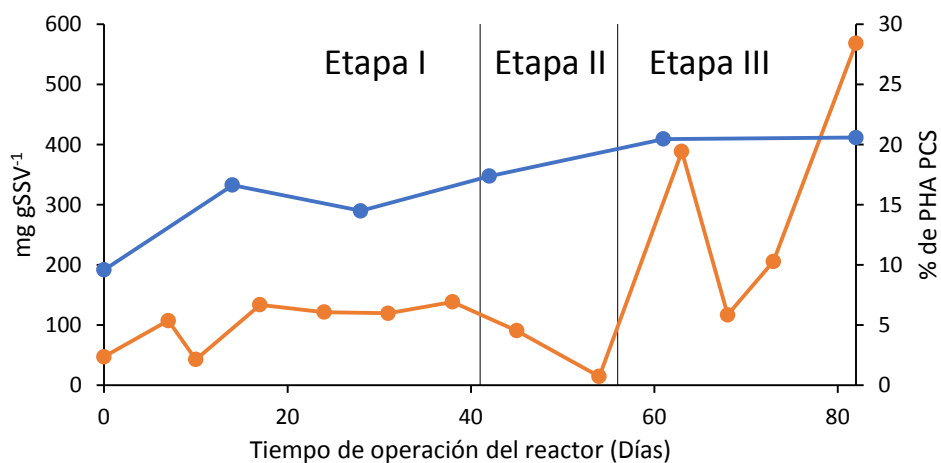


Figura 14. Perfil de concentración de EPS (●) y acumulación e PHA (●).

En cuanto a la concentración de sustancias poliméricas extracelulares, se determinaron como EPS adheridas al granulo (e-EPS) y EPS solubles (SMP) cuantificando proteínas y carbohidratos (Tabla 13). En las primeras dos etapas de operación no hubo un incremento en la concentración de EPS, lo que se atribuye a que la biomasa no se sometió al estrés necesario para inducir a la secreción de estas sustancias. Como ya se ha mencionado, cuando los ciclos de operación se mantuvieron entre 2 y 3 horas, el periodo de ayuno fue muy corto, por tanto, la limitación del sustrato fue prácticamente nula y no se indujo la secreción de EPS. En ese sentido, el incremento en la concentración de EPS se observó durante la Etapa III, la cual aumentó conforme se formaron los gránulos (Figura 14). Como se mencionó previamente las EPS están asociadas a la presencia de gránulos, además el aumento en el tamaño y la mejora en la compactación de la biomasa también se puede atribuir al incremento en la concentración de EPS, ya que estas proporcionan estabilidad a los gránulos. La relación PN/PS >1 (Figura 15) aumentó cuando la biomasa dentro del reactor ya era granular, lo que indica que estas sustancias favorecieron la compactación de los gránulos. Se ha reportado que una relación PN/PS>1 da como resultado gránulos compactos y de buen tamaño (Long et al., 2014)

Tabla 13. Concentración de EPS durante las tres etapas de operación

EPS (mg gSSV ⁻¹)	Etapa I	Etapa II	Etapa III
Proteína soluble (SMP)	0.75 ±0.56	1.04 ±29.61	28.43 ± 1.35
Proteína (eEPS)	79.65 ± 2.58	39.68 ±25.75	222.75 ±1.21
Carbohidratos solubles	2.02 ± 1.34	2.11 ±35.86	27.22 ±1.44
Carbohidratos (eEPS)	17.65 ± 12.08	9.95 ± 72.63	41.59 ±13.61
Proteínas totales	82.02 ±11.97	40.72 ±73.63	251.17±13.51
Carbohidratos totales	19.66 ±16	12.06 ± 73.37	68.82 ±16.55
EPS (SMP)	4.39 ±3.24	3.15 ±141.52	55.65 ±15.81
EPS (eEPS)	97.30 ±15.60	49.64 ± 151.53	264.34 ±16.12
EPS totales	101.69 ±14.68	52.78 ±159.49	319.99 ±16.08

