

129
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ DISEÑO DE UN BIOCATALIZADOR PARA LA
REMOCIÓN DE CLOROFENOLES
EN AGUA ”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

INGENIERA QUÍMICA

P R E S E N T A

*ALICIA SUSANA SÁNCHEZ
DE LA VEGA GARCÍA*



México, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. PALACIOS ALQUISIRA JOAQUÍN
Vocal: Prof. GUZMÁN DE LAS CASAS CARLOS
Secretario: Prof. TORRES BUSTILLOS LUIS GILBERTO
1er. suplente: Prof. CUEVAS GARCÍA ROGELIO
2do. suplente: Prof. LUNA PABELLO VÍCTOR MANUEL

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE INGENIERÍA UNAM
COORDINACIÓN AMBIENTAL, GRUPO TRATAMIENTO Y REUSO.

ASESOR DEL TEMA:

M. en B. LUIS GILBERTO TORRES BUSTILLOS

Luis Gilberto Torres B.

SUSTENTANTE:

ALICIA SUSANA SÁNCHEZ DE LA VEGA GARCÍA

Alicia Sánchez de la Vega García

El presente trabajo se realizó en la
Coordinación de Ambiental del
Instituto de Ingeniería bajo la
dirección del M. en B. Luis
Gilberto Torres Bustillos y la
Dra. Blanca Jiménez Cisneros

Para la realización de este trabajo se contó con una beca
del Instituto de Ingeniería UNAM, proyecto IN-503895

El presente trabajo ha sido presentado en los siguientes foros:

a) VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. **(SMBB 95)**

Septiembre de 1995. Ixtapa Zihuatanejo, Méx. "*Inmovilización de Pseudomonas en cuatro matrices para la remoción de clorofenoles en agua*".

b) VIII Foro Internacional de Ingeniería Química

Marzo de 1996. Orizaba Veracruz, Méx. "*Operación de una columna empacada con biocatalizador para la eliminación de fenol y clorofenoles en agua residual*"

c) X Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. **(SMISAAC 96)**

Febrero de 1996. Toluca, Méx. "*Evaluación de cuatro biocatalizadores para la eliminación de fenol y clorofenoles en agua residual*".

Parte de este trabajo de tesis fue incorporado al manuscrito:

d) "*Comparison among different packing materials and different ways of fixing biomass in attached systems used for the removal of toxic substances*", sometido a la revista **Environmental Technology** para su eventual publicación.

A TI SEÑOR

Porque me dejaste la vida, y con ella, la oportunidad
de crecer día con día.

A MIS PADRES

Javier y Alicia, con todo mi amor y gratitud, por apoyarme
y acompañarme incondicionalmente en los momentos
más duros y felices de mi vida.

A MIS HERMANOS

Emmanuel Javier y María Hécuba,
como una muestra de cariño.

A MIS AMIGOS

Sr. Javier Navarro, Carlos y Margot Díaz, a mi sobrino
Javi, Cecilia Flores, Rolando Blasi, por su apoyo y la
riqueza tan especial que han dado a mi existencia.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Por su entusiasmo y alegría.

Agradezco al M. en B. Luis G. Torres B. por su muy especial dirección, ayuda y paciencia en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco la Dra. Blanca Jiménez Cisneros por brindarme la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo y sus atenciones prestadas.

Agradezco a la M. en B. Maricarmen Quirasco, por la facilidad que brindó para emplear su material bibliográfico y su ayuda prestada.

Mis agradecimientos a las Maestras Fany Iturbe y Ma. de los Ángeles Valdivia por las facilidades que me brindaron para emplear la termobalanza (Ohaus), al Dr. Edmundo Brito y el Ing. Luis Medina, por su asesoría para emplear el reómetro (Haake CV 20N) necesario en la parte experimental de este trabajo.

A todos mis maestros que tomaron parte en mi formación profesional. Gracias.

A la Facultad de Química y al Instituto de Ingeniería de la UNAM, por permitirme el uso de sus instalaciones. Gracias.

A los miembros del jurado: Prof. Joaquín Palacios Alquisira y Prof. Carlos Guzmán de las Casas. Gracias.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron para hacer posible la culminación de esta tesis.

Contenido

	Pág.
Lista de tablas	<i>i</i>
Lista de figuras	<i>vii</i>
Resumen	<i>xi</i>
1. Introducción	1
Objetivos	3
2. Antecedentes	4
2.1 Toxicidad	4
2.1.1 Sustancias tóxicas en agua	4
2.1.2 Toxicidad y legislación de fenol y clorofenoles en agua	5
2.1.3 Propiedades físicas y usos del fenol y clorofenoles	7
2.1.3.1 Fenol	7
2.1.3.2 2-clorofenol	8
2.1.3.3 2,4-diclorofenol	8
2.1.3.4 2,4,6-triclorofenol	9
2.2 Procesos de tratamiento de fenol y clorofenoles	11
2.2.1 Procesos fisicoquímicos	11
2.2.2 Procesos biológicos	12
2.3 Procesos que degradan clorofenoles por medio de microorganismos inmovilizados	13
2.3.1 Definición de inmovilización	13
2.3.2 Métodos de inmovilización	13
2.3.2.1 Inmovilización por atrapamiento	14
2.3.2.2 Inmovilización por adsorción	14
2.3.3 Microorganismos inmovilizados por atrapamiento	15
2.3.4 Caracterización de los procedimientos de inmovilización	18
2.4 Alginato	20
2.4.1 Obtención	21
2.4.2 Características moleculares	22
2.4.3 Propiedades físicas y químicas	24

2.4.4 Reología	25
2.4.4.1 Reología de soluciones de alginato	25
2.4.4.2 Reología de geles de alginato	26
2.5 Microorganismos que degradan fenol y clorofenoles	26
3. Materiales y métodos	31
3.1 Cultivo de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	31
3.1.1 Medios de cultivo	31
3.1.1.1 Medio rico	31
3.1.1.2 Medios mínimos	31
3.1.2 Preparación de los inóculos	32
3.1.3 Crecimiento de la cepa en medio YPG	32
3.1.3.1 Crecimiento en medio concentrado	32
3.1.3.2 Crecimiento en medio diluido	32
3.1.3.3 Crecimiento en medio con hierro	33
3.1.3.4 Crecimiento en medio con cobre	33
3.1.3.5 Determinación del polímero	33
3.1.3.6 Determinación de la viscosidad	33
3.1.3.7 Determinaciones reológicas	34
3.1.4 Fermentación	34
3.1.4.1 Determinación del crecimiento	35
3.1.4.2 Determinación de la conductividad	35
3.1.4.3 Determinación del pH	35
3.1.4.4 Determinación de la viscosidad	35
3.1.4.5 Determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC)	35
3.1.4.6 Determinación del polímero	36
3.1.5 Crecimiento de la cepa en medio mínimo	36
3.1.6 Separación de las células por centrifugación	36
3.1.6.1 Curva de peso seco	36
3.1.6.2 Determinación de la biomasa	38
3.2 Biodegradación de fenol y clorofenoles por medio de las células libres	38
3.3 Elaboración del biocatalizador	38
3.3.1 Efecto de la presión de aire	39
3.3.2 Efecto de la concentración del alginato	40
3.3.3 Efecto de la velocidad de alimentación	40
3.3.4 Efecto de la altura de adición de alginato	40
3.3.5 Efecto de la concentración de células	40

3.4 Determinaciones reológicas	41
3.4.1 Determinación reológica de las soluciones de alginato de sodio	41
3.4.1.1 Soluciones de alginato sin esterilizar	41
3.4.1.2 Soluciones de alginato esterilizadas	41
3.4.1.3 Soluciones de alginato con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.4.1.4 Soluciones de alginato con <i>Pseudomonas fluorescens</i>	42
3.4.2 Determinación reológica de los geles de alginato de calcio	42
3.5 Inmovilización de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en alginato de calcio	43
3.5.1 Método de goteo	43
3.5.2 Método de adición continua	43
3.6 Caracterización del biocatalizador	44
3.6.1 Determinación de calcio consumido por el alginato de sodio	44
3.6.2 Distribución de tamaño de partícula	46
3.6.3 Determinación del tamaño de partícula promedio	46
3.6.4 Determinación de la esfericidad	46
3.6.5 Determinación de la densidad aparente	46
3.6.6 Determinación de la densidad real	47
3.6.7 Determinación de la humedad	47
3.6.8 Determinación de la fracción vacía	47
3.6.9 Determinación de la capacidad de atrapamiento celular	47
3.6.10 Determinación de la concentración de alginato en la esfera (Método de H ₂ SO ₄ - Resorcinol)	48
3.6.11 Determinación de proteínas totales	48
3.6.12 Adsorción de fenol y clorofenoles	51
3.7 Biodegradación de fenol y clorofenoles por el biocatalizador	51
3.7.1 Biodegradación de fenol	53
3.7.2 Biodegradación de 2-clorofenol	53
3.7.3 Biodegradación de 2,4-diclorofenol	53
3.7.4 Biodegradación de 2,4,6-triclorofenol	53
4. Resultados y discusión	54
4.1 Cultivo de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	54
4.1.1 Cultivo a nivel matraz en medio YPG	54
4.1.2 Crecimiento a nivel matraz en distintos medios	56
4.1.3 Cultivo masivo a nivel fermentador de 3.5 L	60
4.1.4 Crecimiento en medios mínimos	63
4.1.5 Separación de las células	65

	Contenido
4.2 Proceso de elaboración del biocatalizador	65
4.2.1 Efecto de la presión de aire	66
4.2.2 Efecto de la concentración del alginato	67
4.2.3 Efecto de la velocidad de alimentación	69
4.2.4 Efecto de la altura de adición	70
4.2.5 Efecto de la carga celular	71
4.3 Condiciones de operación para la elaboración del biocatalizador	72
4.4 Caracterización del biocatalizador	73
4.4.1 Densidades real y aparente	73
4.4.2 Fracción vacía	75
4.4.3 Capacidad de adsorción de las esferas de alginato	82
4.4.4 Capacidad de atrapamiento	83
4.4.5 Calcio consumido por el alginato de sodio .	84
4.5 Reología	85
4.5.1 Reología de las soluciones de alginato	85
4.5.2 Reología de los geles de alginato	90
4.6 Biodegradación de fenol y clorofenoles	93
4.6.1 Empleo de células libres	93
4.6.2 Uso de las células inmovilizadas	94
5. Conclusiones	103
Recomendaciones	106
6. Bibliografía	107
Anexo A Cinéticas de crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	115
Anexo B Caracterización reológica	117
Anexo C Granulometría de las esferas de alginato	127
Anexo D Secado de las esferas de alginato de calcio	144
Anexo E Adsorción de fenol en alginato de calcio	150
Nomenclatura	152

Lista de Tablas

Tabla 1	Fenoles que forman parte de la lista de tóxicos prioritarios de la EPA, OMS y CIRP (CEPIS, 1988)	6
Tabla 2	Fenoles normados para condiciones de descarga en industrias (SEDESOL, 1993)	6
Tabla 3	Clasificación y concentraciones permitidas para el fenol y tres clorofenoles por la EPA (García, 1992)	10
Tabla 4	Materiales de inmovilización por atrapamiento, sistemas de elaboración y tamaños de partícula obtenidos	15
Tabla 5	Concentraciones de polímero y cantidad de células utilizadas en la inmovilización por atrapamiento	17
Tabla 6	Comparación de la inmovilización por adsorción y atrapamiento (Klein y Ziehr, 1990)	19
Tabla 7	Relaciones de alginato/células en diferentes mezclas para la elaboración de esferas	40
Tabla 8	Características de los diferentes medios de crecimiento	58
Tabla 9	Separación de células a diferentes velocidades de centrifugación	65
Tabla 10	Tamaños de partícula obtenidos a diferentes presiones de aire	66
Tabla 11	Porcentajes de retención en malla en el efecto de la presión de aire	67
Tabla 12	Tamaños de partícula obtenidos a diferentes concentraciones de alginato	68
Tabla 13	Porcentajes de retención en malla en el efecto de la concentración de alginato	68
Tabla 14	Tamaños de partícula obtenidos a diferentes velocidades de alimentación	70
Tabla 15	Efecto de la altura en la esfericidad de las partículas	71
Tabla 16	Porcentajes de retención en malla en el efecto de la carga celular	72

Tabla 17	Condiciones de operación para la elaboración de esferas de alginato con <i>Pseudomonas fluorescens</i>	73
Tabla 18	Densidad real y consistencia de las esferas con diferentes relaciones alginato/células	74
Tabla 19	Densidades de las esferas elaboradas con y sin <i>P. fluorescens</i>	75
Tabla 20	Humedades críticas de diferentes esferas	77
Tabla 21	Contenido de humedad total y fracciones vacías para esferas con y sin células	81
Tabla 22	Constantes de las isoterms de Freundlich para alginato de calcio-fenoles	83
Tabla 23	Capacidad de atrapamiento del biocatalizador	83
Tabla 24	Calcio requerido por diferentes soluciones de alginato	84
Tabla 25	Calcio requerido por soluciones con alginato/ <i>S. cerevisiae</i>	84
Tabla 26	Caracterización reológica de las soluciones de alginato antes de la esterilización	86
Tabla 27	Caracterización reológica de las soluciones de alginato esterilizadas	86
Tabla 28	Caracterización reológica de las mezclas alginato/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
Tabla 29	Caracterización reológica de las mezclas alginato/ <i>P. fluorescens</i>	88
Tabla 30	Pruebas de biodegradación con <i>P. fluorescens</i> libres e inmovilizadas	94
Tabla 31	Experiencias de la biodegradación de los clorofenoles con el biocatalizador en columna empacada	101
Tabla A-1	Cultivos a nivel matraz 250 mL, medio YPG a T=35°C	115
Tabla A-2	Cultivo a nivel fermentador, 3.5 L medio YPG a T=30°C	115

Tabla A-3	Cultivo a nivel fermentador, 3.5 L medio YPG a Temperatura ambiente no controlada	115
Tabla A-4	Cinéticas de crecimiento en diferentes medios	116
Tabla A-5	Crecimiento en medios mínimos para <i>Pseudomonas</i> y Dapaah	116
Tabla A-6	Crecimiento en medio mínimo Dapaah con diferentes concentraciones de calcio a 35°C	116
Tabla B-1	Caracterización reológica de medio YPG-solo para <i>P. fluorescens</i>	117
Tabla B-2	Caracterización reológica de medio YPG adicionado con Fe para <i>P. fluorescens</i>	117
Tabla B-3	Caracterización reológica de medio YPG adicionado con Cu para <i>P. fluorescens</i>	117
Tabla B-4	Caracterización reológica de medio YPG diluido 1:10 para <i>P. fluorescens</i>	117
Tabla B-5	Caracterización reológica de la solución de alginato al 4% antes de la esterilización	118
Tabla B-6	Caracterización reológica de la solución de alginato al 3% antes de la esterilización	118
Tabla B-7	Caracterización reológica de la solución de alginato al 2% antes de la esterilización	118
Tabla B-8	Caracterización reológica de la solución de alginato al 1% antes de la esterilización	119
Tabla B-9	Caracterización reológica de la solución de alginato al 0.5% antes de la esterilización	119
Tabla B-10	Caracterización reológica de la solución de alginato al 4% después de la esterilización	120
Tabla B-11	Caracterización reológica de la solución de alginato al 3% después de esterilización	120

Tabla B-12	Caracterización reológica de la solución de alginato al 2% después de la esterilización	120
Tabla B-13	Caracterización reológica de la solución de alginato al 1% después de la esterilización	121
Tabla B-14	Caracterización reológica de la solución de alginato al 0.5% después de la esterilización	121
Tabla B-15	Caracterización reológica de la solución alginato/ <i>S. Cerevisiae</i> 3.6g/4g	122
Tabla B-16	Caracterización reológica de la solución alginato/ <i>S. Cerevisiae</i> 3.2g/8g	122
Tabla B-17	Caracterización reológica de la solución alginato/ <i>S. Cerevisiae</i> 2.8g/12g	122
Tabla B-18	Caracterización reológica de la solución alginato/ <i>S. Cerevisiae</i> 2.4g/16g	123
Tabla B-19	Caracterización reológica de la solución alginato/ <i>S. Cerevisiae</i> 2g/20g	123
Tabla B-20	Caracterización reológica de la solución alginato 4% y <i>P. fluorescens</i>	123
Tabla B-21	Caracterización reológica de la solución alginato 3% y <i>P. fluorescens</i>	124
Tabla B-22	Caracterización reológica de la solución alginato 2% y <i>P. fluorescens</i>	124
Tabla B-23	Caracterización reológica de la solución alginato 1% y <i>P. fluorescens</i>	124
Tabla B-24	Reología de cizallamiento oscilatorio del gel de alginato al 4%	125
Tabla B-25	Reología de cizallamiento oscilatorio del gel de alginato al 3%	125
Tabla B-26	Reología de cizallamiento oscilatorio de gel de alginato al 2%	126

Tabla C-1	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con P = 0 kg/cm ²	127
Tabla C-2	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con P = 1 kg/cm ²	128
Tabla C-3	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con P = 2 kg/cm ²	129
Tabla C-4	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con P = 3 kg/cm ²	130
Tabla C-5	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con v = 1.1 mL/min	131
Tabla C-6	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con v = 30 mL/min	132
Tabla C-7	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con v = 150 mL/min	133
Tabla C-8	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con v = 325 mL/min	134
Tabla C-9	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato al 4%	135
Tabla C-10	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato al 3%	136
Tabla C-11	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato al 2%	137
Tabla C-12	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato al 1%	138
Tabla C-13	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con mezcla alginato/células 2.7g/4g	139
Tabla C-14	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con mezcla alginato/células 2.4g/8g	140

Tabla C-15	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato/células 2.1g/12g	141
Tabla C-16	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato/células 1.8g/16g	142
Tabla C-17	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato/células 1.5g/20g	143
Tabla D-1	Curvas de humedad de esferas con diferente concentración de alginato	144
Tabla D-2	Curvas de humedad de esferas con diferentes diámetros	145
Tabla D-3	Curvas de humedad de esferas con diferente relación alginato/ <i>P. fluorescens</i>	146
Tabla D-4	Velocidades de secado de esferas con diferente concentración de alginato	147
Tabla D-5	Velocidades de secado de esferas con diferentes diámetros	148
Tabla D-6	Velocidades de secado de esferas con diferente relación alginato/ <i>P. fluorescens</i>	149
Tabla E-1	Adsorción de fenol en alginato de calcio	150
Tabla E-2	Isoterma de adsorción de fenol en alginato de calcio	151

Lista de Figuras

Figura 1	Métodos de inmovilización de células (Karel <i>et al.</i> , 1985)	14
Figura 2	Diagrama de flujo de proceso de alginato de sodio	21
Figura 3	Estructura de los ácidos gulurónico y manurónico	22
Figura 4	Estructura de los segmentos del polímero en ácido alginico	22
Figura 5	Representación esquemática de la conformación de los ácidos manurónico y gulurónico	23
Figura 6	Modelo "caja de huevo" para un gel de alginato de calcio	24
Figura 7	Concentración mínima inhibidora de fenol sobre tres bacterias libres e inmovilizadas (Keweloh <i>et al.</i> , 1989)	27
Figura 8	Biodegradación de fenol por células inmovilizadas (Lee <i>et al.</i> , 1994)	28
Figura 9	Biodegradación de fenol por células suspendidas (Lee <i>et al.</i> , 1994)	28
Figura 10	Biodegradación de 2-clorofenol por células inmovilizadas (Lee <i>et al.</i> , 1994)	29
Figura 11	Biodegradación de 2-clorofenol por células suspendidas (Lee <i>et al.</i> , 1994)	29
Figura 12	Biodegradación de 2,4-diclorofenol por células inmovilizadas (Lee <i>et al.</i> , 1994)	30
Figura 13	Biodegradación de 2,4-diclorofenol por células suspendidas (Lee <i>et al.</i> , 1994)	30
Figura 14	D.O. a 610 nm versus concentración de la biomasa en peso seco	37
Figura 15	Equipo empleado para la elaboración de esferas de alginato de calcio	39
Figura 16	D.O. a 595 nm versus peso seco de proteínas	50
Figura 17	Sistema para la biodegradación de clorofenoles en agua	52

Figura 18	Cinéticas de crecimiento, 50 mL de medio YPG a 35°C	55
Figura 19	Caracterización cinética de los diferentes medios de crecimiento	57
Figura 20	Caracterización reológica de los crecimientos, <i>P. fluorescens</i> en distintos medios	59
Figura 21	Cinética de la fermentación 3.5L Medio YPG a temperatura ambiente	61
Figura 22	Cinética de la fermentación 3.5L Medio YPG a temperatura ambiente no controlada	62
Figura 23	Cinéticas de crecimiento en medios mínimos a 35°C	63
Figura 24	Efecto de la concentración de calcio del medio mínimo Dapaah en el crecimiento a 35°C	64
Figura 25	Efecto de la presión de aire sobre el tamaño de partícula	67
Figura 26	Efecto de la concentración de alginato sobre el tamaño de partícula	69
Figura 27	Efecto de la velocidad de alimentación sobre el tamaño de las partícula	70
Figura 28	Efecto de la mezcla alginato/células sobre el tamaño de partícula	72
Figura 29	Velocidad de secado de esferas de alginato de calcio	77
Figura 30	Curvas de secado de esferas elaboradas con diferente concentración de alginato	78
Figura 31	Velocidades de secado de esferas con diferente concentración de alginato	78
Figura 32	Curvas de secado de esferas con diferente tamaño	79
Figura 33	Velocidades de secado de esferas con diferente diámetro	79
Figura 34	Curvas de secado de esferas con diferente relación alginato/ <i>P. fluorescens</i>	80

Lista de Figuras

Figura 35	Velocidades de secado de esferas con diferente relación alginato/ <i>P. fluorescens</i>	80
Figura 36	Fracciones vacías para esferas con distinta relación alginato/células	82
Figura 37	Calcio consumido por el alginato de sodio	85
Figura 38	Curvas de flujo de las soluciones de alginato antes y después de la esterilización	89
Figura 39	Curvas de flujo de las soluciones de alginato y alginato/ <i>S. cerevisiae</i>	89
Figura 40	Curvas de flujo de las soluciones de alginato y alginato/ <i>P. fluorescens</i>	90
Figura 41	Reología de cizallamiento oscilatorio de gel de alginato 3% a T=25°C	91
Figura 42	Reología de cizallamiento oscilatorio de geles de alginato a T= 25°C	92
Figura 43	Biodegradación de 100 mg/L de fenol por <i>P. fluorescens</i> a nivel matraz, 35°C	95
Figura 44	Efecto de la concentración de calcio del medio Dapaah, sobre las esferas de alginato	96
Figura 45	Cinéticas de biodegradación de fenol y clorofenoles por <i>P. fluorescens</i> inmovilizadas T=35°C	97
Figura 46	Operación de la columna empacada con alginato de calcio a temperatura ambiente no controlada	98
Figura 47	Actividades del catalizador de alginato de calcio	99
Figura 48	Actividades promedio (Unidades Formadoras de Colonia/g _{soporte}) del catalizador de alginato de calcio	100
Figura C-1	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con P = 0 kg/cm ²	127
Figura C-2	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con P = 1 kg/cm ²	128
Figura C-3	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con P = 2 kg/cm ²	129

Figura C-4	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con $P = 3 \text{ kg/cm}^2$	130
Figura C-5	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con $v = 1.1 \text{ mL/min}$	131
Figura C-6	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con $v = 30 \text{ mL/min}$	132
Figura C-7	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con $v = 150 \text{ mL/min}$	133
Figura C-8	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con $v = 325 \text{ mL/min}$	134
Figura C-9	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato al 4%	135
Figura C-10	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato al 3%	136
Figura C-11	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato al 2%	137
Figura C-12	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con alginato al 1%	138
Figura C-13	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con mezcla alginato/células 2.7g/4g	139
Figura C-14	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con mezcla alginato/células 2.4g/8g	140
Figura C-15	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con mezcla alginato/células 2.1g/12g	141
Figura C-16	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con mezcla alginato/células 1.8g/16g	142
Figura C-17	Granulometría de esferas de alginato obtenidas con mezcla alginato/células 1.5g/20g	143
Figura E-1	Adsorción de fenol en alginato de calcio	150
Figura E-2	Isoterma de adsorción de fenol en alginato de calcio	151

Resumen

Los fenoles son considerados como sustancias tóxicas y casi todos son desechos peligrosos, adicionalmente el 2,4,6-triclorofenol es considerado potencialmente carcinogénico. Estos compuestos se encuentran en efluentes industriales a altas concentraciones y se han reportado como bioacumulables en sistemas biológicos. Los sistemas de degradación de tóxicos por medio de microorganismos inmovilizados son prometedores para eliminar altas concentraciones de estos tóxicos, especialmente cuando se trata de inmovilización por atrapamiento en polímeros porque protege al microorganismo contra el efecto inhibitor del tóxico. En varios trabajos se reportan distintos tamaños de partícula empleada para la biodegradación de los compuestos tóxicos, así como distintas cargas de biomasa. Por ello, es importante el diseño de un biocatalizador adecuado capaz de eliminar altas concentraciones de estos tóxicos.

El presente trabajo describe la producción masiva de *P. fluorescens* (bacteria previamente identificada y evaluada por su capacidad biodegradadora de compuestos fenólicos), a nivel de matraz 250 mL y nivel fermentador de 3.5 L. El mayor crecimiento obtenido a nivel matraz fue alrededor de las 24 horas, y en la fermentación influyó la velocidad de agitación.