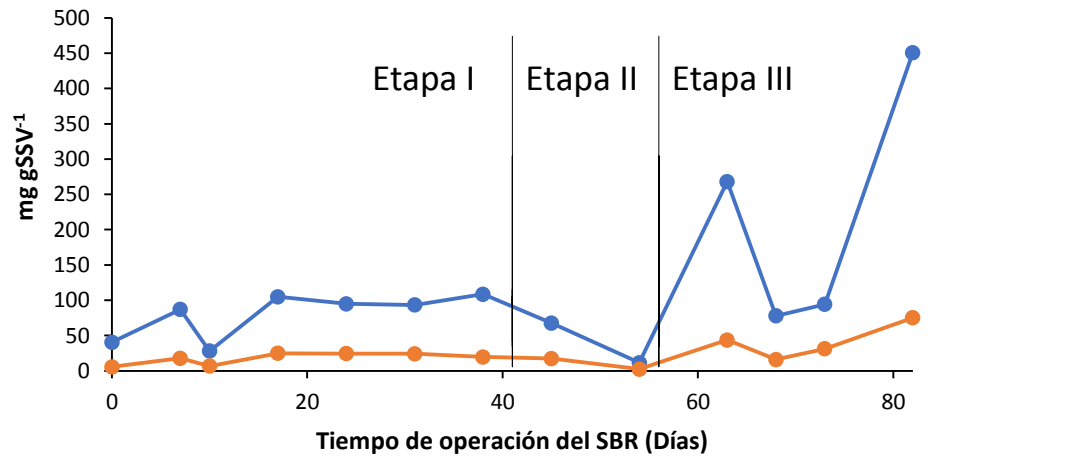


Figura 15. Sustancias poliméricas extracelulares adheridas al granulo (e-EPS), concentración de proteína (●), concentración de carbohidratos (●)

8. Conclusiones

La estrategia de operación basada en la aplicación de presiones de selección biológicas e hidráulicas favoreció el proceso de granulación, obteniendo LGA a partir del día 10 de operación, con un IVL de 132.16 ± 57.43 mL/g de SST y velocidad de sedimentación de 13.53 ± 3.02 m/h. Sin embargo, la baja concentración de sustrato en el influente limitó el crecimiento de la biomasa después del lavado intenso observado durante las primeras semanas de operación, de tal forma que la concentración se mantuvo en valores inestables cercanos a 0.3 g-SSV/L.

La inclusión de periodos de ayuno de sustrato en la fase de aireación es un factor clave para la granulación, de tal forma que cuando estos periodos son nulos o muy cortos, el proceso de granulación se inhibe y la biomasa es predominantemente floculenta. Sin embargo, cuando el tiempo de aireación se extiende incluyendo periodos de ayuno, se observa la formación de gránulos con propiedades de sedimentación superiores a las de la biomasa floculenta.

El incremento en la producción de EPS permitió la formación de LGA estable en ambos experimentos, aumentando su concentración en el primer ensayo de 47.20 a 419.99 ± 168.45 mg/g-SSV y en el segundo de 101.69 ± 14.68 a 319.99 ± 16.08 mg/g-SSV, manteniendo valores $PN/PS > 1$ en ambos experimentos.

En ambos experimentos se observó una mayor capacidad de acumulación de PHA en los LGA en comparación con el inóculo de lodos activados, lo cual es una ventaja biotecnológica que puede potencializar el uso de esta tecnología para el tratamiento de aguas residuales y la obtención de subproductos de valor, sin embargo, las concentraciones observadas fueron relativamente bajas, debido a las bajas concentraciones de DQO, por tanto, a la baja concentración de biomasa.

9. Referencias

Adav, S.S., Lee, D.J., Lai, J.Y. (2008) Effects of aeration intensity on formation of phenol-fed aerobic granules and extracellular polymeric substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 175–182.

Adav, S.S., Lee, D.J., Show, K.Y., Tay, J.H. (2008). Aerobic granular sludge: Recent Advances. *Biotechnol. Adv.* 26, n. 5, 411-423.

APHA. (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. |Washington, D.C. USA: *American Public Health Association*.

Bengtsson, S., de Blois, M., Wilén, B. M., & Gustavsson, D. (2018). Treatment of municipal wastewater with aerobic granular sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 48(2), 119-166.

Beun JJ, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (2002) Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research*, 36:702-712.

Bueno, R. D. F., Faria, J. K., Uliana, D. P., Liduino, V. S. (2020). Simultaneous removal of organic matter and nitrogen compounds from landfill leachate by aerobic granular sludge. *Environmental Technology*, 1-15.

Chen, G. Q., Chen, X. Y., Wu, F. Q., Chen, J. C. (2020). Polyhydroxyalkanoates (PHA) toward cost competitiveness and functionality. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 1-7.

Chen, Z., Huang, L., Wen, Q., Guo, Z. (2015). Efficient polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation by a new continuous feeding mode in three-stage mixed microbial culture (MMC) PHA production process. *Journal of Biotechnology*, 209, 68-75.

Coma, M., Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., and Bond, P. L. (2012). Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioresour. Technol.*, 103,101–108.

CONAGUA (2016). Manual de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento Diseño de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: Humedales artificiales. *Obtenido de <http://mapasconagua.net/libros/SGAPDS-1-15-Libro30>*.

CONAGUA. (2019). Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales 2019. Obtenido de: <https://sina.conagua.gob.mx/sina/index.php?p=24>

Corsino, S. F., di Biase, A., Devlin, T. R., Munz, G., Torregrossa, M., & Oleszkiewicz, J. A. (2017). Effect of extended famine conditions on aerobic granular sludge stability in the treatment of brewery wastewater. *Bioresource Technology*, 226, 150-157.

De Bruin, L. M. M., De Kreuk, M. K., Van Der Roest, H. F. R., Uijterlinde, C., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Aerobic granular sludge technology: an alternative to activated sludge?. *Water Science and Technology*, 49(11-12), 1-7.

Deng, S., Wang, L., & Su, H. (2016). Role and influence of extracellular polymeric substances on the preparation of aerobic granular sludge. *Journal of Environmental Management*, 173, 49-54.

De Sousa Rollemberg, S. L., Ferreira, T. J. T., Firmino, P. I. M., & Dos Santos, A. B. (2020). Impact of cycle type on aerobic granular sludge formation, stability, removal mechanisms and system performance. *Journal of environmental management*, 256, 109970.

De Sousa Rollemberg, S. L., Barros, A. R. M., Firmino, P. I. M., & Dos Santos, A. B. (2018). Aerobic granular sludge: cultivation parameters and removal mechanisms. *Bioresource technology*, 270, 678-688.

Dutta, A., & Sarkar, S. (2015). Sequencing batch reactor for wastewater treatment: recent advances. *Current Pollution Reports*, 1(3), 177-190.

Gobi, K. and Vadivelu, V. M. (2015). Dynamics of polyhydroxyalkanoate accumulation in aerobic granules during the growth–disintegration cycle. *Bioresource Technology*, 196, 731-735.

Gobi, K., & Vadivelu, V. M. (2014). Aerobic dynamic feeding as a strategy for in situ accumulation of polyhydroxyalkanoate in aerobic granules. *Bioresource technology*, 161, 441-445.

González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77-115.

Guimarães, L. B., Mezzari, M. P., Daudt, G. C., & da Costa, R. H. (2017). Microbial pathways of nitrogen removal in aerobic granular sludge treating domestic wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92(7), 1756-1765.

Jiménez Cisneros, B. E., Torregrosa, M. L., Aboites, L. (2010). *El agua en México: cauces y encauces* (No. 363.610972 A3).