La elaboración de esferas de alginato de calcio con y sin células (*Saccharomyces cerevisiae* o *Pseudomonas fluorescens*), y la forma de controlar su tamaño es presentada. Las condiciones de operación apropiadas para la elaboración de esferas con un tamaño entre 1.13 y 1.41 mm fueron: presión de aire de 3 kg/cm², velocidad de alimentación de 325 mL/min, y una concentración de alginato al 3%. Para obtener esferas, la altura de adición de la mezcla fue de 80 cm.

Se realizó la caracterización fisicoquímica del biocatalizador con y sin células, obteniendo su densidad real, densidad aparente, fracción vacía, contenido de humedad total, humedad crítica, calcio consumido por alginato de sodio, y resistencia mecánica en función de la carga celular.

La capacidad de atrapamiento celular fue muy buena, alcanzando valores de 3.85×10^{14} UFC/g_{soporte}. La capacidad de adsorción de fenol y clorofenoles por las esferas de alginato de calcio fue significativa. La cantidad de calcio requerida por el biocatalizador para su gelificación resultó ser una función directa de la concentración del alginato empleado en el mismo, y presenta evidencia del fenómeno de difusión del calcio en la esfera de alginato.

La caracterización reológica de las soluciones de alginato y de las mezclas alginato/células que se efectuó generó curvas de flujo, importantes para el dimensionamiento de equipo de bombeo y tubería. También se montó una metodología para la evaluación de la caracterización reológica de cizallamiento oscilatorio de los geles de alginato de calcio y se realizaron algunas pruebas preliminares.

La capacidad de eliminación de fenol y clorofenoles del biocatalizador en columna empacada fue del 95%. El sistema fue capaz de eliminar concentraciones altas de los compuestos tóxicos (1000 mg/L de fenol, 500 mg/L de 2-clorofenol, 700 mg/L de 2,4-diclorofenol y 100 mg/L de 2,4,6-triclorofenol) comparados con las concentraciones biodegradadas por el sistema libre (1000 mg/L de fenol, 10 mg/L de 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol, y 1 mg/L de 2,4,6-triclorofenol), mostrando así que el sistema es prometedor.

Los resultados reportados establecen las bases para el escalamiento de un proceso en cuanto a la producción masiva de células, la elaboración del biocatalizador y su funcionamiento, para la biodegradación de compuestos sumamente tóxicos.

1. Introducción

El crecimiento de la población y la industrialización de muchos países generan la presencia de contaminantes en el ambiente perjudicando la vida, la salud y el bienestar del hombre, destruyendo o dañando también la vida de animales y vegetales.

La immoderada descarga de sustancias tóxicas ha causado la contaminación del agua de ríos, lagos, mares y depósitos subterráneos. El efecto que éstas producen ha impulsado al estudio de tecnologías capaces de solucionar este problema. Debido a la gran importancia que tiene mejorar la calidad y cantidad de agua que cubra las necesidades de la población, se buscan nuevas tecnologías para su tratamiento.

En México, la contaminación por sustancias tóxicas provenientes de descarga de aguas de uso industrial y doméstico es preocupante. La Agencia para la protección del medio ambiente (EPA) ha reportado una lista de sustancias tóxicas en agua consideradas como prioritarias dentro de las cuales se encuentran el fenol y los clorofenoles, los cuales están también legislados por la Norma Oficial Mexicana. Los fenoles son señalados como parámetro problema en regiones hidrológicas de Fernando Soto la Marina y en la del Alto Pánuco (Jiménez y Ramos, 1995).

Industrias como la de petróleo y petroquímica, productos plásticos y polímeros sintéticos, hierro y acero, azúcar de caña y productos de aserradero contienen fenol y clorofenoles en sus efluentes, en el proceso de fabricación de pulpa de papel, especialmente en la etapa de blanqueo, se producen aguas residuales con altos contenidos de fenol y clorofenoles.

Existe una gran diversidad de sistemas de tratamientos fisicoquímicos (como la oxidación química y fotocatalítica, la filtración por membranas, la adsorción, la coagulación química); y otros sistemas biológicos llamados comúnmente convencionales (como los lodos activados y lagunas aeradas entre otros); para lograr la disminución de estos compuestos tóxicos en agua. Sin embargo estos procesos resultan costosos por los materiales empleados y/o por su alto costo de operación, además de degradar bajas tasas de estos tóxicos.

En la última década se ha estudiado ampliamente en Estados Unidos y Europa una de las tecnologías más novedosas y promisorias para la eliminación de fenol y clorofenoles en agua, la cual es el uso de microorganismos específicos inmovilizados. Esta tecnología, que comienza a ser motivo de estudio en nuestro país, consiste en confinar a los microorganismos en una superficie mediante su adsorción en materiales porosos o por atrapamiento en una matriz polimérica (natural o artificial).

El atrapamiento en matriz, le confiere una protección al microorganismo contra el efecto inhibitor del tóxico alcanzando altas tasas de degradación, y evitando la producción de lodos contaminados, mostrando con ello ventajas sobre los sistemas biológicos convencionales.

Varios trabajos han sido reportados en la degradación de fenol y clorofenoles por medio de células específicas inmovilizadas, utilizando una gran diversidad de materiales.

El alginato de calcio como matriz polimérica, se reporta en varios trabajos, ya que el proceso de inmovilización es rápido y fácil de realizar, y la matriz presenta muy buenas características mecánicas, además de no ser tóxico para la mayoría de las células que pueden ser inmovilizadas en él. Varios trabajos reportan en la elaboración del biocatalizador diferentes tamaños de partícula, algunos de ellos mencionan una carga biomásica, y los microorganismos empleados son diversos para biodegradar diversos tóxicos.

La caracterización de los sistemas de inmovilización según Klein y Ziehr (1990), se debe llevar a cabo de acuerdo a diferentes criterios: a) carga biomásica, b) capacidad de retención de la biomasa/fuerza de adhesión, c) efectividad del catalizador y problemas de transferencia de masa involucrados y d) estabilidad operacional.

Existe gran diversidad de microorganismos que degradan fenol y clorofenoles, entre los que se encuentran el grupo cuyo género pertenece a las *Pseudomonas*, en un trabajo previo (Cabello, 1996) se reportó la caracterización de la biodegradación de varios clorofenoles y ácido 2,4-diclorofenoxiacético por una cepa de *P. fluorescens*. Debido a su buena capacidad de degradación de estos tóxicos, se decidió emplear esta cepa para su inmovilización en alginato de calcio.

Este trabajo presenta un estudio integral sobre la elaboración del biocatalizador de alginato de calcio, que abarca el cultivo masivo de *P. fluorescens*, el efecto de los parámetros que intervienen en el tamaño del biocatalizador, la carga máxima celular en función de las propiedades mecánicas del material; y la caracterización fisicoquímica del biocatalizador. (la cual es importante para el diseño de un sistema que tenga una buena estabilidad operacional y una alta eficiencia). Se presenta también el principio de un estudio reológico, importante en el diseño de tuberías para el escalamiento de la elaboración del biocatalizador. Todo ello conduce a elaborar un biocatalizador adecuado para la eliminación de fenol y clorofenoles en agua.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar un biocatalizador adecuado para la eliminación de fenol y clorofenoles en agua.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar una revisión bibliográfica de los sistemas de inmovilización por atrapamiento y las cepas utilizadas en la eliminación de fenol y clorofenoles.
- Desarrollar una metodología para la producción masiva de células.
- Determinar los factores que afectan la elaboración del biocatalizador.
- Evaluar las propiedades físicas y químicas del biocatalizador.
- Caracterizar reológicamente las mezclas alginato/células, así como el catalizador de alginato de calcio.
- Determinar la fracción vacía del biocatalizador y estudiar el efecto de las células sobre este parámetro.
- Comparar la eficiencia de la remoción de fenol y clorofenoles en el sistema inmovilizado contra el sistema libre.

2. Antecedentes

2.1 Toxicidad

La toxicidad se define como la propiedad que tiene una sustancia química o la combinación de varias de reaccionar inhibiendo el proceso metabólico de las células u organismos sin destruirlos o alterarlos totalmente bajo ciertas condiciones físicas, biológicas y ambientales, por una concentración específica del tóxico y tiempo de exposición en él. (Parker, 1975)

Para que una sustancia química produzca un efecto nocivo, se necesitan tres elementos:

- a) Un agente físico o químico que produzca el efecto
- b) Un sistema biológico en el cual, el agente cause dicho efecto
- c) Un medio en el cual interactúe el agente con el organismo para producirlo

Además de estos tres elementos; la toxicidad es una función de la naturaleza de la sustancia, de su concentración, del tiempo de exposición en ella y de las condiciones ambientales.

Muchas sustancias químicas se consideran tóxicas para peces, microorganismos, y humanos, aunque para algunos, sus efectos tóxicos no han sido completamente caracterizados o cuantificados; en el análisis de las sustancias químicas tóxicas se evalúa el impacto potencial sobre la población humana y sobre el ecosistema. (CEPIS, 1988)

El efecto nocivo que produce una sustancia tóxica, puede ser a corto y/o largo plazo, por ello, se evalúa su toxicidad crónica y/o aguda. La toxicidad aguda es el daño inmediato a microorganismos o seres vivos, por un mecanismo de envenenamiento rápido, el cual es fatal a menos que éstos escapen del medio donde se encuentra el tóxico y en una etapa temprana.

La toxicidad crónica se refiere a los efectos que produce la sustancia por una exposición prolongada en ella, de los microorganismos o seres vivos; debido a un aumento en la duración, la sustancia tóxica provoca efectos subletales en los procesos de reproducción y crecimiento de los microorganismos o seres vivos.

2.1.1 Sustancias tóxicas en agua

Muchos constituyentes de las aguas residuales son tóxicos para microorganismos o seres vivos. Por definición, los compuestos que ejercen una influencia nociva son tóxicos, y se pueden clasificar de acuerdo a su naturaleza en:

a) Trazas orgánicas. Estos son tóxicos a altas concentraciones, pero pueden ser biodegradados a bajas concentraciones; ejemplos de ellos son los fenoles, y algunas sustancias persistentes que pueden ser acumulativas o no acumulativas como hidrocarburos, éteres, compuestos vinílicos, lignina, celulosa etc.

b) Metales pesados. Entre ellos están el cobre, níquel, plomo, cromo, cadmio, arsénico, mercurio, uranio, vanadio, etc.

c) Metales ligeros. En ellos se encuentran el sodio, potasio, calcio y magnesio.

d) Ácidos y bases. Altas concentraciones de ácidos o álcalis modifican el pH del medio, destruyendo o inhibiendo el proceso normal de biodegradación; ya que gran parte de los microorganismos capaces de biodegradar lo hacen generalmente entre valores de pH de 6.8 a 8.5.

e) Otras sustancias orgánicas e inorgánicas. Estas sustancias pueden ser tóxicas a procesos biológicos si se presentan a altas concentraciones. Dentro de ellas se encuentran el cloro libre, cloraminas, amonio, sulfuro de hidrógeno, fenoles, cianidas, ácidos volátiles, etc. (Tyagi, 1990)

2.1.2 Toxicidad y legislación de fenol y clorofenoles en agua

Los fenoles y clorofenoles son xenobióticos que se encuentran con frecuencia en efluentes de diversas industrias como petróleo y petroquímica, productos plásticos y polímeros sintéticos, hierro y acero, azúcar de caña y productos de aserradero (Torres, 1994).

Debido a sus altas toxicidades están considerados dentro de la lista de tóxicos prioritarios normados por la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Comisión Internacional para la Protección del Río Rhin (CIPR). En la Tabla 1 se presenta el listado de los fenoles en las tres fuentes (CEPIS, 1988).

En México, la normatividad de estos compuestos fenólicos está legislada por la Comisión Nacional del Agua. En la Tabla 2 se presentan las industrias para las cuales se han normado los fenoles (Torres, 1994).

Tabla 1
Fenoles que forman parte de la lista de los tóxicos prioritarios
de la EPA, OMS y CIRP (CEPIS,1988)

COMPUESTO	EPA	OMS	CIRP
2,4,5 - triclorofenol			X
2,4,6 - triclorofenol	X		
2,4 - diclorofenol	X		X
2,4 - dimetilfenol	X		
2,4 - dinitrofenol	X		
2 - clorofenol	X		X
2 - nitrofenol	X		
4,6 - dinitro-o-cresol	X		
4-cloro-3-metilfenol			X
4 - nitrofenol	X		
Fenol	X	X	
3 - clorofenol			X
4 - clorofenol			X
p-cloro-m-cresol	X		
Pentaclorofenol	X	X	X

Tabla 2
Fenoles normados para condiciones de descarga en industrias
(SEDESOL, 1993)

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-CCA-ECOL/1993	GIRO INDUSTRIAL
002	Producción de caña
003	Refinación de petróleo y petroquímica
005	Fabricación de productos plásticos y polímeros sintéticos
013	Hierro y Acero
014	Fabricación de fibras textiles
019	Impregnación de productos de aserradero
031	Actividades agroindustriales y de servicios, tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal

2.1.3 Propiedades físicas y usos del fenol y clorofenoles

A continuación se describen las propiedades físicas del fenol y tres clorofenoles en la lista que la EPA (Agencia de Protección para el Ambiente) propone:

2.1.3.1 Fenol

Sinónimos: Hidroxibenceno, ácido fénico, monohidroxibenceno, ácido fenílico

Fórmula empírica: C_6H_6O

Fórmula estructural:



Peso molecular: 94.11 g/mol

Descripción: Sólido blanco cristalino

Solubilidad: Soluble en alcohol, éter, cloroformo, glicerina, vaselina, disulfuro de carbono; solubilidad en agua hasta 93,000 mg/L a 25°C

Gravedad específica: 1.071

Punto de fusión: 41°C

Punto de ebullición: 182°C

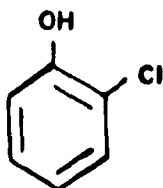
Usos: En fabricación de explosivos, fertilizantes, pinturas, conservador de madera, resinas sintéticas, textiles, drogas, preparación de fármacos, perfumes, baquelita y otros plásticos; desinfectante de petróleo, piel, papel, jabón, juguetes y en la agricultura.

2.1.3.2 2-clorofenol

Sinónimos: 2-CP, 2-cloro-1-hidroxibenceno, ortoclorofenol

Fórmula empírica: C_6H_5OCl

Fórmula estructural:



Descripción: Líquido incoloro combustible

Solubilidad: Soluble en alcohol y éter; ligeramente soluble en agua 28,500 mg/L a 20°C

Gravedad específica: 1.241

Punto de fusión: 9°C

Punto de ebullición: 175-176 °C

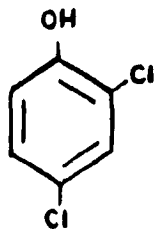
Usos: En síntesis orgánica para la obtención de colorantes.

2.1.3.3 2,4-diclorofenol

Sinónimos: 2,4-DCP, 1-hidroxi-2,4-diclorobenceno, 2,4-dicloro-hidroxibenceno

Fórmula empírica: $C_6H_4OCl_2$

Fórmula estructural:



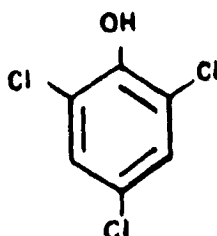
Peso molecular:	163 g/mol
Descripción:	Sólido cristalino incoloro
Solubilidad:	Soluble en tetracloruro de carbono, alcohol y éter. Poco soluble en agua 4,500 mg/L a 20°C
Gravedad específica:	1.383
Punto de fusión:	45°C
Punto de ebullición:	210°C
Usos:	En síntesis orgánica

2.1.3.4 2,4,6-triclorofenol

Sinónimos: 2,4,6-TCP, Dovicide 25^R
2,4,6-triclorohidroxibenceno

Fórmula empírica: C₆H₃OCl₃

Fórmula estructural:



Peso molecular:	197.45 g/mol
Descripción:	Hojuelas amarillas con fuerte olor fenólico, no flamable.
Solubilidad:	Soluble en acetona, alcohol y éter; en agua 800 mg/L a 25 °C

Peso específico:	1.675
Gravedad específica:	1.490
Punto de fusión:	68°C
Punto de ebullición:	248-249°C
USOS:	Para producir 2,3,4,5-tetraclorofenol y pentaclorofenol; se usa directamente como germicida, bactericida, en conservadores de madera y defoliante.

García, (1992)

El clorofenol se emplea como compuesto de referencia para evaluar la toxicidad de compuestos orgánicos y metales pesados, debido a los altos efectos nocivos que produce en microorganismos, plantas y animales que se utilizan en la evaluación.

Además de establecer la clasificación de los tóxicos prioritarios, es interesante señalar las concentraciones máximas permitidas en agua, y si se presenta o no la bioacumulación y biotransformación/biodegradación de los clorofenoles mencionados anteriormente.

Tabla 3
Clasificación y concentraciones permitidas para el fenol y tres clorofenoles por la EPA
(García, 1992)

NOMBRE	CLASIFICACIÓN	LIMITE MÁXIMO PERMITIDO		
		Vida acuática dulce µg/L	Vida acuática salada µg/L	Salud Humana µg/L
Fenol	Desecho peligroso	10,200 T.A.		
	Sustancia peligrosa	2,560 T.C.	5,800 T.A.	3,500
2-clorofenol	Desecho peligroso	4,380 T.A.	*	0.1
2,4-diclorofenol	Desecho peligroso	2,020 T.A. 365 T.C.	*	0.3 para prop. organolépticas 3,090 para toxicidad
2,4,6-triclorofenol	Carcinógeno Desecho peligroso Sustancia peligrosa	970 T.C.	*	12

NOTA: * No existen criterios por datos insuficientes
T.A.: Toxicidad Aguda, T.C.: Toxicidad Crónica

Se pueden comparar los valores de toxicidad entre el fenol y los tres clorofenoles; el valor de toxicidad como límite de protección acuática para el fenol es de 10,200 µg/L, para el 2-clorofenol es de 4,380 µg/L, para el 2,4-diclorofenol de 2020 µg/L y para el 2,4,6-triclorofenol de 970 µg/L; estos valores indican que el compuesto más tóxico es el que tiene mayor número de cloros sustituyentes; para causar el mismo efecto nocivo se necesita mayor cantidad, por ejemplo, de fenol que de 2,4,6-triclorofenol.

La misma tabla reporta la no bioacumulación para el fenol y bioacumulación (incierto) para el 2-clorofenol basadas en datos de laboratorio extrapolados y sin existencia de información directa. Para el 2,4-diclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol la bioacumulación es incierta porque no existe información suficiente que fundamente el criterio y sólo existen cálculos teóricos y estimaciones de sustancias químicas sintéticas.

En cuanto a la biotransformación/biodegradación, se reporta que el fenol sí la presenta existiendo información que la fundamente. El 2,4-diclorofenol también presenta biotransformación/biodegradación pero en base a datos de laboratorio extrapolados, pues no existe información directa. Para el 2,4-diclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol la biotransformación/biodegradación es incierta, pues sólo existen cálculos teóricos y estimaciones de sustancias químicas sintéticas.

2.2 Procesos de tratamiento de fenol y clorofenoles

2.2.1 Procesos fisicoquímicos

Para la eliminación de fenoles y clorofenoles en agua se han reportado métodos como la volatilización, biodegradación y fotólisis directa (CEPIS, 1988).

Otros métodos que se han reportado son la :

- a) Adsorción en carbón activado (Diamadopoulos *et al.*, 1992)
- b) Filtración por membranas (Swedish Pulp and Paper Association, 1982)
- c) Coagulación química (Almemark *et al.*, 1991)
- d) Oxidación química y fotocatalítica (Eckenfelder, 1991; Tseng y Haung, 1991)
- e) Polimerización y precipitación catalizada enzimáticamente (Nicell *et al.*, 1992)

La adsorción en carbón activado es un proceso fisicoquímico ampliamente utilizado en la eliminación de compuestos tóxicos por su gran capacidad de adsorción y bajo costo con respecto a otros materiales empleados (Mörsen, 1990; Ehrhardt y Rehm, 1989).

En algunos casos el tóxico es totalmente eliminado por ejemplo, en la oxidación química; en otros, sólo es removido como en la filtración por membranas, la coagulación química y el carbón activado. Estos procesos resultan muy costosos por los materiales empleados y/o por la energía que se consume en su operación.

2.2.2. Procesos Biológicos

Los procesos biológicos se llaman también sistemas de tratamiento convencionales, entre éstos se encuentran (Hannah *et al.*, 1986; Torres, 1994):

- a) Reactores anóxicos y anaerobios
- b) Reactores de lecho fluidificado
- c) Lagunas aereadas
- d) Lodos activados convencionales y sus variantes
- e) Filtros rociadores

Los sistemas anóxicos requieren de compuestos aceptores de electrones distintos al oxígeno, por ejemplo el nitrato, para la mejor degradación de los compuestos tóxicos. Los anaerobios no necesitan la presencia de oxígeno para llevar a cabo la degradación, caso contrario a los sistemas aerobios. (Zitomer y Speece, 1993)

Hendriksen *et al.* (1991) reportan como sistema empleado para la degradación de fenol un reactor de lecho fijo con microorganismos aislados de lodos; Puhakka *et al.* (1991 y 1992) emplean un reactor de lecho fluidificado y un reactor óxico de lecho fluidificado para la degradación de 2,4-diclorofenol con microorganismos aislados de lodos y microorganismos no identificados respectivamente; Mohn y Kennedy (1992) emplean un reactor en lote para la eliminación del 2,4,6-triclorofenol con microorganismos aislados de un lodo granular.

Hannah y colaboradores (1986), reportaron la eliminación de varios compuestos orgánicos en seis procesos y operaciones unitarias, entre las cuales se encuentran la clarificación primaria, clarificación química, filtro rociador, lodos activados, laguna aereada y laguna facultativa. Ellos observaron eficiencias de remoción variables, las cuales dependían del sistema empleado, del tóxico a remover y de la concentración del tóxico en la alimentación. Por ejemplo, para el fenol, reportaron eficiencias entre el 21 y el 86%, mientras que para el 2,4-diclorofenol se alcanzaron eficiencias del 31 al 99%. Sin embargo, las concentraciones de estos tóxicos presentes en las aguas residuales tratadas estuvieron entre 14 y 126 µg/L para el fenol, y de 1 a 128 µg/L para el 2,4-diclorofenol. En todos los casos el mayor porcentaje de remoción reportado correspondió a la menor concentración del tóxico en la alimentación. Las mayores eficiencias se encontraron en el sistema de lodos activados.

En los sistemas convencionales existen desventajas en la eliminación de fenol y clorofenoles en agua (Torres, 1994):

- a) Las concentraciones máximas permisibles del tóxico a biodegradar son bajas.
- b) El tóxico se concentra más de 20 veces su valor en el efluente generando gran cantidad de lodos residuales contaminados (Hannah *et al.*, 1986).
- c) Los microorganismos utilizados para la biodegradación tienen periodos de adaptación entre 60 y 120 días (Battersby y Wilson, 1989).
- d) Frente a otras fuentes de carbono que se encuentran en aguas residuales, se presenta una baja especificidad hacia los compuestos de interés.

2.3 Procesos que degradan clorofenoles por medio de microorganismos inmovilizados

2.3.1 Definición de inmovilización

La inmovilización de células puede definirse como el confinamiento físico de células, a una región definida conservando su actividad bioquímica. A estas células puede impedírseles significativamente su movilidad comparada con la de las células que están suspendidas libremente en una solución acuosa. (Karel *et al.*, 1970). También puede definirse como una técnica que limita el movimiento libre de las células. La movilidad celular puede restringirse por agregación de las células o por confinamiento dentro de un soporte o adhiriéndolas a él. (Scott, 1987).

Otra definición establece que la inmovilización consiste en una célula cualquiera, microorganismo o enzima que en su estado soluble (móvil), es transferida a un estado insoluble (inmóvil), sin pérdida de su actividad (Skjak-Braek y Martisen, 1991).

2.3.2 Métodos de inmovilización

Muchas son las clasificaciones de los métodos de inmovilización. Loyde (1993) distingue dos: por atrapamiento (en matriz o microencapsulación) y por enlace (adsorción, unión al soporte y entrecruzamiento). Los métodos de inmovilización según Klein y Zielr, (1990) son:

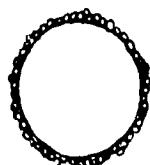
- a) atrapamiento en polímeros y
- b) adsorción natural en soportes porosos y materiales inertes

2.3.2.1 Inmovilización por atrapamiento

La inmovilización por atrapamiento mantiene el material celular dentro de una estructura porosa o englobado en una capa semipermeable. Se utilizan polímeros naturales como el alginato, carragenina, agar, quitosán, colágeno, etc.; y/o polímeros sintéticos como poli(acrilamida-hidrazida), triacetato de celulosa, poliestireno, poliuretano, poliéster, resinas etc. (Torres, 1994; Tyagi, 1990)

Figura 1 Métodos de inmovilización de células (Karel *et al.*, 1985)

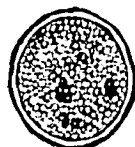
(a) Adsorción en superficie



(b) Atrapamiento en matriz porosa



(c) Microencapsulación



(d) Agregación de células



2.3.2.2 Inmovilización por adsorción

La adsorción natural se lleva a cabo por fuerzas de interacción entre el soporte y las células o por reacción química entre los grupos funcionales de ambos. Los materiales que esta técnica utiliza pueden ser: carbón activado, grava, arena, arcilla granular, vidrio sinterizado, anillos de cerámica, etc. (Torres, 1994)

2.3.3 Microorganismos inmovilizados por atrapamiento

El uso de los sistemas de células inmovilizadas se ha incrementado en los procesos de bioconversión, desde la producción de alimentos, bebidas, productos farmacéuticos, producción de macromoléculas como ácidos orgánicos y aminoácidos, y otros compuestos químicos como alcohol, metano e hidrógeno.

El tratamiento biológico de aguas residuales está dentro de la categoría de procesos de bioconversión; este tipo de procesos es particularmente adecuado para el tratamiento no convencional de aguas residuales tóxicas (Cheetham, 1984). En Estados Unidos y Europa ha sido ampliamente estudiado, en México recién se ha comenzado a estudiar.

El procedimiento para la inmovilización por atrapamiento consiste en mezclar una suspensión de células con un polímero soluble en agua; al que se le agrega agentes entrelazantes (Skjak-Braek, 1991). En varios trabajos se han reportado diversos materiales para la inmovilización por atrapamiento, diferentes sistemas de elaboración; así como diferentes tamaños de partícula elaborados.

Tabla 4 Materiales de inmovilización por atrapamiento, sistemas de elaboración y tamaños de partícula obtenidos

MATERIAL DE INMOVILIZACIÓN	DIÁMETRO DE LA ESFERA	MÉTODO DE ELABORACIÓN	REFERENCIA
Alginato de sodio en CaCl ₂	5 mm	goteo	Cheetham y Bucke, (1984)
Alginato de sodio Poliacrilamida-hidrazida en CaCl ₂	3 mm 2.3-2.5 mm	extrusión en aguja, goteo	Bettman y Rehm, (1984) y (1985)
Alginato de sodio en CaCl ₂	1.9 mm 2.85-4.5 mm	adición continua	Cheetham <i>et al.</i> , (1979)
Quitosan en Ac. acético	1.9 mm	goteo	Amihay y Dror, (1994)
Alginato de sodio en CaCl ₂	3-4 mm 3.16 ± 0.13 mm	extrusión con bomba peristáltica	Wu <i>et al.</i> , (1994)
Alginato de sodio en CaCl ₂	4.1- 4.6 mm	n.d.	Jang, (1994)
κ -carragenina en KCl	3 mm	extrusión	Chevalier y de la Noüe, (1986)
κ -carragenina en KCl	3-4 mm	extrusión	Chevalier y de la Noüe, (1987)
κ -carragenina en KCl / CaCl ₂	3-4 mm	extrusión	Chevalier y de la Noüe, (1988)
Alginato de sodio en CaCl ₂	Vol. 11 µL (13.8 mm)	goteo	Fujikawa <i>et al.</i> (1988)
Alginato de sodio en CaCl ₂	n.d.	goteo	Wiesmann <i>et al.</i> , (1993)

Continuación de la Tabla 4...

Alginato de sodio en CaCl ₂	n.d.	goteo	Boross <i>et al.</i> (1990)
Alginato de sodio en CaCl ₂	3 mm	goteo	Sissel <i>et al.</i> , (1992)
Alginato de sodio en CaCl ₂	3.5-4.5 mm	goteo	Martinsen <i>et al.</i> (1992)
Alginato de sodio en CaCl ₂	0.2-3 mm	goteo	Smidsrod y Skjak-Braek, (1990)
Alginato de sodio en CaCl ₂	3-4 mm	goteo	Martinsen <i>et al.</i> , (1989)
Alginato de sodio en CaCl ₂	n.d.	goteo	Busto <i>et al.</i> , (1995)
Alginato de sodio en CaCl ₂	2.4 mm	extrusión	Van Ginkel <i>et al.</i> , (1983)
Carragenina en KCl	2.04 ± 0.22 mm	goteo	Wijffels <i>et al.</i> , (1991)
Alginato de sodio en CaCl ₂	3 y 5 mm	extrusión	Oyaas <i>et al.</i> , (1995)
κ - carragenina en KCl	2.04 ± 0.22	extrusión	Wijffels <i>et al.</i> , (1995)
κ - carragenina en KCl	3 mm	extrusión	Chevalier y de la Noüe, (1985)
κ-carragenina en KCl	0.33 cm ³	goteo	Anselmo <i>et al.</i> (1985)
Alginato de sodio en CaCl ₂	0.58 cm ³		
Alginato en CaCl ₂	3 mm	extrusión en aguja goteo	Keweloh <i>et al.</i> , (1989)
Alginato de sodio en CaCl ₂	3 mm	extrusión en aguja, goteo	Weistmeier y Rehm (1985)
Alginato de sodio en CaCl ₂ Alginato/Quitosan en CaCl ₂	3 mm	extrusión en jeringa	Zache y Rehm (1985)

NOTA: n.d.: no determinado

En el caso del alginato de sodio, el tamaño de las esferas depende de factores como la viscosidad de la solución, el tipo y la concentración de alginato. Smidsrod y Skjak-Braek (1990) encontraron que el tamaño de las esferas puede controlarse por medio de un flujo de aire coaxial sobre la aguja de extrusión.

Utilizando una solución de alginato determinada, el tamaño de las esferas depende sólo del flujo de aire para un diámetro de aguja dado, y el tamaño de esferas obtenido está en un rango de 0.2 a 3 mm

En varios trabajos se reportan diferentes concentraciones de polímero y células en la mezcla utilizada para la inmovilización en las esferas (Tabla 5).

Tabla 5
Concentraciones de polímero y cantidad de células utilizados en la inmovilización por atrapamiento

Concentración de polímero en la mezcla (%)	Cantidad celular en la mezcla	Referencia
2 (alginato)	n.d.	Busto <i>et al.</i> , (1995)
2.5 (alginato)	n.d.	Van Ginkel <i>et al.</i> (1983)
2.6 (carragenina)	$4.5 \times 10^{-3} \text{ kg/m}^3$	Wijffels <i>et al.</i> (1991 y 1995)
4 (alginato)	$1 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$	Chevalier y de la Noüe (1988)
2 (alginato)	25, 50, 75 g (peso seco)/L	Oyaas <i>et al.</i> (1995)
1.5 (quitosan)	0.5 g (p/p)	Freeman y Dror (1994)
2.5 (carragenina)	$8.2 \text{ y } 7.7 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$	Chevalier y de la Noüe (1986)
2.5 (carragenina)	3.29 g (peso seco)/L	Chevalier y de la Noüe (1985)
4 (alginato)	40 y 60 g (peso seco)/L	Marwaha <i>et al.</i> (1988)
5-7 (alginato)	0.8 g (peso húmedo)/100mL	Westmeier y Rehm (1985)
5-7 (poliacrilamida-hidrazida)	n.d.	Bettman y Rehm (1985)
5-7 (alginato)	n.d.	Zache y Rehm (1989)
2 (agar)	1500 mg/L en cada uno	Anselmo <i>et al.</i> (1985)
3.5 (carragenina)		
2 (alginato)		
2 (alginato)	$1 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$	Keweloh <i>et al.</i> (1990)
5-7 (alginato)	300 mg (peso seco)/100 mL polímero	Bettmann y Rehm (1984)
2 (alginato)	n.d.	Keweloh <i>et al.</i> (1989)
5 (alginato)	20 % (peso húmedo)/V	Cheetham <i>et al.</i> (1979)
2 (alginato)	60 g /50 mL de polímero	Wu <i>et al.</i> (1994)
3 (carragenina)	n.d.	Chevalier y de la Noüe (1987)
4 (alginato)	$2.5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$	Marwaha <i>et al.</i> (1990)
2 (alginato)	n.d.	Wiesman <i>et al.</i> (1994)
3, 4 y 5 (alginato)	$1 \times 10^6 \text{ a } 1 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$	Boross <i>et al.</i> (1990)

NOTA: n.d. no determinado

La inmovilización (por atrapamiento) de microorganismos que degradan tóxicos, ofrece varias ventajas (Torres, 1994):

- a) Las actividades de los microorganismos inmovilizados son altas, y pueden conservarse en almacenamiento por varios meses sin pérdida de su actividad.
- b) Concentraciones altas y bajas de los compuestos de interés son degradados por los microorganismos inmovilizados.
- c) Evita el crecimiento excesivo de los microorganismos sin que exista la acumulación y contaminación del material celular como sucede en los sistemas convencionales de lodos activados y lagunas aereadas.
- d) Protegen al microorganismo contra el efecto inhibitor del tóxico, obteniéndose altas tasas de biodegradación con respecto a los microorganismos libres. (Keweloh, 1989)

El atrapamiento en alginato de calcio es un método sencillo, rápido y seguro para las células, ya que es compatible con la mayoría de ellas. Evita la pérdida de su viabilidad y es un material con buenas características de resistencia y bajo costo (Skjak y Martinsen, 1991). Se han reportado para el alginato de calcio tiempos de vida media operacional de hasta 8,500 horas, mayor a otros materiales (Cheetham y Bucke, 1984).

2.3.4 Caracterización de los procedimientos de inmovilización

La caracterización de los procedimientos de inmovilización debería ser llevada a cabo, de acuerdo con los siguientes criterios (Klein y Ziehr, 1990):

- a) Carga biomásica.

Cuando los microorganismos son inmovilizados por adsorción en la matriz, la carga celular es un factor limitante. El comportamiento de adhesión depende de las propiedades fisicoquímicas de adsorción de la matriz, de los microorganismos inmovilizados especialmente por la superficie de su pared celular, de la composición, los parámetros fisicoquímicos y las condiciones de la fase líquida.

Se han realizado investigaciones fisicoquímicas de las interfases, planteando dos modelos, uno llamado teoría DLVO basado en la interacción de dos partículas sólidas. La adhesión es causada por fuerzas de Van der Waals y por interacciones electrostáticas de repulsión o atracción, medidas mediante un potencial Zeta (Mozes *et al.*, 1987; Van der Mei *et al.*, 1988), el cual caracteriza las propiedades eléctricas de los microorganismos. El otro modelo es una descripción termodinámica basada en la energía libre de Gibbs de adhesión por unidad de área de interfase, que es calculada mediante el ángulo de contacto para la célula y el soporte.

El ángulo de contacto se correlaciona con la hidrofobicidad de la capa celular o del soporte. Se ha encontrado una función directa entre la cantidad de bacterias por unidad de volumen y la hidrofobicidad de la bacteria. En el caso de *Pseudomonas fluorescens* (Pringle y Fletcher, 1986), la adsorción a un hidrogel disminuyó con el aumento de contenido de agua del gel; la distancia de separación entre el soporte y las células, es de 0 a 100 nm, para esta misma cepa, la cual tiene una carga negativa.

La carga celular está limitada por el área de superficie del soporte, para obtener la mayor eficiencia en la inmovilización a soportes porosos, los poros más pequeños deben tener un tamaño mayor al de los microorganismos; el diámetro de poro óptimo debe ser de 4 a 5 veces el tamaño de la célula (Messing, 1982).

En diferentes materiales como glutaraldehído, madera, cerámica, vidrio, celulosa, PVC; se han encontrado cargas celulares de entre 21.3 y 700 mg de biomasa por gramo de soporte, para diferentes microorganismos (Klein y Ziehr, 1990). El número de células por gramo de vidrio poroso ha sido reportado entre 1.6×10^8 y 2.6×10^9 para bacterias y entre 1.8×10^6 y 2.7×10^7 para levadura (Messing y Opperman, 1979). Finalmente, se ha reportado que 1×10^{12} células por mL se inmovilizaron en acetato de celulosa.

b) Capacidad de retención / fuerza de adhesión

La fuerza de adhesión puede determinarse con la velocidad de flujo máxima, la cual fuerza a las células a desprenderse; las células son adsorbidas en un lecho fijo bajo ciertas condiciones y la velocidad de flujo se aumenta continuamente; la desorción se mide por la turbiedad del líquido circundante (Marcipar *et al.*, 1980; Moo Young *et al.*, 1980). La fuerza de adhesión también depende del pH en el medio para un determinado microorganismo, pudiéndola aumentar o disminuir (Klein y Ziehr, 1990).

Tabla 6 Comparación de la inmovilización por adsorción y atrapamiento (Klein y Ziehr, 1990)

	Adsorción	Atrapamiento
Carga biomásica (peso seco / gramo de soporte)	menor a 200	arriba de 700 mg
Retención de biomasa	baja	alta, completa
Resistencia a la transferencia de masa: externa interna	frecuente frecuente	rara frecuente
Estado fisiológico	diferente	no cambia
Estabilidad operacional: células muertas células mantenidas crecimiento celular	bajo no investigadas muy alto	alto/muy alto alto muy alto
Tipo de reactor	lecho fijo	lecho fijo lecho fluidificado tanque agitado

c) Efectividad del catalizador / transferencia de masa

Cuando el tamaño de partícula es menor a un milímetro y la carga biomásica no es mayor al 50 %, la resistencia externa a la transferencia de masa es pequeña (Klein y Zierh, 1990).

d) Estabilidad operacional

La estabilidad operacional se refiere al tiempo en el cual el sistema puede permanecer trabajando sin presentar ninguna alteración en su funcionamiento. Un bioreactor con *Fusarium flociferum* adsorbido en poliuretano operó por más de dos meses sin disminución de su actividad. El biocatalizador se utilizó para degradar fenol en un proceso semicontinuo (Anselmo, *et al.*, 1985). La producción de penicilina usando celita como soporte trabajó en un proceso continuo por un mes sin pérdida significativa de actividad (Kim *et al.*, 1986). La estabilidad de *G. oxydans* inmovilizada en alginato de calcio en operación continua, fue reportada por Adlercreutz *et al.*, 1985. La estabilidad del sistema *Penicillina acilasa* inmovilizada en resina epoxiacrílica fue estudiada en un sistema operado por lotes (Ospina *et al.*, 1992), en el cual se reporta un tiempo de vida media de 2880 horas operando el sistema a un pH de 7.5 y a una temperatura de 37°C. Las células inmovilizadas por adsorción presentan alta estabilidad, sin embargo, sistemas de células inmovilizadas por atrapamiento pueden operar por varios meses sin la pérdida de actividad (Klein y Zier, 1990).

2.4 Alginato

Hace aproximadamente un siglo, se llevaron a cabo los primeros estudios en la extracción de alginato obtenido de algas marinas caféas, mediante el proceso de lixiviación y destilación destructiva, (Chapman, 1970).

El alginato es un polisacárido que se encuentra en estas plantas marinas, las cuales tienen gran importancia comercial porque lo contienen en un alto porcentaje. Los alginatos comerciales son extraídos principalmente de especies como la *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* y otras especies menos utilizadas como la *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ectoclonia maxima*, *Lesonia negrescens* y *Sargassum sp.*; aunque existen otras más. Sin embargo los alginatos también pueden ser producidos por bacterias como *Azotobacter vinelandii* y varias especies de *Pseudomonas*, como *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. syngae*.

Los alginatos extraídos por algas o biosintetizados por bacterias presentan diferentes relaciones y diferentes arreglos de las unidades que conforman el polisacárido, los cuales se describirán en la siguiente sección (Skjak y Martinsen, 1991).

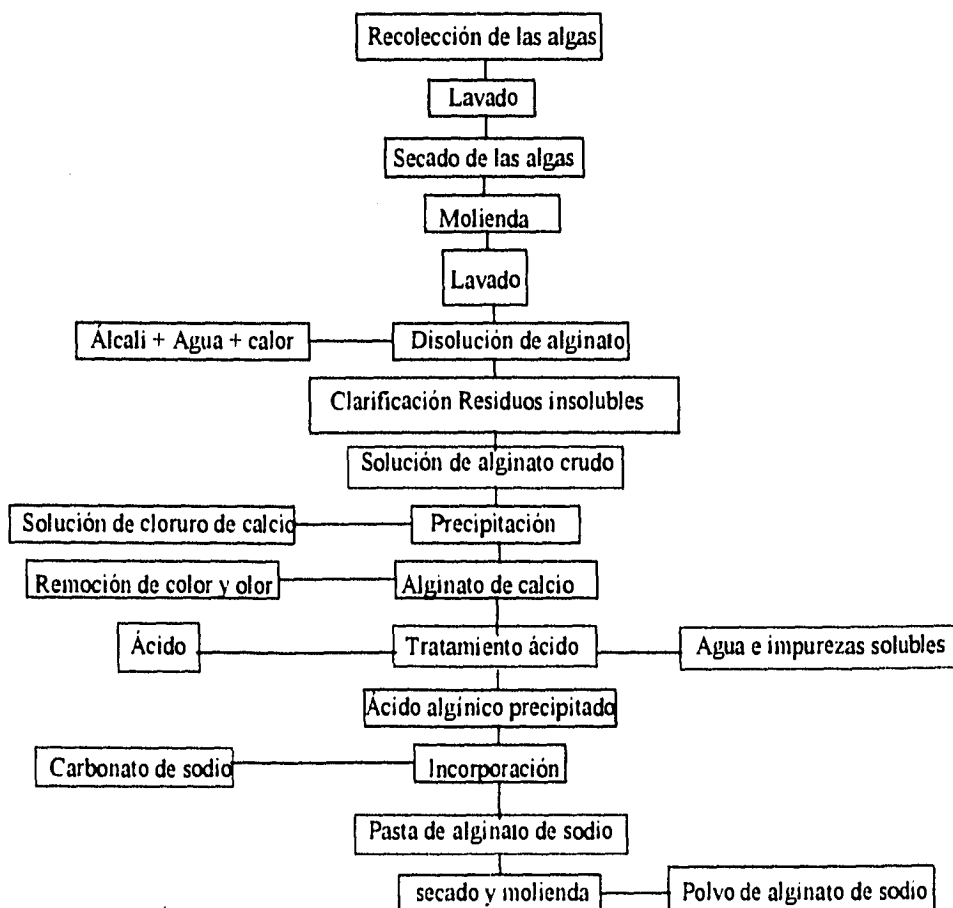
2.4.1 Obtención

Krefting en 1896 preparó ácido alginico puro, y más tarde otros investigadores determinaron muchas de las propiedades de las sales de este ácido. La producción de alginatos empezó en los Estados Unidos hace aproximadamente 50 años y luego empezó en varios países de Europa. Existen muchos métodos comerciales para la producción de alginato, sin embargo, todos tienen en común pasos fundamentales.

Las algas se cosechan cortándolas automáticamente y colocándolas en la embarcación, mientras son cortadas, se llevan rápidamente a procesarlas para la extracción de ácido alginico.

El alginato puede extraerse con una solución concentrada de cloruro de sodio; y el ácido alginico se puede neutralizar con álcalis para obtener la sal del ácido. Se puede usar óxido de propileno para obtener alginato de propilenglicol, también se usan sodio, potasio y amonio (Kelco Division of Merck & Co. Inc.,1992). A continuación se presenta un diagrama de flujo del proceso para la obtención del alginato de sodio.

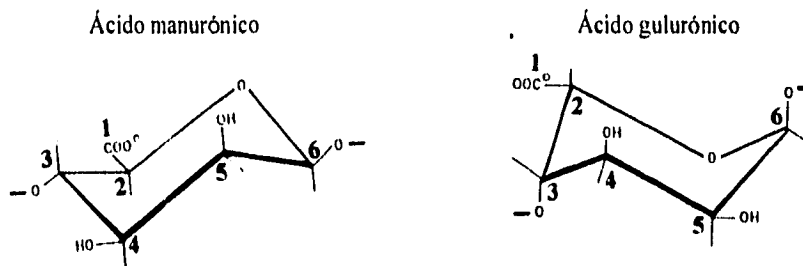
Figura 2. Diagrama de flujo de proceso de alginato de sodio



2.4.2 Características moleculares

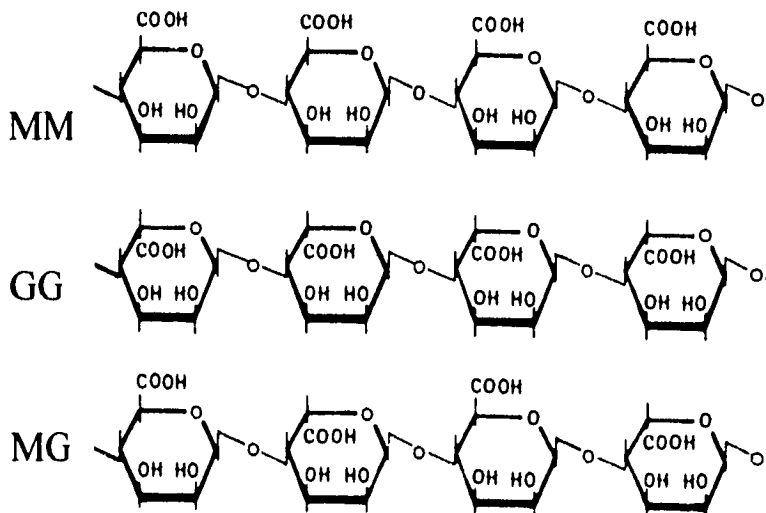
El ácido alginico es un copolímero constituido por dos unidades: el ácido 1,4 β-D-manurónico (M) y el ácido 1,4 α-L-gulurónico (G). No es una sustancia de composición constante, porque las proporciones de las unidades varían grandemente con la fuente botánica de la cual es extraída y de su estado de madurez; o bien de la especie de bacteria que lo sintetiza, en su caso.

Figura 3 Estructuras de los ácidos manurónico y gulurónico



Las moléculas de un ácido alginico típico, consisten de bloques homopoliméricos de ácidos manurónico (MM), bloques homopoliméricos de ácido gulurónico (GG) y secuencias alternadas de bloques de ambos ácidos (MG), (Chetham y Bucke, 1984).

Figura 4 Estructura de los segmentos del polímero en ácido alginico



La proporción de los ácidos manurónico y gulurónico afecta las propiedades de los alginatos; los alginatos con alto contenido de ácido manurónico (extraídos de *L. japonica*) se prefieren para la aplicación de películas, mientras que los alginatos con gran contenido de ácido gulurónico (extraídos de *L. hyperborea*) son mejores para la formación de geles. La rigidez de las moléculas de alginato en solución aumenta en el siguiente orden (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990) :



El ácido polimanurónico es una molécula parecida a una banda plana. Esta conformación está estabilizada por la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo hidroxilo en el carbono 3 de una unidad, y el átomo de oxígeno del anillo de la siguiente unidad de azúcar en la cadena. Las cadenas se enlazan por puentes de hidrógeno formados entre el hidroxilo del grupo carboxilo y el átomo de oxígeno en el carbono 3 en unidades de azúcar, formando cadenas paralelas entre el grupo hidroxilo axial del carbono 2 y el átomo de oxígeno del grupo carboxilo en cadenas antiparalelas (figura 5a).

La forma del ácido poligulurónico es algo diferente al del ácido polimanurónico; es una molécula parecida a una banda rizada. Su conformación está estabilizada por un hidrógeno intramolecular enlazado entre el grupo hidroxilo del carbono 2 y el átomo de oxígeno del grupo carboxilo en unidades adyacentes. Las cadenas de este ácido son más complicadas, ya que involucran moléculas de agua. Una molécula de agua está en posición tal que funciona como un donador o aceptor de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno formados son de 2.7 a 2.9×10^{-10} m (figura 5b), (Atkins *et al.*, 1971).

Figura 5 Representación esquemática de la conformación de los ácidos manurónico y gulurónico

(a) Ácido polimanurónico



(b) Ácido poligulurónico



Las sales de sodio del ácido alginico son solubles en agua, y forman una dispersión coloidal, las partículas de la fase dispersa se encuentran en contacto unas con otras de tal manera que mantienen una red tridimensional que engloba a la fase dispersante.

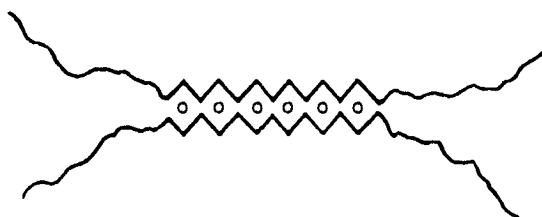
Una de las propiedades más importantes del alginato, es su habilidad para formar geles al reaccionar con cationes polivalentes con excepción del magnesio. El catión polivalente más usado para modificar la reología, viscosidad y las características del gel; de las soluciones de alginato, es el calcio.



El gel de alginato está formado por una red continua de macromoléculas interconectadas y entrelazadas formando fibrillas que al interaccionar establecen un cuerpo básico o esqueleto, en la que quedan atrapadas moléculas de agua, mediante puentes de hidrógeno.

La forma de los segmentos de ácido gulurónico y ácido manurónico son de bandas extendidas, que pueden hacinarse en láminas (Atkins *et al.* 1970 y 1971), Rees (1969) sugirió que en la estructura del gel, los iones calcio se enlazan entre los segmentos de cadenas de polímero, las cuales contienen al calcio dentro de los intersticios que forman, dando lugar al modelo caja de huevo (Grant *et al.*, 1973; Morris, 1986).

Figura 6 Modelo “caja de huevo” para un gel de alginato de calcio



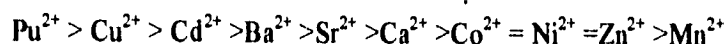
2.4.3 Propiedades físicas y químicas

Martinsen *et al.* (1989) estudiaron cómo las propiedades mecánicas y el fenómeno de *swelling* (o inchamiento) de los geles de alginato dependen de la composición y estructura secuencial del polímero. En los alginatos extraídos de diferentes especies de algas con diferente contenido de ácido gulurónico, encontraron que la rigidez del gel es mayor al aumentar la concentración del alginato, y con mayor contenido de bloques-G en la cadena del polímero. Los geles de alginato reducen su volumen durante la formación del gel, perdiendo moléculas de agua y aumentando la concentración del alginato en el gel.