Jungles, M. K., Figueroa, M., Morales, N., Val del Río, Á., da Costa, R. H. R., Campos, J. L., ... & Méndez, R. (2011). Start up of a pilot scale aerobic granular reactor for organic matter and nitrogen removal. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(5), 763-768.

Kaur, L., Khajuria, R., Parihar, L., & Singh, G. D. (2017). Polyhydroxyalkanoates: biosynthesis to commercial production-A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(4), 1098-1106.

Karakas, I., Sam, S. B., Cetin, E., Dulekgurgen, E., & Yilmaz, G. (2020). Resource recovery from an aerobic granular sludge process treating domestic wastewater. *Journal of Water Process Engineering*, 34, 101148.

Kim, K. S., Sajjad, M., Lee, J., Park, J., & Jun, T. (2014). Variation of extracellular polymeric substances (EPS) and specific resistance to filtration in sludge granulation process to the change of influent organic loading rate. *Desalination and Water Treatment*, 52(22-24), 4376-4387.

Koller, M. (2018). A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. *Fermentation*, 4(2), 30.

Kumar, M., Rathour, R., Singh, R., Sun, Y., Pandey, A., Gnansounou, E., ... & Thakur, I. S. (2020). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production*, 263, 121500.

Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 14(11), 431-438.

Li, Z., Lin, L., Liu, X., Wan, C., & Lee, D. J. (2020). Understanding the role of extracellular polymeric substances in the rheological properties of aerobic granular sludge. *Science of The Total Environment*, 705, 135948.

Lim J-W, Seng C-E, Lim PE, Ng S-L, Ahmad Sujari A-N (2011). Nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor using polyurethane foam cubes of various sizes as carrier materials. *Bioresource Technology* 102(21):9876–9883.

Liu, C., Luan, P., Li, Q., Cheng, Z., Xiang, P., Liu, D., ... & Zhu, H. (2020). Biopolymers Derived from Trees as Sustainable Multifunctional Materials: A Review. *Advanced Materials* (Deerfield Beach, Fla.), e2001654-e2001654.

Liu, Y. Q., & Tay, J. H. (2006). Variable aeration in sequencing batch reactor with aerobic granular sludge. *Journal of biotechnology*, 124(2), 338-346.

Liu, Y. Q., Moy, B., Kong, Y. H., & Tay, J. H. (2010). Formation, physical characteristics and microbial community structure of aerobic granules in a pilot-scale sequencing batch reactor for real wastewater treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(6), 520-525.

Liu, H.Y., VanderGheynst, J.S., Darby, J.L., Thompson, D.E., Green, P.G., & Loge, F. (2011). Factorial experimental designs for enhancement of concurrent poly(hydroxyalkanoate) production and brewery wastewater treatment. *Water Environ Res*, 83, 36-43.

L. Qin, Y. Liu, J.H. Tay, Denitrification on poly- β -hydroxybutyrate in microbial granular sludge sequencing batch reactor, *Water Res.* 39 (2005) 1503–1510.

Long, B., Yang, C. Z., Pu, W. H., Yang, J. K., Jiang, G. S., Dan, J. F., ... Liu, F. B. (2014). Rapid cultivation of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 166, 57-63.

Long, B., Yang, C. Z., Pu, W. H., Yang, J. K., Jiang, G. S., Dan, J. F., ... & Liu, F. B. (2014). Rapid cultivation of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, 166, 57-63.

Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., Carrera, J., Suárez-Ojeda, M. E. (2020). Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. *Bioresource Technology*, 297, 122478.

Montsoriu, T., & de Dios, J. (1996). *Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización*. Metcalf & Eddy.

Nancharaiah, Y. V. and Reddy, G. K. K. (2018). Aerobic granular sludge technology: mechanisms of granulation and biotechnological applications. *Bioresource technology*, 247, 1128-1143.