En cuanto a la estabilidad química, la limitación de los geles de alginato como matrices de inmovilización celular es su sensibilidad hacia compuestos quelantes como fosfatos, citratos y lactatos, los cuales actúan como secuestrantes de los iones calcio, desestabilizando el gel.

Para evitar la desestabilización del gel, se ha sugerido mantenerlo en un medio que contenga algunos milimoles de calcio libres, con una relación $\text{Na}^+ : \text{Ca}^{2+}$ menor que 25:1 para alginatos con alto contenido de bloques G y 3:1 para alginatos con bajo contenido de ácido gúlicico. (Martinsen *et al.*, 1989)

Los geles de alginato se pueden estabilizar también desplazando los iones calcio, con otros cationes polivalentes que tengan afinidad con el alginato. La serie de afinidad para varios cationes divalentes es (Haug, 1964):



Se ha encontrado que la rigidez de los geles aumenta con la afinidad a los cationes polivalentes, excepto para iones cadmio y níquel. Se utilizan el bario y el estroncio en la inmovilización celular, porque resultan no tóxicos para las células, caso contrario al cadmio, plomo y cobre (Hiemstra *et al.*, 1983); el gel también puede estabilizarse con aluminio y titanio (Rocherfort *et al.*, 1986).

2.4.4 Reología

2.4.4.1 Reología de las soluciones de alginato

Un fluido al moverse sufre una deformación en la que sus capas se deslizan una sobre otra de manera paralela como respuesta a una fuerza constante aplicada en dirección de los planos deslizantes. El esfuerzo de corte es una fuerza por unidad de área de los planos del fluido y la velocidad de deformación es la velocidad relativa de cada capa de fluido. La constante de proporcionalidad entre el esfuerzo de corte y la velocidad de deformación se llama viscosidad. Cuando la relación entre ambos no cambia, se dice que el comportamiento de los fluidos es Newtoniano, como es el caso del agua; al graficarse el esfuerzo de corte contra la velocidad de deformación, se obtiene una línea recta que pasa por el origen.

Cuando al graficar el esfuerzo de corte contra la velocidad de deformación, no se obtenga una línea recta y/o no pase por el origen, los fluidos con este comportamiento se les conoce como no-Newtonianos, los cuales son: espesantes, plásticos de Bingham, reofluidificantes o adelgazantes. La relación del esfuerzo de corte entre la velocidad de deformación para los fluidos no-Newtonianos, se llama viscosidad aparente.

El comportamiento de la mayoría de los fluidos biológicos es pseudoplástico, como es el caso de las soluciones de alginato de sodio, en el cual, la viscosidad es una función de la velocidad de deformación (Scott Blair, 1969).

El comportamiento de las soluciones varía con la temperatura y la concentración del polímero. Las soluciones con baja concentración de alginato de sodio presentan una viscosidad aparente alta debido al alto peso molecular y a la rigidez del polímero; en soluciones concentradas se nota un comportamiento más pseudoplástico (Kelco, 1992).

2.4.4.2 Reología de los geles de alginato

Existen muchas técnicas para medir el comportamiento de geles, entre éstos se encuentra la reometría de cizallamiento oscilatorio, que determina el módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G''), y la viscosidad dinámica (ETA'). El módulo de almacenamiento (G'), manifiesta el comportamiento elástico (de un sólido), mientras que el módulo de pérdida (G'') representa el comportamiento viscoso (de un líquido).

El principio en el que se basa esta reometría es en el comportamiento viscoelástico del gel. La elasticidad de la muestra es proporcional a la respuesta retardada entre la deformación y el esfuerzo medidos.

El viscosímetro provoca una deformación oscilatoria con un voltaje sinusoidal sobre la muestra, la cual reacciona con una respuesta retardada del esfuerzo, caracterizada por su amplitud y la fase cambia en relación a la deformación sinusoidal. (Shatwell y Shutherland, 1991).

2.5 Microorganismos que degradan fenol y clorofenoles

Existen varios géneros de hongos (*Desulfomonile*, *Streptomicetes* *Mycobacterium*, *Flavobacterium* y *Arthrobacter*) y bacterias (*Alcaligenes*, *Fusarium*, *Pseudomonas* y *Cryptococcus*) (Uotila, 1993) que poseen capacidad para degradar fenol y clorofenoles.

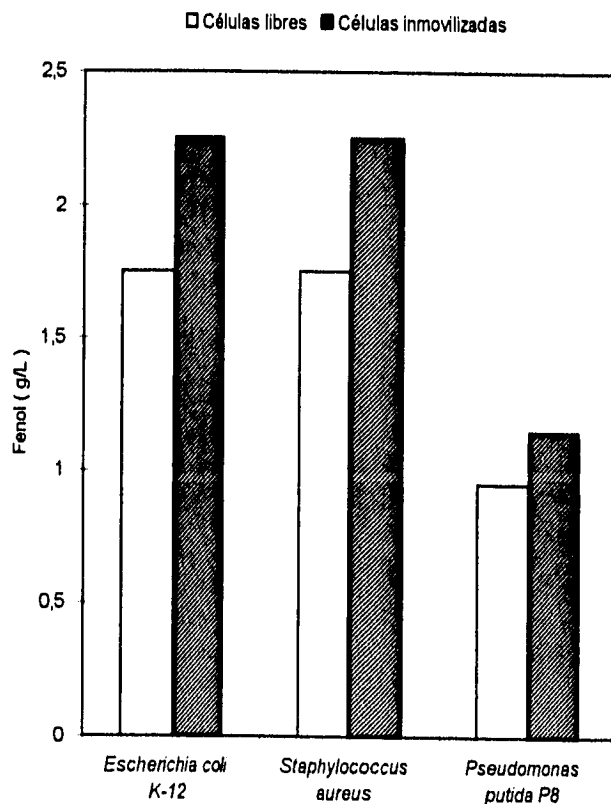
Bettman y Rehm (1985, 1984) reportaron que *Pseudomonas putida* P8 inmovilizadas en poliacrilamida-hidrazida, en un reactor de lecho fluidificado, degradaron concentraciones de fenol de hasta 3 g/L. También *Pseudomonas sp.* inmovilizadas en alginato de calcio y poliacrilamida-hidrazida en un fermentador "airlift" degradaron hasta 2 g/L de fenol, concentración a la cual las células en un sistema libre no crecieron.

Por otra parte, *Alcaligenes sp. A7-2* inmovilizadas en alginato, se emplearon para estudiar la biodegradación de 4-clorofenol, en la cual, el pH y la temperatura juegan un papel importante para su biodegradación.

La inmovilización por atrapamiento de *Fusarium flocciferum* en agar, κ -carragenina, alginato y poliuretano fue estudiada por Anselmo *et al.* (1985). La degradación de fenol, se llevó a cabo en un sistema batch. Todos los materiales, con excepción del poliuretano presentaron velocidades de degradación adecuadas debido a la capacidad de las matrices a adsorber fenol. Se degradaron concentraciones de 2.5 a 4 g/L sin pérdida de la actividad celular por más de dos meses. Dapaah y Hill (1992), reportan la biodegradación de mezclas de 2, 3 y 4-clorofenol por *Pseudomonas putida*.

Keweloh *et al.* (1989) reportaron altas tasas de biodegradación de fenol cuando se emplea la inmovilización por atrapamiento en alginato de calcio. Ellos realizaron la comparación de las dosis mínimas inhibitorias de fenol sobre tres diferentes bacterias (figura 7), cuando éstas se encuentran libres e inmovilizadas. Encontraron que la inmovilización confiere una protección tal al microorganismo que soporta hasta un 20% más del tóxico.

Figura 7 Concentración mínima inhibitoria de fenol para tres bacterias (Keweloh *et al.*, 1989)



Lee *et al.* (1994) inmovilizaron un cultivo mixto de microorganismos, del cual identificaron seis especies: *Agrobacterium radiobacter*, *Acinetobacter calco*, *Var anitratos* y *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. testosteroni*); utilizaron un sistema de reactores batch para la biodegradación de fenol, 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol. Estos autores compararon la biodegradación de cada tóxico, por la misma concentración de células libres e inmovilizadas (300 mg peso seco /100 mL de solución).

Ellos encontraron (figuras 8 y 9) que las células libres e inmovilizadas pueden biodegradar efectivamente bajas concentraciones de fenol (100 y 200 mg/L). El 96% de fenol fue biodegradado en tres días por las células inmovilizadas, cuando su concentración fue de 300 mg/L. Sin embargo un 10% menos fue biodegradado por las células libres. Un aumento de la concentración del fenol aumentó la fase de adaptación de las células inmovilizadas para degradar fenol. Cuando la concentración de fenol fue de 400 y 500 mg/L, éste fue completamente biodegradado en 8 y 11 días respectivamente. El fenol se mantuvo intacto por las células libres cuando su concentración fue de 400 mg/L. Sus resultados indicaron que las células inmovilizadas tuvieron mejor biodegradación de fenol, especialmente a altas concentraciones.

Figura 8 Biodegradación de fenol por células inmovilizadas (Lee *et al.*, 1994)

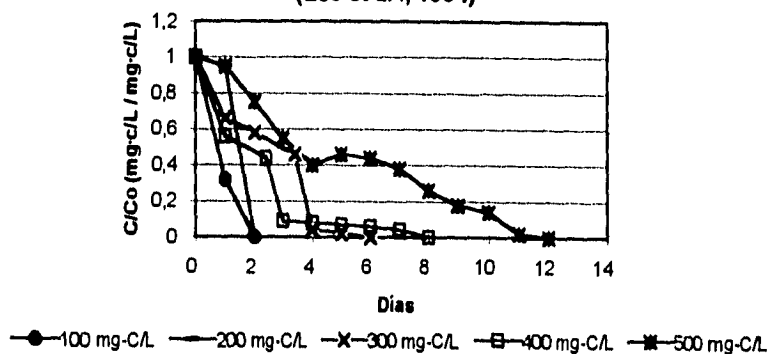
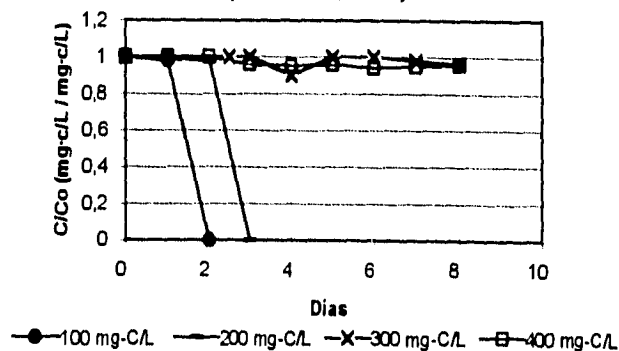


Figura 9 Biodegradación de fenol por células suspendidas (Lee *et al.*, 1994)



Los resultados que obtuvieron con 2-clorofenol se muestran en las figuras 10 y 11. El 2-clorofenol fue lentamente biodegradado por células inmovilizadas cuando su concentración fue entre 10 y 50 mg/L. Las células inmovilizadas degradaron completamente 10 mg/L de 2-clorofenol en 10 días. Un aumento de la concentración de este tóxico disminuyó su eficiencia. Cuando la concentración del tóxico alcanzó los 50 mg/L, las células no pudieron biodegradarlo efectivamente. Después de 4 días de operación, la remoción del 2-clorofenol por las células inmovilizadas fue solamente el 33%, cuando su concentración inicial fue de 50 mg/L. Sin embargo, sólo el 13% fue removido por las células libres. Después de 4 semanas de operación, el 2-clorofenol no fue removido eficientemente por las células libres. Todo indicó que el 2-clorofenol fue removido más eficientemente en reactores alimentados con células inmovilizadas.

Figura 10 Biodegradación de 2-clorofenol por células inmovilizadas (Lee et al., 1994)

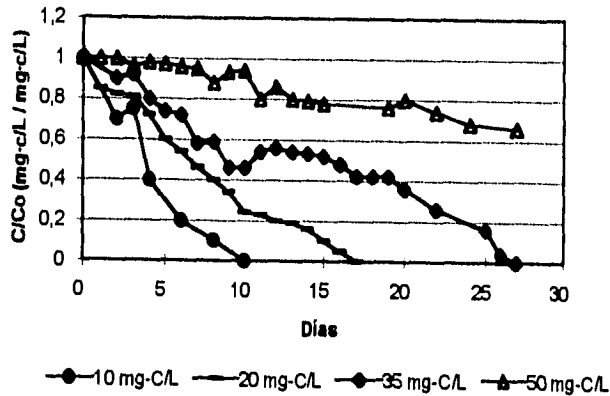
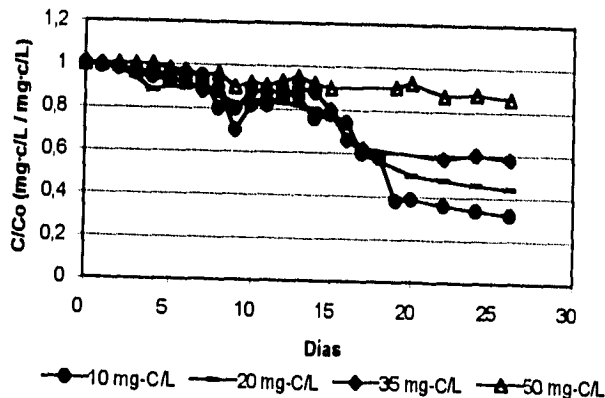


Figura 11 Biodegradación de 2-clorofenol por células suspendidas (Lee et al., 1994)



En las figuras 12 y 13 se muestran los resultados que obtuvieron con el 2,4-diclorofenol. Los resultados indicaron que el tóxico puede ser removido completamente por las células inmobilizadas en 5 días, cuando su concentraciones iniciales fueron de 20 y 40 mg/L. Sin embargo, la velocidad de biodegradación del tóxico disminuyó significativamente por las células inmobilizadas, cuando su concentración fue dentro del rango de 80 y 200 mg/L. La figura 13 muestra que el 2,4-diclorofenol pudo ser efectivamente biodegradado por las células libres, sólo cuando su concentración inicial fue de 20 mg/L. La eficiencia de la remoción del 2,4-diclorofenol disminuyó significativamente por las células libres, cuando su concentración inicial fue mayor a 40 mg/L. Los resultados indicaron que las células inmobilizadas pudieron biodegradar más eficientemente el 2,4-diclorofenol cuando su concentración fue relativamente más baja. Las células inmobilizadas también pudieron soportar el tóxico cuando su concentración inicial fue relativamente más alta. Los resultados indicaron que el uso de las células inmobilizadas puede reducir el periodo de adaptación de la biodegradación y aumentar la velocidad de biodegradación.

Figura 12 Biodegradación de 2,4-diclorofenol por células inmobilizadas (Lee et al., 1994)

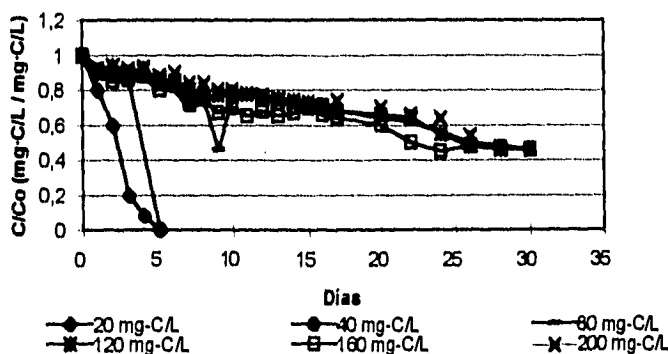
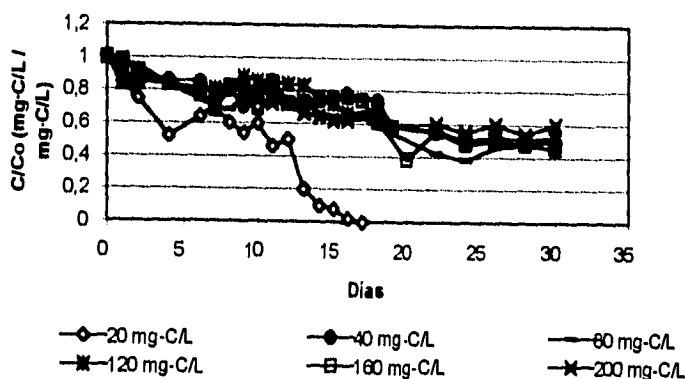


Figura 13 Biodegradación de 2,4-diclorofenol por células suspendidas (Lee et al., 1994)



3. Materiales y métodos

3.1 Cultivo de *Pseudomonas fluorescens*

La cepa de *Pseudomonas fluorescens* fue donada por el (Instituto Cubano de Investigaciones sobre la Caña de Azúcar, La Habana, Cuba). Ésta fue previamente caracterizada por su alto potencial en la degradación de fenol, cloro, nitro, metilfenoles y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Cabello, 1996).

La cepa se recibió en slants, y se transfirió para su conservación en cajas Petri con medio YPG - agar, conservándose en refrigeración a 10 °C.

3.1.1 Medios de cultivo

3.1.1.1 Medio rico

MEDIO DE CRECIMIENTO YPG

COMPONENTE	g/L	
Extracto de levadura	10	(Bioxon, México)
Peptona	10	(Bioxon, México)
Glucosa	10	(Bioxon, México)
Agar - agar (Para medio sólido)	18	(Bioxon, México)

Ajustar el pH = 7 y esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

3.1.1.2 Medios mínimos

MEDIO MÍNIMO (Dapaah y Hill, 1992)

COMPONENTE	g/L	
Fosfato de potasio monobásico	0.840	(J.T. Baker)
Fosfato de potasio dibásico	0.750	(J.T. Baker)
Sulfato de amonio	0.488	(J.T. Baker)
Cloruro de sodio	0.060	(J.T. Baker)
Cloruro de calcio	0.060	(J.T. Baker)
Sulfato de magnesio	0.060	(J.T. Baker)
Cloruro ferroso	0.006	(J.T. Baker)

MEDIO MÍNIMO PARA *PSEUDOMONAS* (Cabello, 1995)

COMPONENTE	g/L	
Fosfato de potasio monobásico	1.5	(J.T. Baker)
Fosfato de potasio dibásico	3.5	(J.T. Baker)
Nitrato de potasio	0.05	(J.T. Baker)
Sulfato ferroso amoniacal	0.01	(J.T. Baker)
Sulfato de amonio	1.0	(J.T. Baker)
Sulfato de magnesio	0.2	(J.T. Baker)
Cloruro de calcio	0.05	(J.T. Baker)

Ajustar los medios a pH = 7 y esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

3.1.2 Preparación de los inóculos

Los inóculos se prepararon en matraces Erlenmeyer de 250 mL, colocando 50 mL de medio YPG estéril e inoculando con tres asadas de biomasa cada uno. El medio de estos matraces fue crecido a 35 °C con una velocidad de agitación de 1,500 r.p.m. por 24 hrs.

3.1.3 Crecimiento de la cepa en medio YPG**3.1.3.1 Crecimiento en medio concentrado**

Se inocularon dos matraces Erlenmeyer de 250 mL, cada uno con 50 mL de medio YPG esterilizado, con tres asadas, y se dejaron crecer a 35 °C por 48 hrs con una velocidad de agitación de 1,500 r.p.m.

Se determinó el crecimiento celular midiendo el incremento de la densidad óptica leyendo la absorbancia de una dilución 1:10 a 610 nm, en un espectrofotómetro (Perkin Elmer)

3.1.3.2 Crecimiento en medio diluido

Se prepararon 50 mL de medio diluido YPG 1:10, se inocularon con tres asadas de biomasa y su crecimiento se llevó a cabo a 35 °C por 48 hrs con una velocidad de agitación de 1,500 r.p.m.

Se determinó el crecimiento por absorbancia a 610 nm de una dilución 1:10

3.1.3.3 Crecimiento en medio con Hierro

El procedimiento fue el mismo que el medio rico, pero esta vez se agregaron 0.25 mg/L de sulfato de hierro II. Las densidades ópticas se determinaron a 610 nm de una dilución 1:10 utilizando un blanco que también contenía sulfato de hierro II.

3.1.3.4 Crecimiento en medio con Cobre

El procedimiento fue el mismo que el medio rico, pero esta vez se agregaron 0.25 µg/mL de sulfato de cobre II. Las densidades ópticas se determinaron de la misma forma que en el paso anterior, utilizando un blanco que también contenía sulfato de cobre II.

3.1.3.5 Determinación del polímero

REACTIVOS

1. Cloruro de sodio (J.T. Baker)
2. Alcohol isopropílico (Droguería Cosmopolita, S.A.)

1. Tomar 3 mL de muestra y adicionar 0.21 g de cloruro de sodio previamente pulverizado.
2. Agregar dos volúmenes de alcohol isopropílico por un volumen de muestra.
3. Decantar el alcohol y lavar el precipitado dos veces con alcohol isopropílico.
4. Secar el polímero en estufa a 50 °C hasta peso constante.

3.1.3.6 Determinación de la viscosidad

A cada una de las muestras de crecimiento en los medios modificados se les determinó la viscosidad a 60 r.p.m. en el viscosímetro Brookfield (Modelo DV-1) con agujas LVT a temperatura ambiente.

1. Colocar 33 mL de muestra en una probeta.
2. Colocar en el viscosímetro la aguja No. 1.
3. Prender el viscosímetro y calibrar el indicador a cero.
4. Al estar el indicador de lectura en cero, sumergir la aguja dentro de la muestra. Cuidar que el nivel superior de ésta coincida con la marca de inmersión de la aguja.
5. Seleccionar la velocidad y prender el motor.
6. Tomar la lectura indicada una vez que se estabilice el indicador de lectura.

3.1.3.7 Determinaciones reológicas

Para esta evaluación, a cada muestra se le determinó la viscosidad en el viscosímetro antes mencionado, con diferentes velocidades (3.0, 6.0, 12.0, 30.0 y 60.0 r.p.m.) a temperatura ambiente, siguiendo el procedimiento anterior (sección 3.1.3.6).

Nota: en cada cambio de velocidad apagar el motor, y sin retirar la muestra seguir los pasos 5 y 6.

En base al modelo de la Ley de Potencia, se calcularon los valores de n (índice de flujo) y K (índice de consistencia) mediante un software (Brito, 1988) que toma en cuenta la geometría del sistema empleado y las propiedades del flujo a evaluar.

$$\text{Ley de Potencia: } \tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

Donde:

- τ Esfuerzo de corte (N/m^2)
- K Índice de consistencia ($\text{N}\cdot\text{s}^n/\text{m}^2$)
- $\dot{\gamma}$ Velocidad de deformación (s^{-1})
- n Índice de flujo

Se construyeron las curvas de flujo (viscosidad *versus* velocidad de deformación)

3.1.4 Fermentación

Se realizó la producción de biomasa en un fermentador (Marca Applikon) con capacidad de 5 litros. Para la fermentación se ocuparon inóculos de 6 matraces, cada uno con 50 mL del medio de cultivo, los cuales se mezclaron y se transfirieron al fermentador, el cual contenía 2.7 L de medio YPG sin esterilizar. El volumen de trabajo fue de 3 L en total.

Se operó a una velocidad de agitación de 600 r.p.m. y a temperatura controlada (30°C).

Se sacaron muestras de 30 mL cada 4 horas, para las determinaciones de conductividad, pH, D.O. y viscosidad.

Además de esta fermentación, se realizó otra igual pero a temperatura ambiente no controlada, con una velocidad de agitación de 700 r.p.m.

3.1.4.1 Determinación del crecimiento.

La biomasa se determinó por densidad óptica (D.O.) en el espectrofotómetro (Perkin Elmer) a 610 nm.

1. Tomar 1 mL de la muestra y diluir 1:10.
2. Leer la densidad óptica total a 610 nm.
3. Centrifugar la solución a 3,000 r.p.m. durante 20 minutos.
4. Separar cuidadosamente el sobrenadante y leer su absorbancia a 610 nm.
5. Obtener la Densidad Óptica celular restando a la D.O. total (paso 2), la D.O. del sobrenadante (paso 4).

3.1.4.2 Determinación de la conductividad

1. Tomar una muestra de 15 mL en una probeta e introducir el electrodo del conductímetro (HI8033 Hanna instruments).
2. Prender el conductímetro en la escala adecuada de 19,990 μ Siemens.
3. Tomar la lectura una vez estabilizada, a temperatura ambiente.

3.1.4.3 Determinación del pH

1. Tomar una muestra de 15 mL en una probeta e introducir el electrodo del potenciómetro (Hach one Phmeter Model PBL) previamente calibrado.
2. Tomar la lectura una vez estabilizada, a temperatura ambiente.

3.1.4.4 Determinación de la viscosidad

Se tomó una muestra de 30 mL y para evaluar la viscosidad, se siguió el mismo procedimiento antes descrito (sección 3.1.3.6)

3.1.4.5 Determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC)

Se tomó 1 mL de muestra, la cual se diluyó a niveles desde 1×10^{-8} hasta 1×10^{-28} , y se sembraron tres diluciones en cajas Petri con medio YPG-agar. La cuenta total se llevó a cabo a las 24 hrs.

3.1.4.6 Determinación del polímero

Se llevó a cabo según la sección 3.1.3.5

3.1.5 Crecimiento de la cepa en medio mínimo

Para evaluar el crecimiento de la cepa en los medios mínimos, se utilizaron como inóculos 5 mL de un medio de cultivo previamente desarrollado, según se describió en la sección 3.1.2

Dos matraces con 45 mL de medio mínimo, uno con el medio Dapaah (Dapaah y Hill, 1992), y otro con el medio para *Pseudomonas*, se inocularon y se dejaron crecer a 32 °C con agitación a 2,000 r.p.m.