Narancic, T. and O'Connor, K. E. (2019). Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem? *Microbiology*, 165(2), 129-137.

Pishgar, R., Dominic, J. A., Tay, J. H., & Chu, A. (2020). Pilot-scale investigation on nutrient removal characteristics of mineral-rich aerobic granular sludge: Identification of uncommon mechanisms. *Water research*, 168, 115151.

Plastics Europe. *Plastics-The Facts*. (2019). An analysis of European plastics production, demand, and waste data.

Pronk, M., Abbas, B., Al-Zuhairy, S. H. K., Kraan, R., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M. C. M. (2015). Effect and behaviour of different substrates in relation to the formation of aerobic granular sludge. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(12), 5257-5268.

Pronk, M., Giesen, A., Thompson, A., Robertson, S., & Van Loosdrecht, M. (2017). Aerobic granular biomass technology: advancements in design, applications and further developments. *Water Practice & Technology*, 12(4), 987-996.

Ranganathan, S., Dutta, S., Moses, J. A., Anandharamakrishnan, C. (2020). Utilization of food waste streams for the production of biopolymers. *Heliyon*, 6(9), e04891.

Ranjit, P., Jhansi, V., & Reddy, K. V. (2021). Conventional Wastewater Treatment Processes. In *Advances in the Domain of Environmental Biotechnology* (pp. 455-479). Springer, Singapore.

Rashid, R., Shafiq, I., Akhter, P., Iqbal, M. J., & Hussain, M. (2021). A state-of-the-art review on wastewater treatment techniques: the effectiveness of adsorption method. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-17

Sánchez, A. I. (2016). Producción De Bioplásticos Polihidroxialcanoatos (PHB) a Partir De Lixiviados De Basura Orgánica. México: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Retrieved from <https://doi.org/10.3929/ethz-a-010515010> Rights

Schwarzenbeck, N., Borges, J. M., Wilderer, P. A. (2005). Treatment of dairy effluents in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 711-718.

SEMARNAT. (1997). Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público. *Diario Oficial de la Federación*.

Serafim, L. S., Lemos, P. C., Oliveira, R., Reis, M. A. (2004). Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(2), 145-160.

Singh, M., & Srivastava, R. K. (2011). Sequencing batch reactor technology for biological wastewater treatment: a review. *Asia-pacific journal of chemical engineering*, 6(1), 3-13.

Solaiman, D. K., Ashby, R. D., Hotchkiss, A. T., Foglia, T. A. (2006). Biosynthesis of medium-chain-length poly (hydroxyalkanoates) from soy molasses. *Biotechnology Letters*, 28(3), 157-162.

Steinbüchel, A., Hein, S. (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. In *Biopolyesters* (pp. 81-123). Springer, Berlin, Heidelberg.

Tavera A. W. (2021) Tesis de Maestría, Posgrado en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Izt.. 59 pp.

Tchobanoglous, G., Burton, F. L., & Stensel, H. D. (2003). *Wastewater Engineering Treatment and Reuse* (Cuarta). McGraw Hill.

Van der Lubbe, J., van Lier, J. B., & van Haandel, A. (2019). *Anaerobic Sewage Treatment: Optimization of process and physical design of anaerobic and complementary processes*. IWA Publishing.

Vanegas, D. M., Ramírez, M. E. (2016). Correlación del Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la Producción de Polihidroxicanoatos de Cadena Media (PHA MCL) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi. *Información tecnológica*, 27(2), 87-96.

Vjayan, T., & Vadivelu, V. M. (2017). Effect of famine-phase reduced aeration on polyhydroxyalkanoate accumulation in aerobic granules. *Bioresource Technology*, 245, 970-976.

Wang, D., Guo, F., Wu, Y., Li, Z., & Wu, G. (2018). Technical, economic and environmental assessment of coagulation/filtration tertiary treatment processes in full-scale wastewater treatment plants. *Journal of Cleaner Production*, 170, 1185-1194.