Por otro lado, se desarrollaron crecimientos en medio Dapaah, en las mismas condiciones adicionando diferentes concentraciones de calcio (6 g/L, 0.6 g/L y 0.06 g/L de CaCl₂) para cada matraz.

3.1.6 Separación de las células por centrifugación

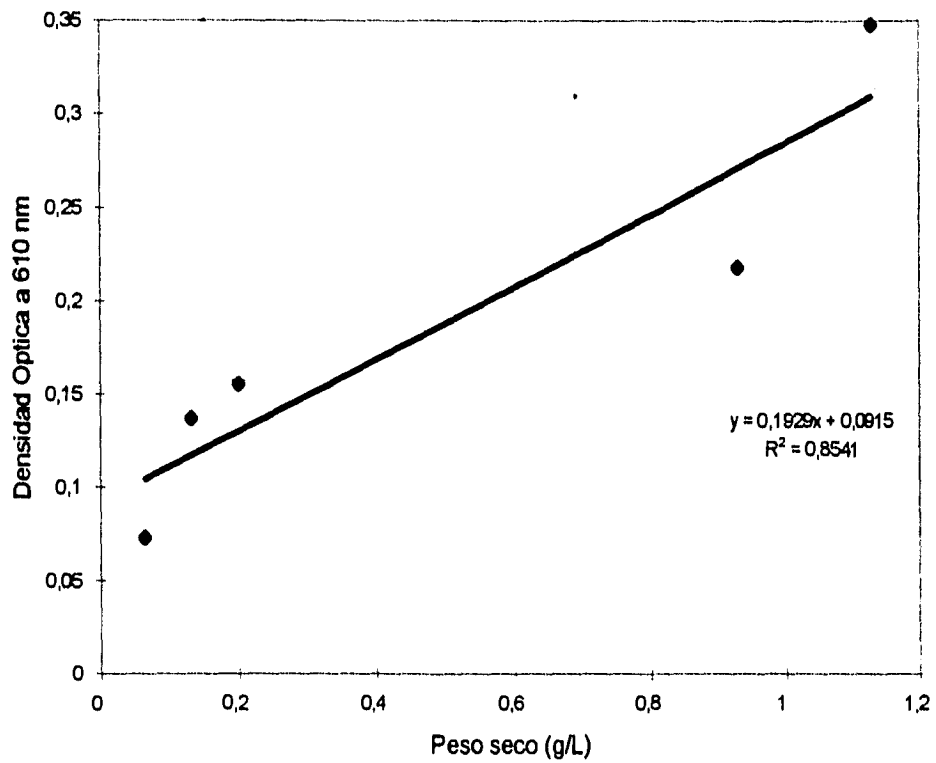
Se realizó la separación de las células tomando muestras de 1.5 mL de los medios ricos crecidos, concentrado y diluido 1:10, mediante una centrifugadora (EPPENDORF 5415 C) a diferentes velocidades (4,000 r.p.m., 8,000 r.p.m., 10,000 r.p.m., y 14,000 r.p.m.), por 20 minutos.

Posteriormente se determinaron las densidades ópticas totales y las de los sobrenadantes a 610 nm.

3.1.6.1 Curva de peso seco

1. Resuspender las células centrifugadas en 20 mL de agua destilada.
2. Filtrar a través de membranas Millipore de tamaño de poro de 0.41 µm previamente puestas a peso constante.
3. Secar a 40 °C hasta peso constante.
4. Obtener el peso de las células restando el peso inicial de la membrana menos el peso final.
5. Construir una gráfica de D.O. en función de la concentración de células en peso seco.

Figura 14 D.O. a 610 nm versus concentración de la biomasa en peso seco



3.1.6.2 Determinación de la biomasa

1. Hacer una dilución 1:10 de una muestra y mezclar.
2. Leer la D.O. total a 610 nm.
3. Tomar 1.5 mL y centrifugar (EPPENDORF 5414C) a 14,000 r.p.m. durante 20 minutos.
4. Separar el sobrenadante cuidadosamente.
5. Determinar la humedad de las células centrifugadas, tomando una muestra y secándola a 30°C hasta peso constante.

3.2 Biodegradación de fenol y clorofenoles por medio de las células libres

Para la degradación de fenol, y los clorofenoles; se inocularon 45 mL de medio YPG, los cuales se dejaron crecer por 24 hrs a 35 °C, con una velocidad de agitación de 1,500 r.p.m. y se les agregó una concentración conocida del dicho tóxico. Las concentraciones de fenol que se agregaron en cada matraz Erlenmeyer fueron de 1, 10, 50, 100, 200 y 500 mg/L. Las concentraciones de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol fueron de 1, 10 y 50 mg/L para cada tóxico. Las densidades ópticas de 1 mL de muestra con dilución 1:10 de cada matraz se leyeron a 610 nm. Las muestras se tomaron aproximadamente cada 5 horas.

La razón por la cual se leyeron las absorbancias a 610 nm es porque se determinó el crecimiento celular a medida que el tóxico se biodegradaba. Por otro lado también se tomó 1 mL de muestra para detectar la desaparición del tóxico con la técnica de la 4-aminoantipirina, explicada en la sección 3.7 .

3.3 Elaboración del biocatalizador

REACTIVOS

1. Alginato de sodio (Droguería Cosmopolita, S.A.)
2. Azida de sodio 40 p.p.m. (J.T. Baker)
3. Cloruro de calcio 0.1 M (J.T. Baker)
4. Agua destilada

La preparación de las soluciones del alginato y alginato/células se realizaron en un equipo PHIPPS & BIRD STIRRER Model 7790-400 de velocidad variable. Se fue adicionando el alginato poco a poco, procurando la dispersión e impidiendo la formación de gránulos grandes, con una velocidad de agitación de 600 r.p.m. Posteriormente, estas soluciones se dejaron reposar por 24 hrs para la eliminación de aire adquirido en la agitación.

Las soluciones de alginato de sodio al 1%, 2%, 3% y 4%, así como mezclas con diferente relación de alginato de sodio y células (*Saccharomyces cerevisiae* o *Pseudomonas fluorescens*); se extruyeron a través de una aguja (diámetro interno 1 mm) dentro de un cilindro concéntrico, por el cual se hizo pasar de manera axial un flujo de aire filtrado; la dispersión de la mezcla en pequeñas gotas se recibió en 2 litros de una solución de Cloruro de Calcio 0.1 M. Las esferas gelificadas se mantuvieron por espacio de una hora en la solución de CaCl_2 . El equipo utilizado se ilustra en la figura 15.

Se midió el tiempo de adición y la temperatura de las mezclas.

3.3.1 Efecto de la presión de aire

Para estudiar el efecto de la presión de aire, se prepararon 600 mL de una solución de alginato de sodio al 3%, la cual se alimentó a una velocidad de 1.1 mL/min, variando en cada lote la presión de alimentación de aire (3 kg/cm^2 , 2 kg/cm^2 , 1 kg/cm^2 y 0 kg/cm^2). El volumen de cada lote fue de 150 mL.

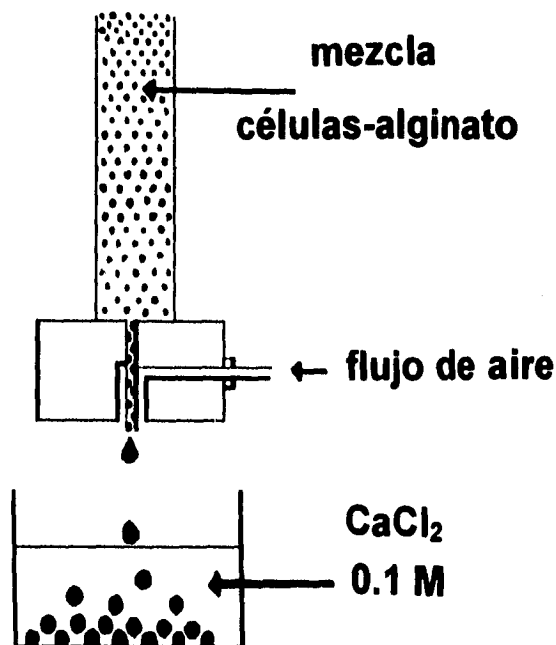


Figura 15 Equipo empleado para la elaboración de esferas de alginato de calcio

3.3.2 Efecto de la concentración de alginato

Para estudiar el efecto de la concentración de la solución de alginato, se preparó una solución de alginato al 4% y se hicieron diluciones (3%, 2% y 1%), las cuales se adicionaron a una velocidad 325 mL/min, y a una presión de aire de 3 kg/cm². Cada lote fue de 150 mL.

3.3.3 Efecto de la velocidad de alimentación

Se prepararon 600 mL de una solución de alginato de sodio al 3% y se alimentaron lotes de 150 mL a diferentes velocidades (1.1, 30, 150 y 325 mL/min), a una presión de aire de 3 kg/cm². Las velocidades fueron calibradas midiendo el tiempo para un volumen conocido de agua.

3.3.4 Efecto de la altura de adición del alginato

Se preparó una solución de alginato de sodio al 3% y se extruyó a una velocidad de alimentación de 325 mL/min, a una presión de aire de 3 kg/cm², variando la altura de adición (20, 40 y 80 cm), entre la punta de la aguja y el nivel de la solución de CaCl₂.

3.3.5 Efecto de la concentración de células

Se prepararon 700 mL de una solución de alginato de sodio al 3% y 300 mL de una solución de *Saccharomyces cerevisiae* al 40%, y se realizaron las siguientes mezclas:

Tabla 7 Relaciones de alginato/células en diferentes mezclas para la elaboración de esferas

Alginato de Sodio 3%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 40%	Concentración de alginato en la mezcla %	Concentración de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la mezcla %
50 %	50 %	1.5	20
60 %	40 %	1.8	16
70 %	30 %	2.1	12
80 %	20 %	2.4	8
90 %	10 %	2.7	4

Se alimentó cada lote de 200 mL a una velocidad de 325 mL/min

3.4 Determinaciones reológicas

3.4.1 Determinación reológica de las soluciones de alginato de sodio

Para la evaluación de la reología de las soluciones de alginato de sodio, se siguió el procedimiento anteriormente descrito (sección 3.1.3.7)

3.4.1.1 Soluciones de alginato sin esterilizar

Se preparó una solución de alginato de sodio al 4% y se realizaron diluciones del 3%, 2%, 1% y 0.5%. Para las tres primeras soluciones se tomó una muestra de 25 mL y se utilizó la aguja No. 4 para su caracterización. Las otras dos diluciones se caracterizaron con la aguja No. 1 y se tomaron muestras de 300 mL.

3.4.1.2 Soluciones de alginato esterilizadas

Se realizaron las mismas soluciones de alginato de sodio y se esterilizaron a 121°C por 15 minutos, y se tomaron las cantidades de muestra con la aguja respectiva para su evaluación reológica.

3.4.1.3 Soluciones de alginato con *Saccharomyces cerevisiae*

Se preparó una solución de alginato de sodio al 4% y una solución de levaduras al 40 % previamente desactivadas, ambas se mezclaron dando una relación de alginato/células (2/20, 2.4/16, 2.8/12, 3.2/8 y 3.6/4 g/g).

Desactivación de *Saccharomyces cerevisiae* (Wu, 1994)

REACTIVOS

1. Levadura en polvo para panificación (La Azteca)
2. Buffer de fosfatos pH = 7
3. Ácido clorhídrico al 3.8 %
4. Hidróxido de sodio al 50 %
5. Azida de sodio 40 p.p.m.
6. Agua destilada

Procedimiento:

1. Disolver 160 g de levadura en polvo en 400 mL de agua.
2. Centrifugar a 3,500 r.p.m. por 30 minutos.
3. Resuspender la levadura centrifugada en 400 mL de una solución de buffer de fosfatos.
4. Centrifugar a 3,500 r.p.m. por 30 minutos.
5. Decantar cuidadosamente el sobrenadante.
6. Resuspender las células en 400 mL de ácido clorhídrico y dejar actuar por 30 minutos.
7. Neutralizar con 15 mL de hidróxido de sodio.
8. Centrifugar nuevamente en las mismas condiciones.
9. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en agua para lavar.
10. Volver a centrifugar por media hora a 3,500 r.p.m.

Se tomó una muestra (0.2g peso húmedo) de las células desactivadas y se le determinó su humedad, secándola en estufa a 40°C hasta peso constante, con el fin de conocer la cantidad de agua con azida que se debe añadir para obtener la concentración del 40 %.

3.4.1.4 Soluciones de alginato con *Pseudomonas fluorescens*

De un crecimiento de células cultivado en el fermentador por 40 hrs., se tomaron cuatro muestras de 300 mL. A cada una se les agregó alginato de sodio en polvo dando una concentración del mismo de 4%, 3%, 2% y 1%.

3.4.2 Determinación reológica de los geles de alginato de calcio

Se elaboraron geles con un contenido de alginato del 4, 3, 2 y 1%, de la siguiente forma:

Se vació la solución del alginato en un tubo de poliuretano (diámetro interno 1 cm, longitud 5 cm), cubriendo cada uno de sus extremos con una membrana permeable, después se colocó el tubo con alginato dentro de 250 mL de una solución de CaCl_2 1M, en forma horizontal, dejándolo curar por aproximadamente 24 horas. Posteriormente los cilindros de gel formados, se cortaron en rodajas de 1 mm de espesor.

Las características reológicas de los geles de alginato se determinaron en un reómetro (Haake CV 20N), a 25 °C, utilizando un sistema de platos paralelos.

Procedimiento:

1. Prender el rotovisco RV20 y el rheocontroller RC20.
2. Colocar el sensor sin apretar demasiado.
3. Ajustar a cero.
4. Colocar la muestra en el platillo y bajar el sensor.
5. Checar que el sensor esté en cero, en caso contrario subir y bajar el sensor hasta que la lectura esté en cero o cercana a cero.
6. El botón de τ debe estar en la posición 1.0
7. Prender el CV20N.
8. Los rangos de lectura son de 1 a 100.
9. Una vez determinadas las lecturas, se apaga el CV20.
10. Se sube el sensor, se quita y limpia; así como el platillo donde se colocó la muestra.

3.5 Inmovilización de *Pseudomonas fluorescens* en alginato de calcio**3.5.1 Método de goteo**

La inmovilización de *Pseudomonas fluorescens* por este método, se realizó según sección 3.3 pero utilizando manualmente una jeringa. Las *Pseudomonas fluorescens* fueron separadas de un caldo de cultivo, centrifugándolas a 11,000 r.p.m. por 20 minutos, enjuagándolas con una solución tampón de fosfatos y centrifugándolas nuevamente. Se determinó la humedad de una pequeña muestra del centrifugado, secando a estufa a 40°C hasta peso constante, y se agregó la biomasa a una solución de alginato de sodio al 3%, resultando una relación de alginato/células de 2.54 g/18.77 g en la mezcla. Por otro lado, a 25 mL de medio crecido se le adicionó 0.75g de alginato de sodio en polvo dando lugar a una concentración de alginato al 3% en la mezcla, la cual se gelificó de la misma manera.

3.5.2 Método de adición continua

A 370 mL de un caldo de cultivo se les adicionó 11.1 g de alginato de sodio para obtener una concentración de alginato al 3 % en la mezcla y se inmovilizaron las células como se explicó en la sección 3.3. La velocidad de alimentación de la mezcla utilizada fue de 325 mL/min, la presión de aire de 3 kg/cm², y la altura de adición de 80 cm.

3.6 Caracterización del biocatalizador

3.6.1 Determinación de calcio consumido por el alginato de sodio

Con el fin de conocer los miligramos de calcio consumido por diferentes soluciones de alginato y mezclas de alginato/células, se utilizó la técnica de dureza de calcio, un método estándar para el análisis de agua y aguas residuales (APHA, AWWA, WPCF; 1989).

Se prepararon 250 mL de una solución de alginato al 3% y se hicieron diluciones del 2, 1, y 0.5%. 100 mL de cada solución se extruyeron manualmente en lotes de 20 mL (capacidad de la jeringa) y se gotearon en 500 mL de una solución 0.1M pura de CaCl_2 en cada caso, la cual se agitó a una velocidad de 100 r.p.m. Las soluciones de calcio después del curtido de las esferas por una hora se guardaron para después determinar la cantidad de calcio en ellas.

Se prepararon también 150 mL de una solución de alginato al 3% y una solución al 40% de *Saccharomyces cerevisiae*, se realizaron las mezclas mencionadas en la tabla 7 de la sección 3.3.5.

Nota: La solución de *S. cerevisiae* se preparó en el momento de ser utilizada para hacer la mezcla y extraerla con el fin de evitar la lisis de las células.

Se extruyeron 100 mL de cada mezcla en lotes de 20 mL, según capacidad de la aguja, goteándose en 500 mL de una solución 0.1M de CaCl_2 en cada caso, las soluciones de cloruro utilizadas se guardaron para determinar la cantidad de calcio que tuvieron después del curtido de las esferas por una hora, y conocer la cantidad de calcio consumido por ellas.

Preparación de la solución de Calcio estándar:

- 1) Pesar 1 g de carbonato de calcio anhidro.
- 2) Agregar HCl 1:1 hasta que se disuelva el carbonato.
- 3) Agregar 200 mL de agua destilada y hervir pocos minutos para dejar escapar el dióxido de carbono.
- 4) Enfriar y añadir gotas de indicador de rojo de metilo, y ajustar a color naranja añadiendo hidróxido de amonio 3 N como se requiera.
- 5) Transferir cuantitativamente y diluir a 1000 mL con agua destilada.
1 mL = 1 mg CaCO_3

Preparación de la Solución de EDTA 0.01 M.

- 1) Pesar 3.723 g de ácido etiléndiaminotetracético o su sal de sodio.
- 2) Diluir con agua destilada a 1000 mL.
- 3) Estandarizar contra una solución estándar de calcio.

Estandarización de la solución de EDTA

- 1) Tomar una alícuota que requiera menos de 15 mL de EDTA, en este caso se tomaron 2.5 mL de la solución estándar de calcio y se diluyeron a 25 mL con agua destilada.
- 2) Agregar 1 mL de solución buffer para un pH de 10 a 10.1
- 3) Añadir 0.2 g de negro de eriocromo T.
- 4) Titular con la solución de EDTA lentamente, agitando continuamente hasta que desaparezca el tono de rojo vino y vire a azul.
- 5) Tiempo de la titulación 5 minutos desde que se añada la solución buffer.

Cálculo de miligramos de carbonato de calcio equivalentes a un mililitro de EDTA.

Fórmula empleada:

$$\text{mg CaCO}_3/\text{L} = A \times B \times 1000 / \text{mL muestra}$$

A = 2.73 mL de EDTA

mL muestra = 2.5 mL

mg CaCO₃/L = 1000

$$B = (\text{mg CaCO}_3/\text{L} \times \text{mL muestra}) / (A \times 1000)$$

$$B = 0.9157 \text{ mg CaCO}_3 \text{ equivalen a 1 mL de EDTA}$$

Cálculo de la molaridad de la solución de EDTA.

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

M₁ = 0.01 mol de CaCO₃

M₂ = ?

V₁ = 2.5 mL de CaCO₃

V₂ = 2.73 mL de EDTA

$$M_2 = M_1 \times V_1 / V_2 = 0.01 \times 2.5 / 2.73 = 0.009157 \text{ mol EDTA}$$

Cálculo de los miligramos de calcio contenidos en cada solución problema.

Fórmula empleada:

$$\text{mg Ca/L} = \text{mL EDTA} \times \text{mg CaCO}_3 / \text{mL EDTA} \times 400.8 / \text{mL muestra}$$

3.6.2 Distribución de tamaño de partícula.

Se utilizó un equipo Ro-Tap (Modelo B), y se cribaron las esferas por lotes de 20 a 30 gramos aproximadamente para impedir su aglomeración, adicionándoles solución 0.1M de CaCl_2 para evitar su deshidratación y facilitar la operación. Las mallas utilizadas fueron 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 30, 35 y 40 con apertura de 3.35, 2.38, 1.68, 1.41, 1.13, 0.96, 0.80, 0.59, 0.50 y 0.42 mm respectivamente; se utilizaron según el caso.

- 1) Las esferas obtenidas con presión variable se cribaron por un espacio de 10 minutos.
- 2) Las esferas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato se cribaron por espacio de 20 minutos.
- 3) Las esferas obtenidas con mezclas de alginato/células se cribaron por espacio de 20 minutos.

3.6.3 Determinación del tamaño de partícula promedio

Además de utilizar el método de cribado, se tomaron 30 esferas como muestra representativa en cada caso y se midieron sus diámetros con vernier, determinándose el promedio y la desviación estándar.

3.6.4 Determinación de la esfericidad

Se midieron los radios mayor y menor de una muestra representativa de 30 esferas, obtenidas variando la altura de adición del alginato, utilizando un calibrador vernier y se calcularon las relaciones radio mayor / radio menor.

3.6.5 Determinación de la densidad aparente

La densidad aparente del catalizador se determinó empacando un vaso de precipitados de 100 mL con un peso conocido de esferas hasta un volumen de 80 mL. Las esferas se colocaron en papel secante antes de pesarlas e introducir las al vaso. Posteriormente se calculó la densidad aparente con la fórmula conocida:

$$\rho = m/V$$

3.6.6 Determinación de la densidad real

La densidad real del catalizador se determinó midiendo el volumen desplazado por un determinado peso húmedo de catalizador en una probeta con 15 mL de CaCl_2 0.1 M. Las esferas se colocaron previamente en papel secante también.

3.6.7 Determinación de la humedad

La humedad se determinó utilizando una termobalanza (Ohaus). Las determinaciones en la termobalanza se realizaron a una potencia de 1 watt. El tiempo de secado fue de aproximadamente una hora, ya que la velocidad de secado debe ser lenta para evitar la formación de una capa dura en la superficie de las esferas, la cual puede dificultar la transferencia de masa. Se evaluaron las curvas de secado para esferas de un tamaño de partícula 1.13 mm, con diferentes concentraciones de alginato 4%, 3%, 2% y 1%; para esferas con una concentración de alginato al 3% de tamaños 1.13 mm, 1.41 mm, 2.38 mm y 3.35 mm; y para esferas con células/alginato (4%, 3%, 2% y 1%).

3.6.8 Determinación de la fracción vacía

Para su medición se tomó un volumen conocido de esferas y se secaron hasta alcanzar la humedad crítica. Posteriormente se vaciaron en 20 mL de una solución de CaCl_2 0.1 M. Se permitió que las esferas recuperaran el volumen original y se midió el volumen desplazado, el cual corresponde al volumen que ocupa la matriz del catalizador. El volumen total menos el volumen desplazado es el volumen vacío.

La fracción vacía (ϵ) es la relación del volumen intrapartícula (vacío) e interpartícula, entre el volumen total que ocupa el catalizador y representa la fracción de volumen disponible para la reacción. Se determinó la fracción vacía para las esferas con diferente tamaño de partícula, diferente concentración de alginato, y diferente relación alginato/células.

3.6.9 Determinación de la capacidad de atrapamiento celular

Para determinar la capacidad de atrapamiento celular se tomó una esfera, la cual se colocó en papel secante, se pesó, maceró y disolvió en 10 mL de agua destilada que contenían 2 g/L de EDTA y 20 g/L de NaCl (Boross *et al.*, 1990).

Se realizaron diluciones a diferentes niveles (1×10^{-4} hasta 1×10^{-20}), y tres diluciones fueron sembradas en cajas de YPG-agar para cuenta total a las 24 hrs.

3.6.10 Determinación de la concentración de alginato en la esfera (Método de H₂SO₄ - Resorcinol) (Graham, 1971; Kenedy *et al.*, 1982)

REACTIVOS

1. Ácido sulfúrico concentrado
2. Solución de Resorcinol al 4 %

CURVA DE CALIBRACIÓN

- 1) Preparar soluciones de alginato de sodio desde 50 ppm hasta 250 ppm.
- 2) Tomar un mililitro de cada solución, agregar 1 mL de la solución de resorcinol y mezclar.
La solución de resorcinol debe prepararse cada vez que sea utilizada.
- 3) Agregar 6 mL de ácido sulfúrico concentrado rápidamente.
- 4) Colocar en baño de hielo por 25 minutos.
- 5) Determinar la absorbancia a 494 nm contra el blanco.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se realizan en la misma forma que la curva de calibración a partir del paso 2. La ecuación de la curva de calibración obtenida es la siguiente:

$$Y = 0.0853 + 0.0045 \cdot X \quad \text{con un factor de correlación } r=0.993$$

Donde:

- X : es la concentración de alginato
Y : Densidad Óptica a 494 nm

3.6.11 Determinación de proteínas totales

Para la evaluación de proteínas totales se siguió la técnica de la Prueba de Bradford. (Becker, *et al.*, 1990).