Winkler, M. K. H., Meunier, C., Henriot, O., Mahillon, J., Suárez-Ojeda, M. E., Del Moro, G., ... & Weissbrodt, D. G. (2018). An integrative review of granular sludge for the biological removal of nutrients and recalcitrant organic matter from wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 336, 489-502.



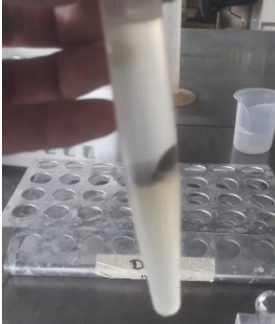


Wosman, A., Lu, Y., Sun, S., Liu, X., Wan, C., Zhang, Y., ... & Tay, J. (2016). Effect of operational strategies on activated sludge's acclimation to phenol, subsequent aerobic granulation, and accumulation of polyhydroxyalkanoates. *Journal of hazardous materials*, 317, 221-228.

Zhang, D., Niu, Q., Ma, L., Derese, S., Verliefde, A., & Ronsse, F. (2020). Complete oxidation of organic waste under mild supercritical water oxidation by combining effluent recirculation and membrane filtration. *Science of The Total Environment*, 139731.

Zhang, Q., Hu, J., & Lee, D. J. (2016). Aerobic granular processes: current research trends. *Bioresource Technology*, 210, 74-80.

Anexo 1

Determinación de la acumulación de PHA de acuerdo con Gobi y Vadivelu (2015).

<p>A) Se fijó la muestra con una solución de Formaldehído al 5% y se secó por 24 horas</p>	
<p>B) Se pesaron por duplicado muestras de 160 mg, y se transfieren a botellas serológicas. Para la digestión de las células se agregaron 1.1 mL de hipoclorito y 1 mL de cloroformo por cada 20 mg de biomasa seca, se sellaron las botellas serológicas con una capa de teflón, una de Parafilm y una segunda capa de teflón. Se agitó en un agitador orbital por 2.5 horas a 200 rpm a 30 °C.</p>	
<p>C) Se transfirió a tubos de centrifuga y se centrifugó por 15 min a 6000 rpm, se formaron tres capas; la primera de hipoclorito, la segunda de restos celulares y la tercera de cloroformo enriquecido con PHA,</p>	
<p>D) Se recuperó la fase de cloroformo y se transfirió a una botella serológica a peso constante, se adicionaron 2 gotas de metanol hasta formar un precipitado.</p>	
<p>E) Se selló nuevamente con teflón, Parafilm y una segunda capa de teflón y se refrigeró por 24 horas, posteriormente se agregaron 2 gotas de metanol, se calentó a baño maría a 60 °C hasta llegar a evaporación.</p>	

Identificación de PHB por espectrometría UV

A) A la muestra de polímero extraído se le adicionan 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), posteriormente se somete a baño maría a 100°C durante 15 minutos para transformar el polímero a ácido crotónico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$)

B) La muestra resultante se deja enfriar y se analiza mediante espectrometría UV, haciendo un barrido de 200 a 275 nm. El espectro de absorción del ácido crotónico presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 235 nm.

Anexo 2 Determinación de proteínas y carbohidratos

Proteína Lowry

Fundamento

Las proteínas solubles son cuantificadas por medio del método de Lowry, en el cual los iones Cu^{2+} se unen con las proteínas y forman complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos; posteriormente, al adicionar el reactivo Folin-Ciocalteu en el cual el principal componente es el ácido fosfomolibdotúngstico que es el encargado de dar el color amarillo a la solución, se dará la reducción de los grupos fenólicos e los residuos de las proteínas, principalmente de la tirosina, formando así un complejo color azul intenso el cual se determina su absorbancia a una longitud de onda de 660nm (García y Vázquez, 1998).