REACTIVOS

1. Tintura de Bradford.
2. Solución madre de proteínas

Preparación de la solución madre de proteínas:

1. Desarrollar 100 mL de caldo de cultivo de *P. fluorescens* por 24 horas a 35 °C
2. Centrifugar el caldo de cultivo.
3. Tomar un peso determinado de muestra de las células centrifugadas y determinar su humedad y peso seco
4. Calcular la cantidad de biomasa en base de peso seco por litro de cultivo
5. Aforar el resto de las células centrifugadas en 100 mL de una solución salina
6. Preparar disoluciones de las células centrifugadas con 0.2, 0.4 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL
7. Calentar cada disolución a ebullición por 15 minutos
8. Meter inmediatamente en baño de hielo por 5 minutos para provocar la implosión de las células

CURVA DE CALIBRACIÓN

- 1) Tomar soluciones de proteína con 0.2, 0.4 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL
- 2) Diluir 1 volumen de la tinta Bradford con 4 volúmenes de agua destilada.
- 3) Añadir 2.5 mL de la tinta diluida.
- 4) Añadir 50 μ L de la solución conocida a los tubos y mezclar inmediatamente.
- 5) Medir la absorbancia a 595 nm contra el blanco.

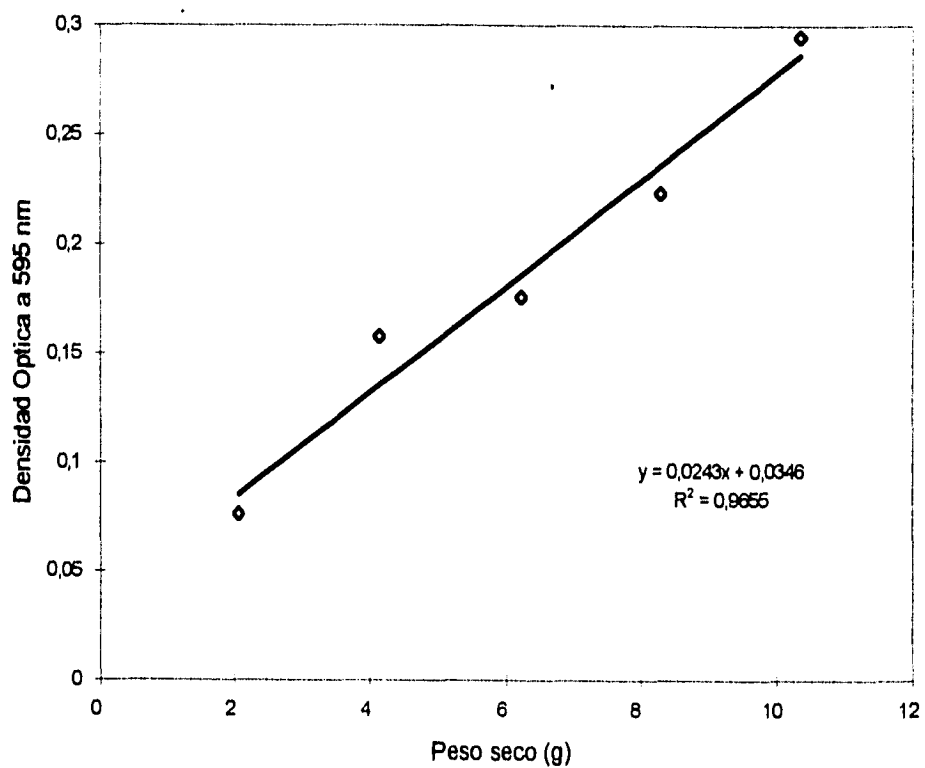
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

De la esfera disuelta en 10 mL de la solución NaCl/EDTA, se tomó un mililitro de muestra, el cual se colocó en baño María por quince minutos en ebullición, y se transfirió a un baño de hielo, para provocar la implosión de las células, liberando las proteínas.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Realizar los mismos pasos para la curva de calibración a partir del paso 2.

Figura 16 D.O. a 595 nm versus peso seco de proteínas



3.6.12 Adsorción de fenol y clorofenoles

Se colocaron diferentes cantidades (2, 4, 6, 8 y 10 g) de esferas de alginato de calcio con un diámetro de 2 mm, elaboradas con una solución de alginato al 3% en vasos de precipitado de 1 L con 500 mL de la solución del tóxico; junto con un blanco. Se diluyeron los tóxicos en medio mínimo Dapaah. Se empleó un equipo de agitación de velocidad variable (Phipps & Bird Stirred Modelo 779-400), el cual se operó a 300 r.p.m.

Las esferas se mantuvieron en contacto con soluciones de 1 g/L de fenol ó 100 mg/L de 2-clorofenol, 2,4 - diclorofenol y 2,4,6 - triclorofenol, por tiempos suficientemente grandes para alcanzar el equilibrio.

Se tomaron muestras de cada vaso en diferentes tiempos para determinar las concentraciones del tóxico en la solución mediante la técnica colorimétrica de la 4-aminoantipirina, la cual se explica en la siguiente sección. Se midieron las adsorciones máximas de las esferas y se ajustaron los datos experimentales a las isotermas de adsorción del modelo de Freundlich.

3.7 Biodegradación de fenol y clorofenoles por el biocatalizador

Se empacó una columna de vidrio con capacidad de 29.1 mL con el biocatalizador, y se hizo recircular mediante una bomba peristáltica, con flujo ascendente; 100 mL de medio mínimo Dapaah diluido 1:10 (Dapaah y Hill, 1992) con soluciones de clorofenoles con concentraciones conocidas, detectándose la desaparición del mismo cada 24 hrs. La columna se operó a temperatura ambiente (no controlada). En la figura 17 se muestra el sistema para biodegradación de clorofenoles en agua.

Para la determinación de la desaparición del tóxico, se llevó acabo la técnica de la 4-aminoantipirina (APHA, AWWA, WPCF, 1989).

REACTIVOS

1. Hidróxido de amonio 0.5 N
2. Buffer de fosfatos pH = 6.8
3. Solución de 4 - aminoantipirina al 2 %
4. Solución de ferricianuro de potasio al 8 %

CURVA DE CALIBRACIÓN

1. Preparar soluciones de fenol con concentraciones conocidas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L)
2. Tomar 1 μL de muestra y hacer una dilución 1:10
3. Agregar 250 μL de hidróxido de amonio
4. Agregar 150 μL de tampón de fosfatos
5. Agregar 100 μL de 4-aminoantipirina y mezclar
6. Agregar 100 μL de ferricianuro de potasio y mezclar bien
7. Permitir el desarrollo de color durante 15 minutos
8. Leer absorbancia a 500 nm contra el blanco

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Realizar el procedimiento de la curva de calibración a partir del paso 2. Calcular la concentración del tóxico en la muestra, por medio de la ecuación de la curva de calibración.

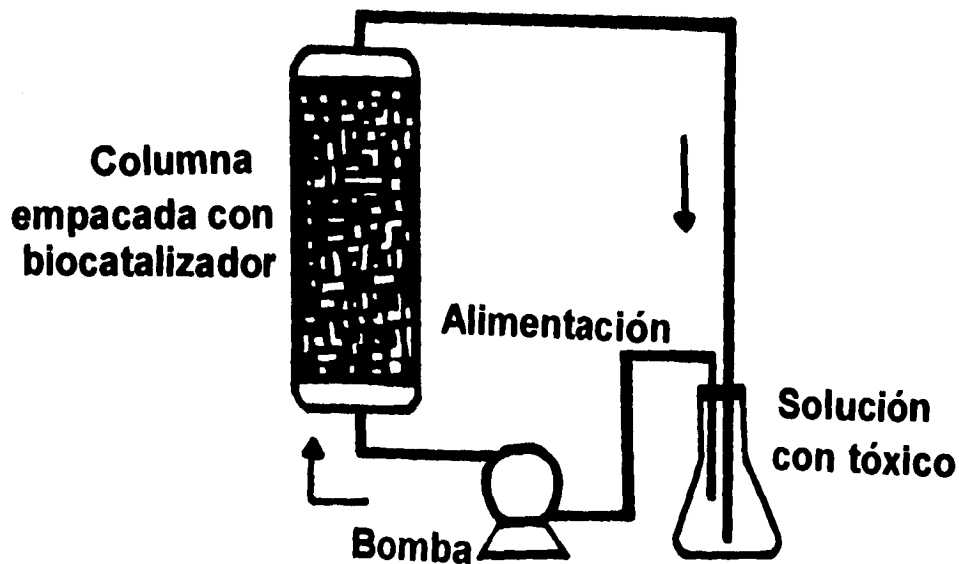


Figura 17 Equipo para la biodegradación de fenol y clorofenoles en agua

3.7.1 Biodegradación de fenol

Se prepararon 100 mL con medio mínimo diluido 1:10, (Dapaah y Hill, 1992) y se agregó una concentración de 1000 mg/L del fenol.

3.7.2 Biodegradación de 2-clorofenol

Se prepararon 100 mL con medio mínimo diluido 1:10, (Dapaah y Hill, 1992) y se agregó una concentración de 500 mg/L del clorofenol.

3.7.3 Biodegradación de 2,4 - diclorofenol

Se prepararon 100 mL con medio mínimo diluido 1:10, (Dapaah y Hill, 1992) y se agregó una concentración de 700 mg/L. Otra solución se preparó con 350 mg/L del diclorofenol.

3.7.4 Biodegradación de 2,4,6 - triclorofenol

Se prepararon 100 mL de medio mínimo diluido 1:10, (Dapaah y Hill, 1992) y se agregó una concentración de 100 mg/L del triclorofenol.

4. Resultados y discusión

4.1 Cultivo de *Pseudomonas fluorescens*

4.1.1 Cultivo a nivel matraz en medio YPG

El crecimiento de *P. fluorescens* en 250 mL de medio YPG realizado a 35°C durante 24 horas presentó valores iniciales de pH, densidad óptica y conductividad en el medio de 2.06, 0.042 y 7,270 μ Siemens respectivamente; y los valores finales fueron 7.56, 0.125 y 6,540 μ Siemens. El mayor crecimiento celular se obtuvo cerca de las 23 horas con una D.O. total de 0.348, esto se puede observar en la figura 18 (cinética 1).

Para investigar la cantidad de polímero que la cepa produce durante su crecimiento, se realizó una segunda cinética bajo las mismas condiciones por más de 24 horas (figura 18, cinética 2); se alcanzó la mayor densidad óptica en la hora 25 con un valor de 0.626, a partir de este punto disminuyó a las 48 horas a un valor de 0.501 y a las 101 horas llegó a un valor de 0.165, en este último punto se suspendió el crecimiento. Se realizó la prueba de alcohol isopropílico y cloruro de potasio obteniéndose 13.08 g/L de sustancias precipitables. En el anexo A se presentan los valores de ambas cinéticas de crecimiento. En la misma figura se observa que ambas cinéticas son diferentes, se alcanzaron valores mayores de D.O. en la segunda cinética, esto se debe a que ambos crecimientos se llevaron a cabo en Parrillas con agitador magnético y no se tuvo un control exacto de las velocidades de agitación; porque durante el inicio del proyecto no se contaba con un agitador de velocidad controlada.

Es indeseable la producción de polímero para obtener la mejor producción de células para su inmovilización, por lo que poco antes de las 24 horas resulta el mejor crecimiento celular. Como ya se vio en la sección de metodología, se encontró que la relación entre la densidad óptica y el peso seco para el medio crecido está determinada por la ecuación:

$$Y = 0.1929X + 0.0915 \quad \text{con un factor de correlación } r=0.92$$

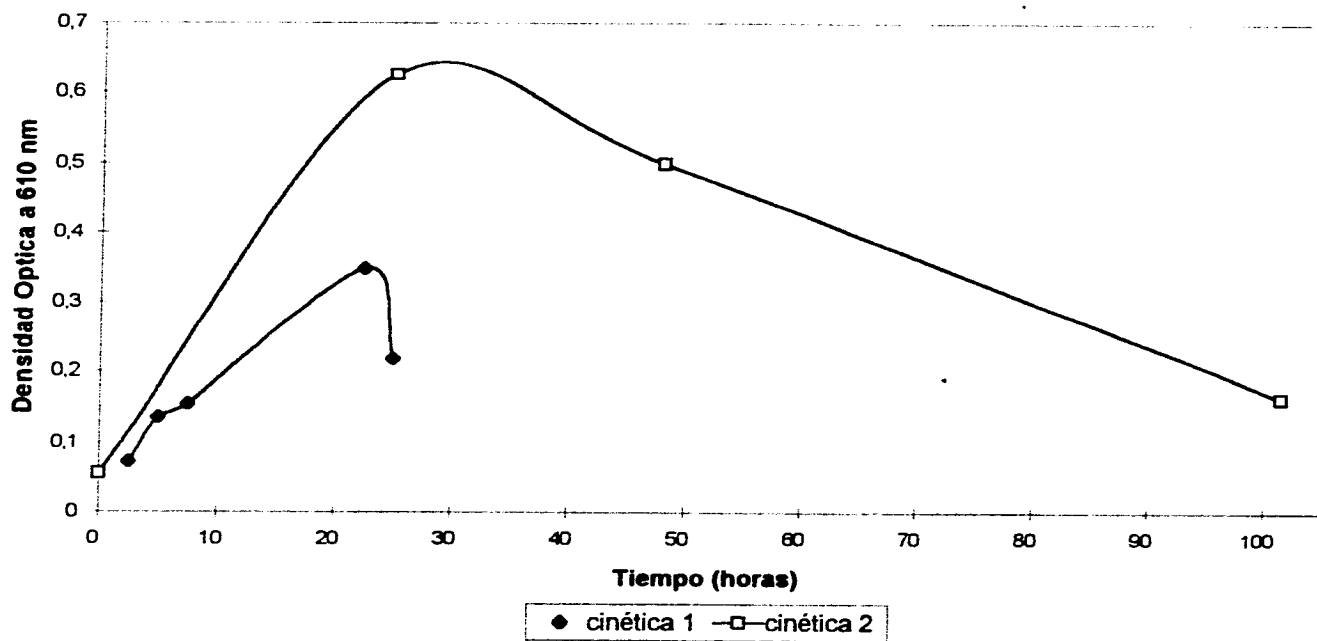
donde:

X = es el valor de peso seco de las células en (g/L)

Y = es el valor de la densidad óptica de una dilución 1:10 a 610 nm

Esta relación permite conocer la cantidad de biomasa en g/L que se podrá inmovilizar en alginato de calcio. El cultivo en matraz se realizó para conocer la cinética de crecimiento de *P. fluorescens* y determinar el punto de mayor crecimiento celular, para su posterior inmovilización en alginato de calcio.

Figura 18 Cinéticas de crecimiento, 50 mL Medio YPG, T = 35°C



4.1.2 Crecimiento a nivel matraz en distintos medios

Al realizar los crecimientos en medio YPG concentrado, diluido y adicionado con hierro o con cobre; los valores de las densidades ópticas iniciales en todos los casos fueron similares, entre (0.005 y 0.007); al permitir el crecimiento por 24 horas, el mayor crecimiento celular lo presentó el medio que contenía cobre D.O. de 0.657, seguido por el crecimiento en medio YPG-solo (D.O. de 0.522), mientras que el YPG con hierro alcanzó una D.O. de 0.425 y por último, el menor valor observado fue para el medio YPG diluido 1:10 (D.O. de 0.127), (ver figura 19). Sin embargo a las 48 horas la densidad óptica aumentó en el medio YPG con hierro a un valor de 0.7, en los demás medios disminuyó. El YPG adicionado con cobre presentó una densidad óptica de 0.356, el medio YPG-solo presentó un valor de 0.428 y por último el valor de D.O. del medio YPG diluido fue de 0.081. La mejor producción de células se obtuvo en el medio YPG (adicionado con cobre) a las 24 horas. Esto se puede observar en la figura 19. En el anexo A se presentan los valores obtenidos de las cinéticas de crecimiento.

Adicionalmente se apreció un cambio en la coloración de los medios: durante las primeras 8 horas el YPG-solo y el YPG con cobre tuvieron una coloración marrón. El YPG con hierro presentó un color marrón ligeramente más oscuro que los otros medios, y el medio diluido 1:10 se tornó blanco. A las 24 horas el YPG sólo mantuvo su coloración marrón, el medio adicionado con cobre cambió a una coloración ligeramente verde, el medio con hierro cambió a un marrón oscuro y el YPG diluido presentó una coloración verde claro. A las 48 horas, el medio YPG-solo comenzó a presentar una coloración ligeramente verde, el medio con cobre se observó verde, el medio con hierro cambió a café oscuro y el medio diluido presentó una coloración verde claro.

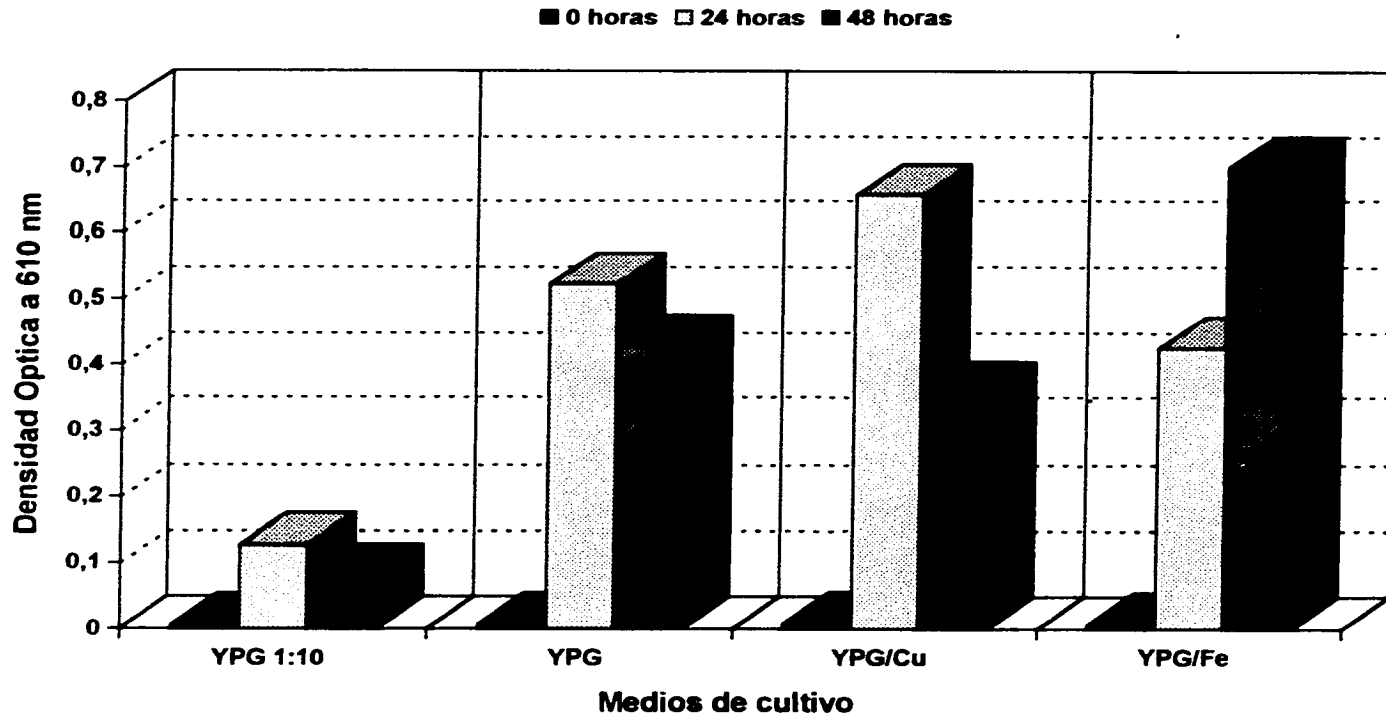
La presencia de color verde indica la producción de sideróforo que es un pigmento verde fluorescente característico de *P. fluorescens* (Schlegel, 1993); el cual fue notorio en los medios YPG-solo y el adicionado con cobre hasta las 48 horas. El YPG adicionado con hierro desde las primeras 8 horas presentó el color marrón oscuro. En el caso del YPG diluido presentó la coloración verde a las 24 horas, esto debido al agotamiento de nutrientes en el medio. A las 48 horas todos presentaron la producción de sideróforo; debido a que éste es indeseable, el crecimiento celular con el mejor estado fisiológico de las células debe realizarse poco antes de las 24 horas.

Resulta interesante encontrar que la aparición del sideróforo sugiere el agotamiento de nutrientes en el medio de cultivo, como se muestra en el medio YPG diluido 1:10. Los iones Cu^{2+} y Fe^{2+} inducen su aparición. Estos experimentos se realizaron con la finalidad de obtener una producción masiva de células.

Se realizó una apreciación relativa de la viscosidad a las 24 horas en todos los medios, agitando leve y circularmente cada matraz. En este caso, el medio con cobre adicionado presentó un aspecto más viscoso, siguió el medio YPG con hierro. El medio diluido se observó ligeramente viscoso y el medio YPG-solo se observó menos viscoso que todos.

Sin embargo, al realizar las mediciones de las viscosidades con el Brookfield a las 48 horas, se obtuvieron otros resultados.

Figura 19 Caracterización cinética de los crecimientos *P. fluorescens* en distintos medios T=35°C



Es importante la evaluación de la viscosidad en el crecimiento de las células, ya que la familia de *Pseudomonas* puede producir un polímero extracelular, que podría ser alginato o levana de acuerdo con el reporte de Smidsrod y Skjak-Braek, (1990) y Schlegel, (1993). Para poder evaluar la producción de este polímero, se midieron las viscosidades de los medios a las 48 horas de crecimiento a 60 r.p.m. El mayor valor de viscosidad lo obtuvo el medio con hierro con un valor de 0.137 mPa·s, en orden decreciente, siguió el medio YPG-solo (con 0.0907 mPa·s), y los menores valores se presentaron en el medio adicionado con cobre (0.0332 mPa·s) y el YPG diluido (0.0325 mPa·s) con un valor muy semejante al anterior.

El mayor contenido de polímero precipitado se encontró en el medio con hierro, (1.72 g/L), El medio YPG-solo tuvo un contenido de 1.32 g/L y el medio con cobre desarrolló el menor contenido de polímero (1.00 g/L). Kidambi *et al.* (1995) reportan la síntesis de alginato por *Pseudomonas syringae* *pv.* *syringae*, utilizando Cu^{2+} como activador del exopolisacárido. Estos resultados muestran que *P. fluorescens* produjo un polímero extracelular bajo diferentes condiciones de operación.

Se realizó la prueba de ácido sulfúrico-resorcinol a una muestra de los medios crecidos a las 24 horas, de la cual se obtuvieron valores de sólidos precipitables de 10.6 mg/L para el medio adicionado con hierro, 7.42 mg/L para el medio de YPG-solo y 4.27 mg/L para el medio adicionado con cobre. Estos resultados sugieren que el Fe^{2+} induce a una mayor síntesis de polímero que el Cu^{2+} y más tempranamente.

Lo expuesto anteriormente se presenta de manera sintética en la siguiente tabla:

Tabla 8 Características de los diferentes medios de crecimiento

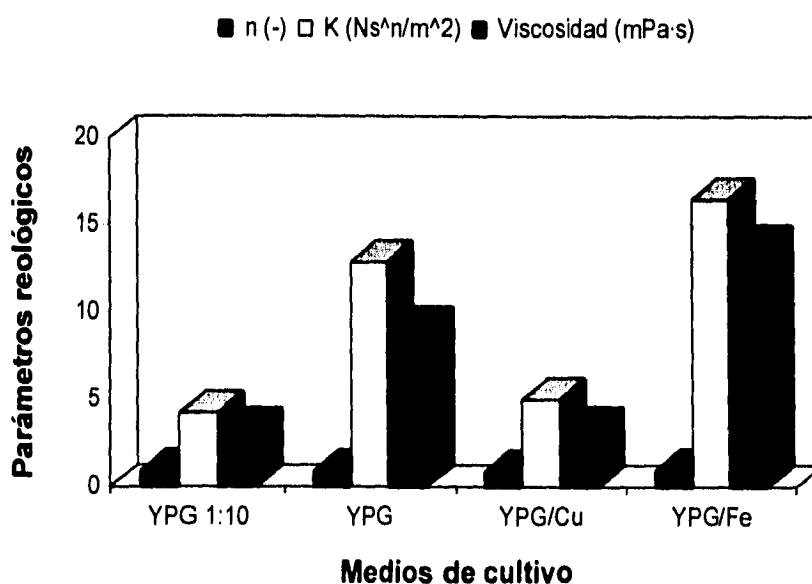
MEDIO YPG	COLORACIÓN			VISCOSIDAD		POLIMERO	SOLIDOS
				RELATIVA	$\times 10^{-2}$ (mPa·s)	(g/L)	PRECIPITABLES (mg/L)
Tiempo de crecimiento (horas)	8	24	48	24	48	48	48
Solo	marrón	marrón	ligeramente verde	-	9.07	1.32	7.42
con Cobre	marrón	ligeramente verde	verde	++	3.32	1.00	4.27
con Hierro	marrón ligeramente oscuro	marrón oscuro	café oscuro	+	13.7	1.72	10.60
Diluido 1:10	blanco	verde claro	verde claro	±	3.25	n.d.	n.d.

NOTA: ++ muy viscoso, + viscoso, ± ligeramente viscoso, - no viscoso, n.d. no determinado

Al realizar la caracterización reológica de los crecimientos, se observa en la figura 20, que los valores de n (índice de flujo) son cercanos a uno en todos los casos, lo cual indica un comportamiento muy cercano al Newtoniano; los valores de K (índice de consistencia) fueron como sigue: el mayor valor lo presentó el medio YPG con hierro ($1.64 \times 10^{-2} \text{ N s}^n/\text{m}^2$), seguido por el medio YPG-solo (1.28×10^{-2}), finalmente se obtuvieron valores menores para el medio adicionado con cobre (5×10^{-5}) y el medio diluido (4.22×10^{-3}), con las mismas unidades. Valores mayores de K indican mayor viscosidad en el fluido. En el anexo B se presenta la caracterización reológica de cada uno de los medios de crecimiento.

El tipo de polímero que se produjo no es posible precisarlo, pero se puede observar el efecto que produce sobre la viscosidad del medio. La producción de polímero es indeseable porque causa problemas con la transferencia de masa y de *momentum* en la producción, y desvía la actividad metabólica hacia un producto indeseado. Se aconseja emplear YPG adicionado con cobre, ya que produce la menor viscosidad con una concentración celular mayor.

Figura 20 Caracterización reológica de los crecimientos, *P. fluorescens* en distintos medios



4.1.3 Cultivo masivo a nivel fermentador de 3.5 L

Los resultados de la cinética de crecimiento en fermentador a temperatura controlada (30°C) y una velocidad de agitación de 600 r.p.m., se presentan en la figura 21. La densidad óptica graficada es la que corresponde a la biomasa, (la diferencia de la densidad óptica total y la densidad óptica del sobrenadante) La fermentación se llevó a cabo por más de 24 horas y no se sabía si se presentaría producción de polímero o no. Al determinar la D. O. antes y después de la centrifugación se elimina esta interferencia.

A las 24 horas se alcanzó un valor de 0.152, a las 28 horas decayó a 0.137, y después de la hora 28 siguió aumentando hasta un valor de 0.171 cuando se detuvo la fermentación, cerca de las 50 horas de crecimiento. No se observó coloración verdosa que aparece normalmente en el crecimiento a nivel matraz después de las 24 horas.

La cuenta total en placa realizada reveló 3.7×10^{11} UFC/mL inicialmente, a las 24 horas ya se contaban 7.6×10^{24} UFC/mL y finalmente a las 48 horas se obtuvo un valor de 1.48×10^{30} UFC/mL.

El pH de la fermentación inicialmente tuvo un valor de 7.91, y se mantuvo cercano a 8 hasta las 24 horas; a partir de este momento comenzó a incrementarse hasta un valor de 9.44 a las 52 horas.

La conductividad eléctrica inició con un valor de 4,190 μ S, aumentó a 4,960 μ S durante las primeras cinco horas y permaneció cercano a 5,000 μ S hasta las 12 horas. Luego comenzó a aumentar hasta un valor final de 8,040 μ S.

Las pruebas de polímero precipitado con alcohol isopropílico y cloruro de potasio resultaron negativas.

Se realizó una segunda fermentación (ver figura 22), pero esta vez se llevó a cabo a temperatura ambiente no controlada y con una velocidad de agitación mayor, 700 r.p.m.. Se obtuvo una densidad óptica final de 0.669 a las 20 horas; tres veces mayor a la obtenida en la fermentación anterior (0.223). Los valores de la conductividad fueron aumentando desde 2,930 μ S hasta un valor de 5,380 μ S, y el pH se mantuvo casi en 7 durante todo el crecimiento desde el inicio. Las pruebas de polímero con alcohol isopropílico y cloruro de potasio también resultaron negativas.

Al comparar ambas fermentaciones, resulta evidente que la cantidad de oxígeno introducida durante la agitación favorece un mayor crecimiento celular, pues en la segunda fermentación al trabajar con una velocidad de agitación mayor, en menos de 24 horas se obtuvo una densidad óptica más alta que en la fermentación con una velocidad de agitación menor. Esto permite conocer una de las mejores condiciones de operación para la producción masiva de células. Los valores obtenidos en ambas fermentaciones se presentan en el anexo A.

Figura 21 Cinética de la fermentación 3.5 L Medio YPG, Temperatura ambiente

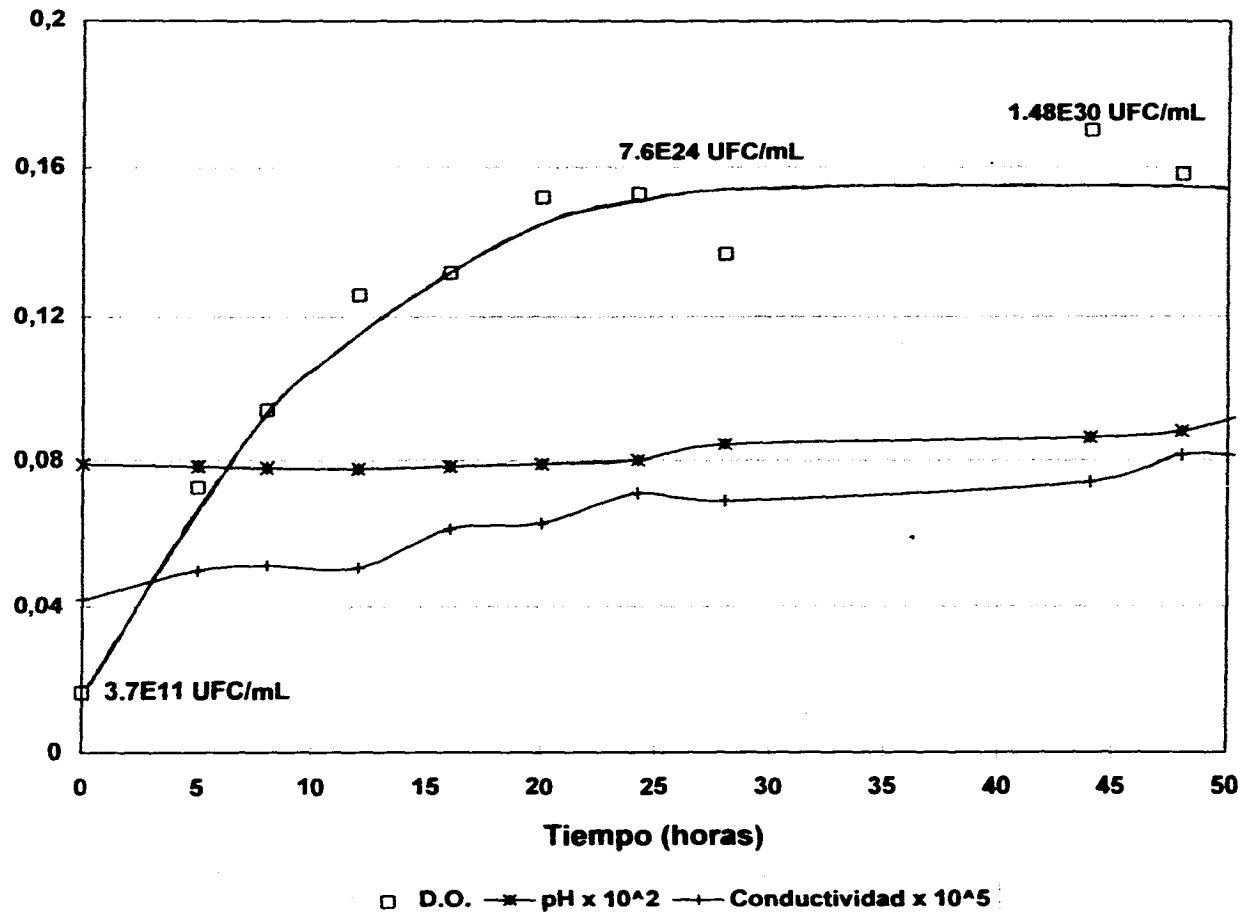
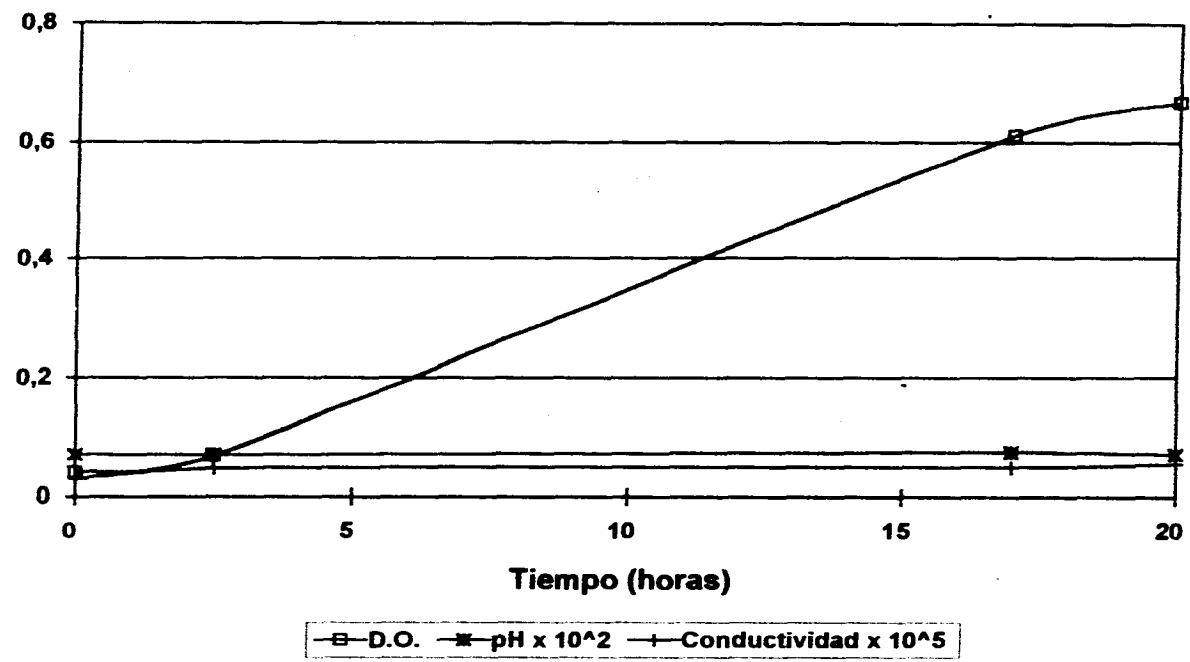


Figura 22 Cinética de la fermentación 3.5 L Medio YPG, Temperatura ambiente no controlada



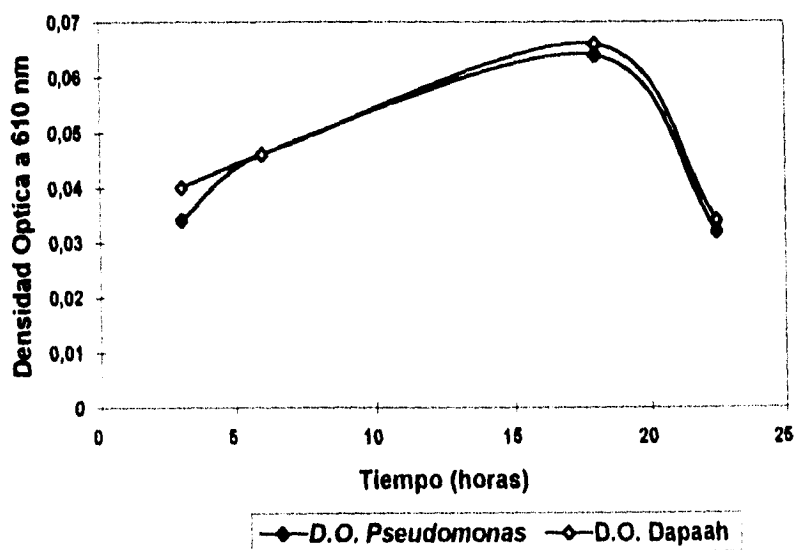
4.1.4 Crecimiento en medios mínimos

El medio mínimo contiene los requerimientos indispensables para conservar la cepa entre los que se encuentran sales de fosfato. También puede ser utilizado como medio que contenga el compuesto tóxico a biodegradar. Debido a la problemática que presenta el alginato de calcio a desestabilizarse en presencia fosfatos, y con la posibilidad de emplear un medio mínimo que presente menor contenido de éstos, se decidió realizar el crecimiento en dos medios mínimos (medio para *Pseudomonas* y medio Dapaah descritos en materiales y métodos), para conocer el efecto de éstos sobre la cepa empleada.

Los crecimientos en medios mínimos para *Pseudomonas* y Dapaah se realizaron a 35°C por 24 horas. En la figura 23 se muestra que los valores de las densidades ópticas iniciales fueron muy similares, 0.034 para el medio *Pseudomonas* y 0.040 para el medio Dapaah. Durante las siguientes horas las densidades ópticas también fueron similares, aunque los valores del medio Dapaah fueron ligeramente mayores a los del medio para *Pseudomonas*.

Estos resultados muestran que es conveniente utilizar el medio mínimo con menor contenido de fosfatos, ya que su efecto en el crecimiento de la cepa es similar al medio con menor contenido de éstos. Además, al utilizar el medio Dapaah se obtiene un ahorro en reactivos, ya que cinco de ellos de este medio coinciden con los que se utilizan en el medio para *Pseudomonas*, pero en menor cantidad.

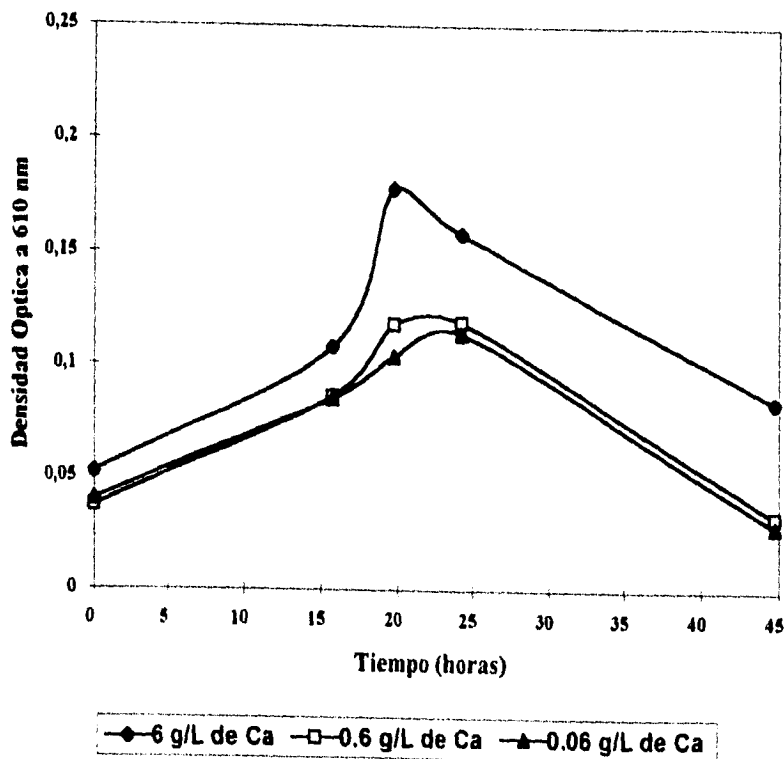
Figura 23 Cinéticas de crecimiento en medios mínimos a 35°C



También se vio la posibilidad de adicionar calcio al medio mínimo Dapaah para mantener la estabilidad del alginato de calcio, cuando se utilizara en la biodegradación de los tóxicos; por lo que se averiguó el efecto que pudiese tener en el crecimiento de la cepa. Para estudiar el efecto de la concentración de calcio del medio mínimo Dapaah en el crecimiento de *P. fluorescens* se prepararon 3 matraces de 250 mL, con 45 mL de medio inoculado. Cada matraz contenía 6 g/L, 0.6 g/L y 0.06 g/L de CaCl_2 , y se dejaron crecer por 45 horas. Los valores de las densidades ópticas iniciales fueron de, 0.052, 0.037 y 0.040 respectivamente. En la figura 24 se muestra que el mayor crecimiento lo alcanzó el matraz con mayor contenido de calcio. Su densidad óptica fue de 0.178 a las 20 horas. Los matraces con menor contenido de calcio alcanzaron sus valores máximos de densidad óptica a las 24 horas, mientras que el matraz con un 10% de calcio con respecto al primero, tuvo una densidad óptica de 0.119, y la densidad óptica del matraz con menor contenido de calcio tuvo un valor de 0.114. A las 45 horas decayeron los crecimientos de los tres matraces.

En el anexo A se presentan los valores obtenidos del crecimiento en medios mínimos y los valores que se obtuvieron del efecto de la concentración de calcio del medio mínimo Dapaah en el crecimiento.

Figura 24 Efecto de la concentración de calcio del medio mínimo Dapaah en el crecimiento a 35 °C



4.1.5 Separación de las células

Se tomaron diez muestras de un medio YPG previamente crecido a 35°C por 24 horas, de las cuales cinco se diluyeron 1:10. Todas se centrifugaron a diferentes velocidades como se describió en la sección 3.1.6. La densidad óptica antes de la centrifugación para las muestras centrifugadas sin diluir fue de 0.296 a una dilución 1:10, y la densidad óptica antes de la centrifugación para las muestras diluidas fue de 0.148 a una dilución 1:10. Las densidades ópticas de los sobrenadantes se leyeron a una dilución 1:10. Se determinaron las densidades ópticas de la biomasa mediante la diferencia de las densidades ópticas antes de la centrifugación y las densidades ópticas de los sobrenadantes. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 9 Separación de células a diferentes velocidades de centrifugación

VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN (r.p.m.)	Muestras sin diluir		Muestras diluidas	
	D.O. sobrenadante	D.O. biomasa	D.O. sobrenadante	D.O. biomasa
14,000	0.031	0.265	0.006	0.142
10,000	0.023	0.273	0.014	0.134
8,000	0.028	0.268	0.026	0.122
4,000	0.157	0.139	0.012	0.136

La velocidades de centrifugación de 8,000, 10,000 y 14,000 r.p.m., resultaron ser la más adecuadas para lograr una mayor separación de las células de las muestras no diluidas obteniéndose densidades ópticas de la biomasa de 0.268, 0.273 y 0.265. En el caso de las muestras diluidas, las mejores separaciones se realizaron a velocidades de 10,000 y 14,000 r.p.m. obteniéndose densidades ópticas de la biomasa de 0.134 y 0.142. Una velocidad de 8,000 r.p.m. es suficiente para lograr una buena separación de biomasa.

4.2 Proceso de elaboración del biocatalizador

El tamaño de partícula del biocatalizador empleado en columnas empacadas, envuelve un doble compromiso entre la actividad específica (que se logra con partículas pequeñas) y la resistencia mecánica (favorecida en partículas grandes). Las limitaciones difusionales internas representan con frecuencia un problema importante en los catalizadores de células inmovilizadas por atrapamiento en gel. La velocidad de reacción está afectada por la velocidad de difusión del sustrato desde la superficie del biocatalizador hasta el sitio donde se encuentra la enzima en el interior de la partícula. Los efectos difusionales internos se pueden minimizar al disminuir el tamaño de partícula o disminuir la carga celular. El tamaño

de partícula elegido está dentro del rango de diámetros recomendado por Martinsen (1987). Quirasco (1994) reporta un diámetro de 2 mm adecuado para evitar problemas difusionales en la columna. El tamaño de partícula que se decidió elaborar fue de 1.13 mm.

4.2.1 Efecto de la presión de aire

El efecto de la presión de aire se estudió a una concentración de alginato del 3%. El tiempo de adición de la solución en todos los casos fue de 80 minutos, trabajando a una velocidad de alimentación de 1.1 mL/min.

Al realizar la granulometría en malla de las esferas elaboradas con diferentes presiones de aire (las cuales se presentan en el anexo C); las distribuciones de tamaños de partícula no fueron extensas.

Los valores de los tamaños de partícula obtenidos mediante cribado que tuvieron la frecuencia máxima de retención en malla se muestran en la tabla 10. Se graficaron los tamaños de partícula obtenidos mediante cribado y con vernier contra las presiones de aire utilizadas (figura 25). El tamaño de las esferas resultó ser una función directa de las presiones empleadas. Para obtener un tamaño de partícula de entre 1.13 y 1.41 mm se requiere de una presión de aire de 3 kg/cm².

Tabla 10 Tamaños de partícula obtenidos a diferentes presiones de aire

Presión de aire (kg/cm ²)	Diámetro ^a (mm)	Diámetro ^b (mm)
0	3.35	3.00 ± 0.12
1	2.38	2.22 ± 0.19
2	1.41	1.73 ± 0.14
3	1.13	1.27 ± 0.12

Nota: a = más frecuente en el cribado

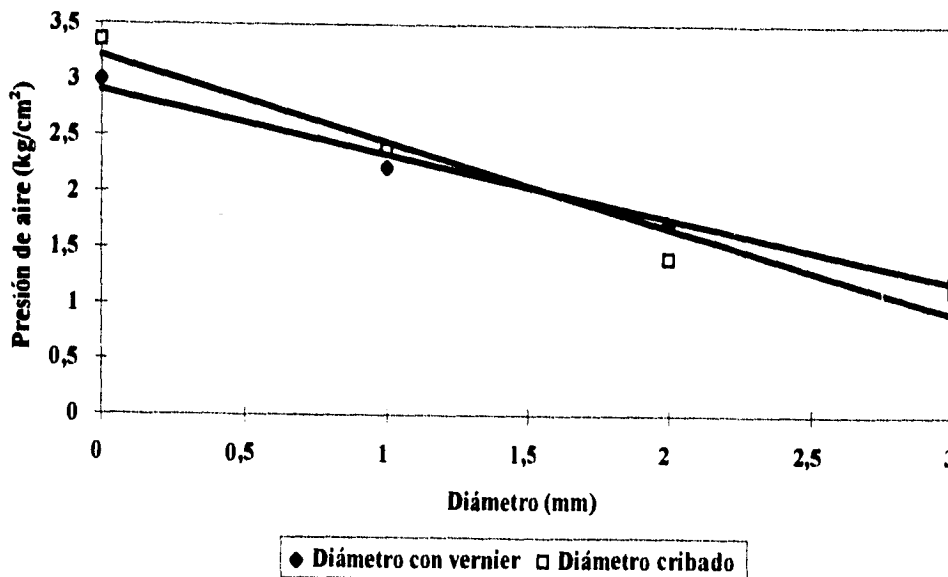
b = medido con vernier

En la tabla 11 se muestran los porcentajes de material retenido en malla.

Tabla 11 Porcentajes de retención en malla en el efecto de la presión de aire

Presión de aire (kg/cm ²)	Porcentaje de material retenido en la malla y abertura, (mm)					
	6/3.35	8/2.38	10/1.68	12/1.41	16/1.13	18/0.96
0	98.5	1.5	-	-	-	-
1	1	86.5	12.5	-	-	-
2	-	-	10.3	86.8	2.9	-
3	-	-	-	25.4	74.5	0.1

Figura 25 Efecto de la presión de aire sobre el tamaño de partícula



4.2.2 Efecto de la concentración de alginato

Al elaborar esferas con diferentes concentraciones de alginato se empleó una presión de aire de 3 kg/cm². Los tiempos de adición de las soluciones fueron como sigue: la solución de alginato al 1% empleó 2 horas, la solución de alginato al 2% empleó una hora con 12 minutos, la solución de alginato al 3% utilizó 52 segundos y la solución del alginato al 4% utilizó 4 horas con 4 minutos.

Las soluciones de alginato al 1, 2 y 4% se adicionaron a una velocidad de 1.1 mL/min porque al utilizar velocidades mayores en las soluciones diluidas se forman hilos entre las esferas geladas y en el caso de la solución al 4% se provoca un congestionamiento en la alimentación generando daños en el tubo tygon que conduce la solución. Las soluciones del 3% se adicionaron a una velocidad de 325 mL/min.

Las curvas granulométricas de las esferas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato se muestran en el anexo C. Las distribuciones de tamaños de partícula fueron más amplias, al utilizar soluciones de alginato diluidas. En la figura 26 se presentan graficados los tamaños de partícula que tuvieron la frecuencia máxima de retención en malla y los tamaños medidos con vernier contra las concentraciones de alginato empleadas (ver también la tabla 12). El diámetro de las esferas resultó ser una función directa de la concentración de alginato.

Tabla 12 Tamaños de partícula obtenidos a diferentes concentraciones de alginato

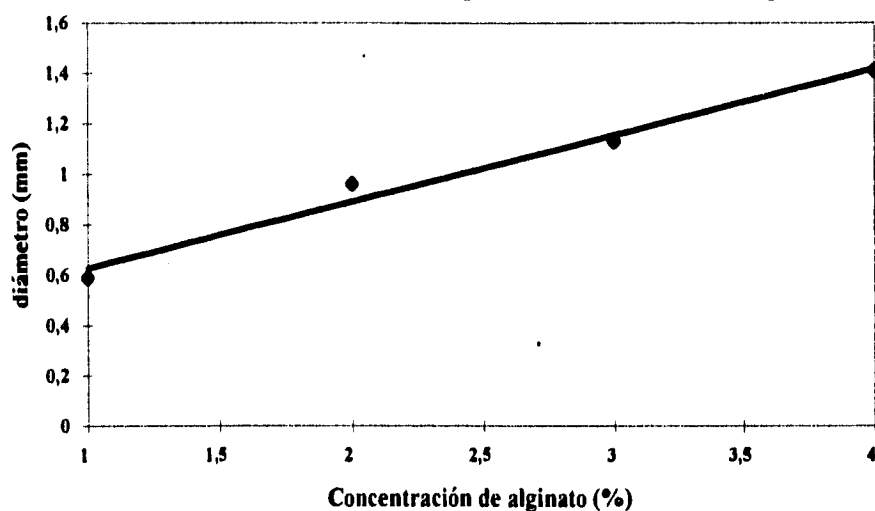
Concentración de alginato (%)	Diámetro ^a (mm)
1	0.59
2	0.96
3	1.13
4	1.41

Nota: a = más frecuente en el cribado

En la tabla 13 se observan las proporciones de material retenidos en diferentes mallas.