Reactivos

Reactivo A: Carbonato de sodio (Na_2CO_3), al 2% en hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N. Esto es, pesar 2 gramos de hidróxido de sodio y aforarlos en 500 mL de agua destilada y en esto disolver 10 gramos de carbonato de sodio.

Reactivo B: 0.5 % de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en tartrato de sodio potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 1%. Esto es, disolver en 50 mL de agua destilada 0.5 gramos de tartrato de sodio y adicionar 0.25 gramos de sulfato de cobre.

Reactivo C: (Solución alcalina de sulfato de cobre): Mezclar 50 ml de reactivo A, con 1 mL de reactivo B, esta solución se hace al momento de utilizarla

Reactivo D: Solución de carbonato de sodio, la misma que el reactivo C, solo que, omitiendo el hidróxido de sodio, esto es para proteínas solubles.

Reactivo E: Reactivo Folin- Ciocalteau (directo del frasco) con un equivalente de hidróxido de sodio 0.1 N (1:1), para el hidróxido de sodio 0.1 N se pesan 2 gramos de hidróxido de sodio y se aforan en 500 mL de agua destilada.

Solución patrón I: Aforar 0.05 gramos de seroalbúmina de res (BSA) en 50 mL de agua destilada, esta solución tiene una concentración de 1 mg/L.

Solución patrón II: Tomar 10mL de la solución patrón I y aforar a 50 mL de agua destilada. Esta solución tiene una concentración de 0.2 mg/L

Procedimiento.

En tubos Hach (10mL) colocar 1mL de muestra (con o sin dilución) y adicionar 5 mL de reactivo C, dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo adicionar 0.5 mL del reactivo E, agitar y guardar en la oscuridad por 30 minutos, pasado el tiempo leer absorbancia a 660nm.

Determinación de azúcares totales por el método Dubois (Fenol- Sulfúrico)

Fundamento

El análisis de azúcares es muy importante, para llevarlo a cabo existen una gran variedad de métodos, basados en distintos principios, cuando se quiere determinar el contenido de azúcares reductores o en azúcares totales, el empleo de los métodos químicos basados en la reducción de cobre es una opción muy adecuada. A su vez, ese tipo de metodología incluye una gran variedad de métodos entre los que cabe destacar el método de Fenol- Sulfúrico. En este objeto de aprendizaje se va a explicar a forma de llevar a cabo los cálculos para determinar el contenido en azúcares totales de una muestra, que ha sido analizada por el método fenol- sulfúrico.

Los carbohidratos se logran destruir por calor y por adición de ácido y son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación

simple, si se continua el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos oscuros y compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol y es un método fácil, eficaz y rápido.

Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que estos bajo hidrolisis ácida producen monosacáridos. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura de la azúcar, por lo tanto, se realiza una curva patrón.

La intensidad del color naranja es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes. Esta absorbancia puede ser medida a 490 nm y la concentración total de carbohidratos de las soluciones problema puede ser medida con respecto a una curva estándar preparada.

Procedimiento

Se prepara la mezcla como muestra con el fin de obtener las concentraciones de glucosa ($\mu\text{g/mL}$) de 0,10,20,20,40,60,80 y 100. Estas se enumeran del 1 al 7.

Después, se toma 1 mL de cada una de las mezclas se les añaden 500 μL de fenol al 5% y 2500 μL de ácido sulfúrico concentrado a cada una y se mantiene en reposo durante 10 minutos. Posteriormente, se agita cada una de las muestras y se pone en agua fría (25 a 30 °C) durante 15 minutos.

Para finalizar, teniendo las muestras listas, se lee la absorbancia de cada una de las muestras en espectrofotómetro a 490 nm.

Lo que se va a estudiar es la cantidad de azúcares totales utilizando una curva de calibración con estándares de concentración conocida utilizando el método de regresión lineal simple y correlación para modelar una ecuación que describa la relación entre la absorbancia y la concentración de azúcares totales dada los siguientes datos de la curva de calibración.