Tabla 13 Porcentajes de retención en malla en el efecto de la concentración de alginato

Conc. de alginato (%)	Porcentaje de material retenido en la malla y abertura, mm:									
	8/2.38	10/1.68	12/1.41	16/1.13	18/0.96	20/0.8	30/0.59	35/0.5	40/0.42	
4	11.2	41.9	31	9	7	-	-	-	-	
3	-	-	25.4	74.5	0.1	-	-	-	-	
2	-	-	-	25.4	38.6	34	2	-	-	
1	-	-	-	10.7	11.4	11	32	8	10	

Figura 26 Efecto de la concentración de alginato sobre el tamaño de partícula

Por lo que se concluye que es conveniente emplear una solución de alginato al 3% para obtener un tamaño de partícula de entre 1.13 y 1.41 mm.

4.2.3 Efecto de la velocidad de alimentación

Para estudiar el efecto de la velocidad de alimentación de las soluciones, se empleó una solución de alginato al 3% y se trabajó a una presión de aire de 3 kg/cm².

Las curvas granulométricas para las esferas elaboradas a cada velocidad de alimentación, se presentan en el anexo C. En la tabla que se muestra abajo se presentan los valores de los tamaños de partícula obtenidos por cribado que tuvieron la frecuencia máxima de retención en malla y los valores medidos con el vernier, se graficaron contra las velocidades de alimentación empleadas (figura 27).

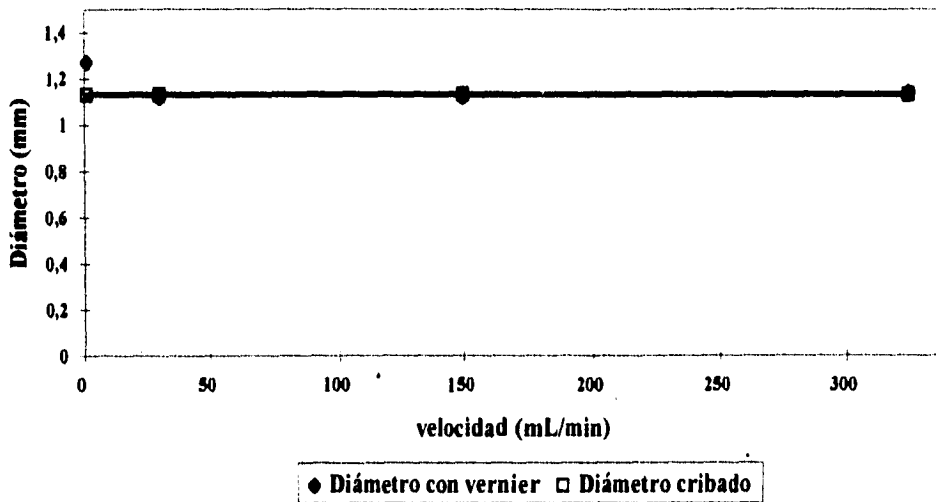
Tabla 14 Tamaños de partícula obtenidos con diferentes velocidades de alimentación

Velocidad de alimentación (mL/min)	Diámetro ^a (mm)	Diámetro ^b (mm)
1.1	1.13	1.27 ± 0.12
30	1.13	1.12 ± 0.16
150	1.13	1.12 ± 0.20
325	1.13	1.14 ± 0.18

Nota: a = más frecuente en el cribado
b = medido con vernier

La velocidad de alimentación no tuvo efecto alguno sobre el diámetro de la esfera; esto permite trabajar con altas velocidades de alimentación de la mezcla, lo cual implica una economía en el proceso.

Figura 27 Efecto de la velocidad de alimentación sobre el tamaño de partícula



4.2.4 Efecto de la altura de adición

Para estudiar el efecto de la altura, se utilizó una solución de alginato al 3%, y se trabajó a una presión de aire de 3 kg/cm² y a una velocidad de alimentación de 325 mL/min. Se obtuvieron las relaciones de diámetro mayor a diámetro menor de treinta esferas, como se explicó en metodología, para estudiar su esfericidad. Estos valores se presentan en la tabla 15.

Tabla 15 Efecto de la altura en la esfericidad de las partículas

Altura (cm)	Esfericidad
20	2.61 ± 0.71
40	1.74 ± 0.67
80	1.00

Nota: Esfericidad = $D_{\text{mayor}}/D_{\text{menor}}$

La altura de la aguja extractora no tuvo efecto sobre el diámetro de partícula, pero modifica la esfericidad de las partículas.

4.2.5 Efecto de la carga celular

Se prepararon mezclas con diferentes relaciones de alginato/células (1.5g/20g a 2.7g/4g), utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Se trabajó a una presión de aire de 3 kg/cm² y a una velocidad de alimentación de la mezcla de 325 mL/min. Los tiempos de adición fueron de dos horas y media para todas las mezclas.

La caracterización granulométrica en mallas realizada se presenta en el anexo C. La distribución de tamaño de partículas fue más amplia con relación a las que se obtuvieron anteriormente. Se presentó una dispersión cada vez mayor al incrementarse la cantidad de células y disminuir la cantidad de alginato en la mezcla. Los tamaños de partícula que tuvieron la frecuencia máxima de retención en malla siempre fueron de entre 1.13 y 1.41 mm.

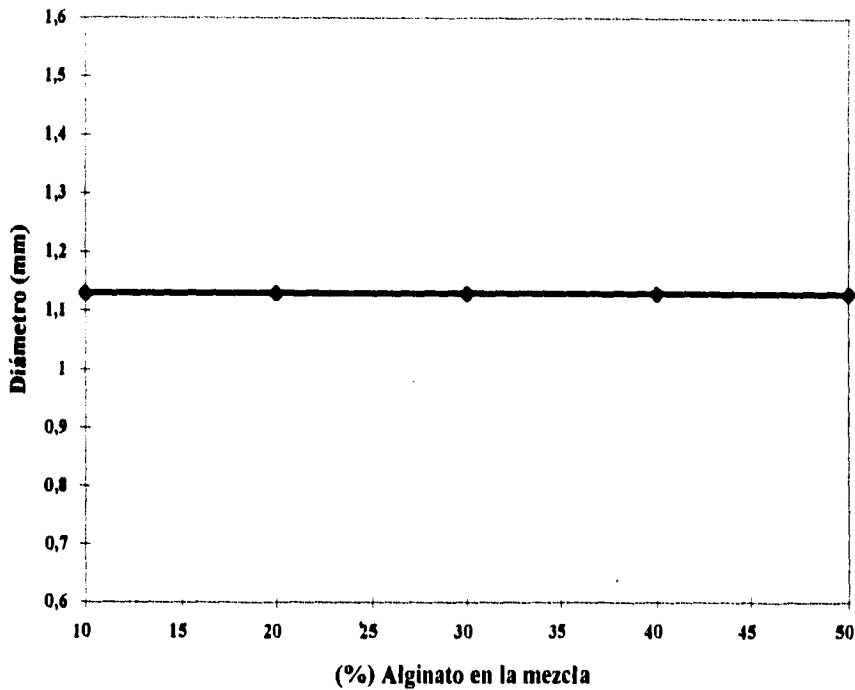
Al elaborar esferas con diferentes relaciones alginato/células, tampoco se observó un efecto en el diámetro de partícula. En la figura 28 se presentan los diámetros de partícula con mayor retención en malla contra el porcentaje de alginato en la mezcla.

En la tabla 16 se pueden observar los porcentajes de retención del material de cada mezcla:

Tabla 16 Porcentajes de retención de malla en el efecto de la carga celular

Relación alginato/células (g/g)	Porcentaje de material retenido en la malla y abertura, mm:					
	10/1.68	12/1.41	16/1.13	18/0.96	20/0.8	30/0.59
2.7/4	9.24	14.07	25.65	0.08	0.01	-
2.4/8	4.41	8.24	33.97	3.25	0.02	-
2.1/12	6.63	27.01	38.83	1.64	0.01	-
1.8/16	15.46	42.62	56.70	15.63	13.07	5.78
1.5/20	11.76	31.39	34.01	6.33	1.66	-

Figura 28 Efecto de la mezcla alginato/células sobre el tamaño de partícula



4.3 Condiciones de operación para la elaboración del biocatalizador

La inmovilización puede llevarse a cabo manualmente goteando la mezcla de alginato/células a través de una jeringa en la solución de CaCl_2 , y a gran escala mediante agujas contenidas en cilindros concéntricos haciéndoles pasar un flujo de aire. Con el equipo empleado en este trabajo y una vez estudiando el efecto de cada variable de proceso sobre el tamaño de partícula, las condiciones idóneas para elaborar las esferas de alginato de calcio con *P. fluorescens* para obtener un tamaño de partícula de entre 1.13 y 1.41 mm son las que se presentan en la tabla 17.

Tabla 17 Condiciones de operación para la elaboración de esferas de alginato con *P. fluorescens*

Concentración de alginato (p/v)	3%
Presión de aire	3 kg/cm ²
Velocidad de alimentación	325 mL/min
Altura de adición	80 cm

Para obtener la mayor relación de alginato/células, se centrifugó un medio de cultivo previamente crecido por 24 horas como se explicó en la metodología y se mezclaron con una solución de alginato dando una concentración de alginato en la mezcla del 2.75% y de células del 18.75%.

En varios trabajos reportados el proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la mezcla de una suspensión de células previamente cultivadas y una solución concentrada de alginato. En la mayoría de los casos al realizar este procedimiento, la relación alginato/células en la mezcla se reduce, por ejemplo si se mezclan volúmenes iguales de la solución de alginato y de la suspensión de células.

En este trabajo para el proceso de elaboración de las esferas con *Pseudomonas fluorescens* se propuso, adicionar alginato en polvo al medio de cultivo. De esta manera se obtiene la concentración deseada de alginato y la mayor concentración de células en la esfera. Se encontró que al gelar las esferas en la solución de cloruro de calcio se observa un fenómeno de desorción de los nutrientes del medio de cultivo, cambiando el aspecto opaco de las esferas a otro translúcido.

4.4 Caracterización del biocatalizador

4.4.1 Densidades real y aparente

La densidad del biocatalizador es un parámetro importante para el diseño y manejo de cualquier modo de operación, por ejemplo en columna empacada, columna fluidificada o reactor agitado.

Una vez obtenidas las condiciones necesarias para obtener el tamaño de partícula deseado, se elaboraron esferas sin células y con *Saccharomyces cerevisiae* o *Pseudomonas fluorescens* y se determinaron sus densidades reales y aparentes, contenido de humedad, humedades críticas y fracciones vacías, para su caracterización física. La razón por la cual

se llevaron a cabo algunas pruebas con *S. cerevisiae* (tanto en la elaboración de las esferas, como en la caracterización reológica de mezclas alginato-células) fue el hecho de que en la etapa inicial del proyecto no se contaba con cantidades considerables de *P. fluorescens*. Posteriormente se hicieron las mismas pruebas con la bacteria definitiva.

Las esferas elaboradas con alginato al 3% sin células con un diámetro de entre 1.13 y 1.41mm, presentaron una densidad real de 1.0053 g/mL y una densidad aparente de 0.9542 g/mL.

En la elaboración de las esferas de un tamaño de entre 1.13 y 1.41 mm, con alginato al 3% y una solución de *Saccharomyces cerevisiae* al 40% se obtuvo la siguiente caracterización:

Tabla 18 Densidad real y consistencia de las esferas con diferentes relaciones alginato/células

Alginato de sodio 3% (mL)	Solución de las células 40% (mL)	Conc. de alginato en la mezcla (%)	Conc. de las células en la mezcla (%)	Densidad real (g/mL)	Consistencia del gel
50	50	1.5	20	1.053	±
60	40	1.8	16	1.054	+
70	30	2.1	12	1.053	+
80	20	2.4	8	1.054	+
90	10	2.7	4	1.054	++

Nota: ± suave, + mediana, ++ rígida

En la tabla anterior se muestra que la densidad real de las esferas es independiente de la relación alginato/células, son valores constantes (1.054 g/mL). En términos de dureza, se encontró que las esferas elaboradas con la máxima relación de 16% para células y 1.8% para alginato presentan una buena consistencia. Las unidades con las cuales se calificó la consistencia del gel son arbitrarias, porque se determinaron mediante la presión ejercida entre los dedos pulgar e índice. Las esferas más resistentes al tacto fueron las que contenían mayor cantidad de alginato (2.7g/4g) y las más frágiles las que contenían mayor cantidad de células (1.5g/20g).

Las densidades aparentes de las esferas también resultaron independientes de la relación alginato/células. En todos los casos se obtuvo un valor de 0.6298 g/mL

Se elaboraron esferas con *Pseudomonas fluorescens* de dos maneras; a) separando las células de un caldo de cultivo por centrifugación como se explicó anteriormente y mezclándolas con una solución de alginato y goteándolas con jeringa a la solución de cloruro de calcio, (con un diámetro de partícula de 2.5 mm); y b) agregando alginato en polvo al caldo de cultivo (D.O.^{610nm} = 0.221) y extruyéndolas en el equipo ya descrito, (con un diámetro de partícula de entre 1.13 y 1.41 mm).

En la siguiente tabla se comparan las densidades reales y aparentes de las esferas elaboradas:

Tabla 19 Densidades de las esferas elaboradas con y sin *P. fluorescens*

Conc. de alginato en la mezcla (%)	Conc. de <i>P. fluorescens</i> en la mezcla (%)	Diámetro (mm)	Densidad aparente (g/mL)	Densidad real (g/mL)
3	0	1.13	0.9542	1.0053
3	0.067	1.13	0.6010	1.0062
2.54	18.75	2.51	0.5673	1.0085

Al comparar las densidades aparentes de las esferas de los tres biocatalizadores, la menor densidad aparente la presentó el biocatalizador con mayor diámetro de partícula. La densidad aparente cambia al modificar la carga celular de las esferas. La carga celular influyó ligeramente en las densidades reales, aumentando con el contenido de células.

Se determinó la concentración de alginato en el biocatalizador por el método de ácido sulfúrico-resorcinol (D.O.^{494 nm} = 0.240), la cual fue de 3.43 %, concentración mayor a la que se utilizó en la mezcla; y el contenido de proteínas fue de 0.0098 g/L.

4.4.2 Fracción vacía

Una propiedad importante en la caracterización del biocatalizador es la porosidad, que para el caso de un catalizador de esta índole, se equipara a la fracción vacía (ϵ). La fracción vacía o fracción de espacios vacíos es el volumen interpartícula, no ocupado por el biocatalizador, que queda disponible para ser ocupado por el sustrato.

La fracción vacía es un parámetro importante en el diseño de una columna empacada con catalizador porque se ve involucrado en la estimación de la caída de presión, tiempo de residencia, etc.

Por ejemplo el tiempo de residencia está definido por la ecuación:

$$\theta = \frac{V \cdot \epsilon}{Q}$$

Donde:

- V Volumen del reactor
- Q Gasto de alimentación
- ϵ Fracción vacía

Se deseó conocer cual era la relación de la fracción vacía para diferentes concentraciones de alginato en el biocatalizador y para diferentes tamaños de partícula, así como el efecto de las relaciones alginato/células.

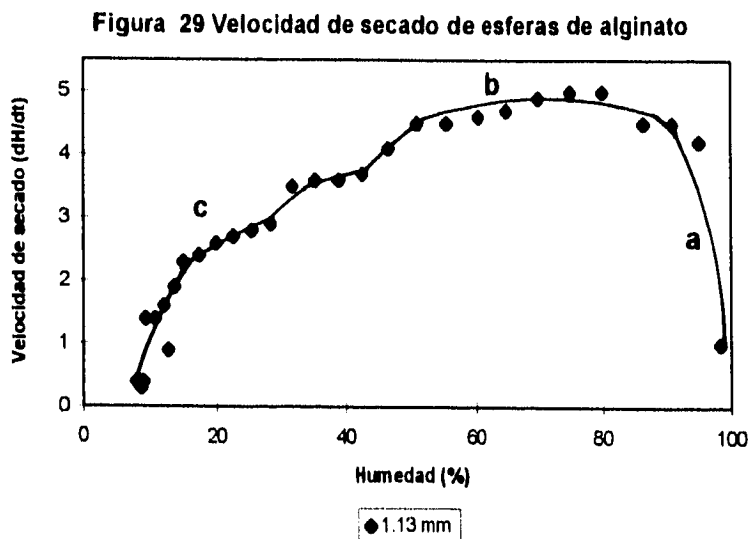
El efecto de tamaño de partícula en la fracción vacía se estudió a una concentración de alginato al 3% y el efecto de las concentraciones de alginato en la fracción vacía se estudió a un tamaño de partícula de entre 1.13 y 1.41 mm. Para estudiar el efecto de las relaciones alginato/células se emplearon tamaños de partícula de entre 1.13 y 1.41 mm

La fracción vacía se puede conocer utilizando el método de desplazamiento de un volumen de líquido por las partículas de catalizador (Buchholz, 1979). Quirasco (1994) reporta que el tiempo de residencia teórico (calculado con la fracción vacía obtenida a partir del método de desplazamiento de líquido), y el tiempo de residencia experimental de un reactor de lecho fijo con alginato de calcio, son diferentes. De acuerdo al tiempo de residencia experimental, la fracción vacía del catalizador debería tener un valor mayor a la fracción vacía obtenida por el método de desplazamiento de líquido. Esto se debe a que el gel de alginato presenta una cantidad de agua que puede ser sustituida por el líquido de la reacción, la cual representa el "agua libre" de hidratación del gel, por lo que propuso evaluar la fracción vacía del biocatalizador, eliminando primero el agua libre de hidratación.

En la figura 29 se observan los tres periodos de secado:

- a) En el primer periodo hay una alta velocidad de evaporación, porque el biocatalizador tiene que alcanzar una temperatura de equilibrio. Aquí la velocidad de secado va en aumento.
- b) En el segundo periodo se presenta un equilibrio entre la velocidad de transferencia de calor y la velocidad de transferencia de masa en la superficie. La velocidad de difusión hacia la superficie y la velocidad de evaporación son iguales. Aquí la velocidad de secado es casi constante, pues el agua libre puede difundirse dentro del sólido hacia la superficie en la cual se evapora a velocidad constante.
- c) En el tercer periodo la velocidad de secado es decreciente, y comienza cuando se alcanza el contenido de humedad crítico. Aquí el agua libre ya ha sido eliminada y el agua ligada comienza a evaporarse dentro de la partícula y se difunde lentamente fuera de ella hacia el gas que la rodea.

La humedad crítica se alcanza cuando se presenta el cambio de pendiente en la velocidad de secado (Perry & Green, 1984). Todas las esferas se secaron hasta esta humedad crítica para poder rehidratarlas y calcular sus fracciones vacías. El tamaño de poro se puede conocer utilizando proteínas de tamaño conocido, Stewart y Swaisgood, (1993) reportaron un diámetro de poro para alginato de calcio de 80 a 100 x 10¹⁰ m.



En la figura 30 se presentan las curvas de secado para esferas elaboradas con diferente concentración de alginato, y en la figura 32, para esferas elaboradas con diferente tamaño de partícula. En la figura 34 se presentan las curvas de secado para esferas con diferente relación alginato/células.

Las figuras 31, 33 y 35 presentan las velocidades de secado en función del contenido de humedad para esferas con diferente concentración de alginato, diferente diámetro y diferente relación alginato/células respectivamente. En el anexo D se presentan los valores obtenidos en las curvas de secado y los valores de las velocidades de secado obtenidos para cada caso.

A continuación se presenta en la siguiente tabla 20 el valor de las humedades críticas y el tiempo requerido para alcanzarlas, en las diferentes esferas.

Tabla 20 Humedades críticas de diferentes esferas

Esferas con diámetro de 1.13 mm			Esferas con Alginato al 3%			Esferas con diámetro de 1.13 mm		
Conc. de alginato (%)	Humedad crítica (%)	Tiempo (minutos)	Diámetro (mm)	Humedad crítica (%)	Tiempo (minutos)	Relación alginato/células (%/%)	Humedad crítica (%)	Tiempo (minutos)
4	n.d.	n.d.	3.35	46	16	4/0.067	45	13
3	49	12	2.38	53	14	3/0.067	48	14
2	49	13	1.41	58	10	2/0.067	50	14
1	55	12	1.13	49	12	1/0.067	55	12

Nota : n.d. = no determinado

La humedad crítica y por consiguiente la fracción vacía, no se evaluó para esferas con alginato al 4%, esto debido a que durante la elaboración de las esferas se presentaron daños en el tubo tygon del equipo debido a un congestionamiento en la alimentación porque la solución es muy viscosa.

Figura 30 Curvas de secado de esferas con diferente tamaño

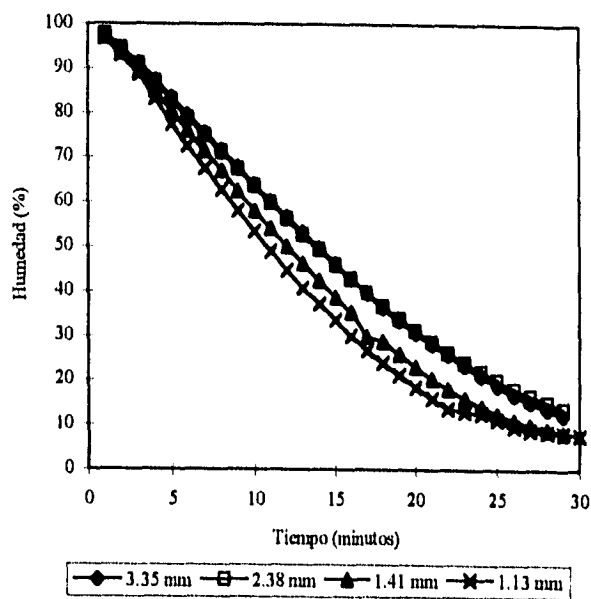


Figura 31 Velocidades de secado de esferas con diferente concentración de alginato

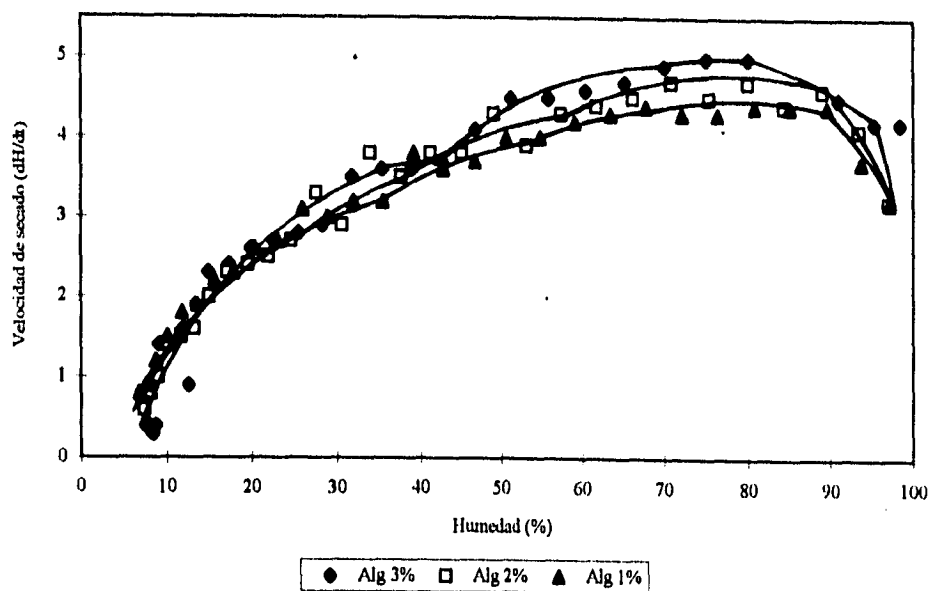


Figura 32 Curvas de secado de esferas con diferente concentración de alginato

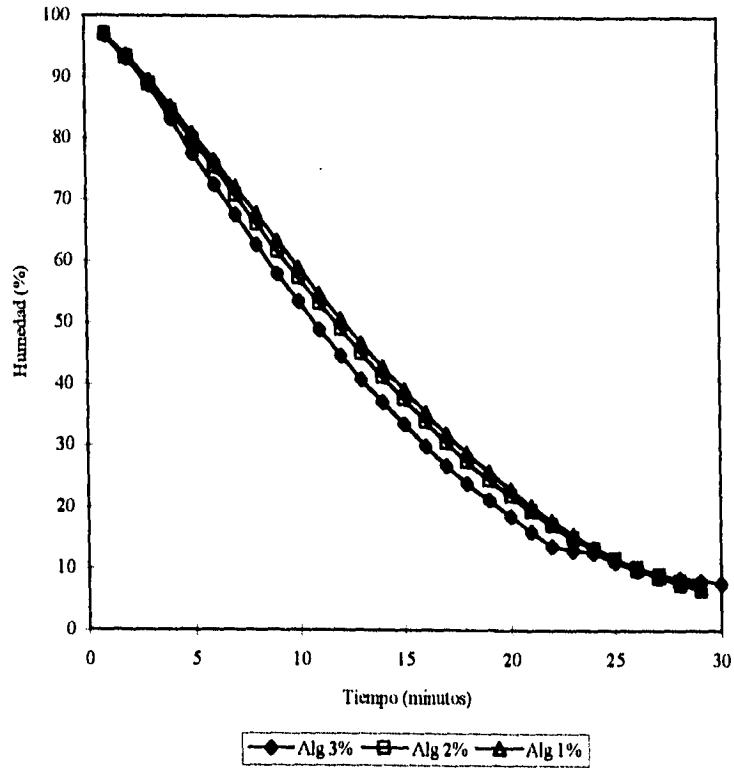


Figura 33 Velocidades de secado de esferas con diferente diámetro

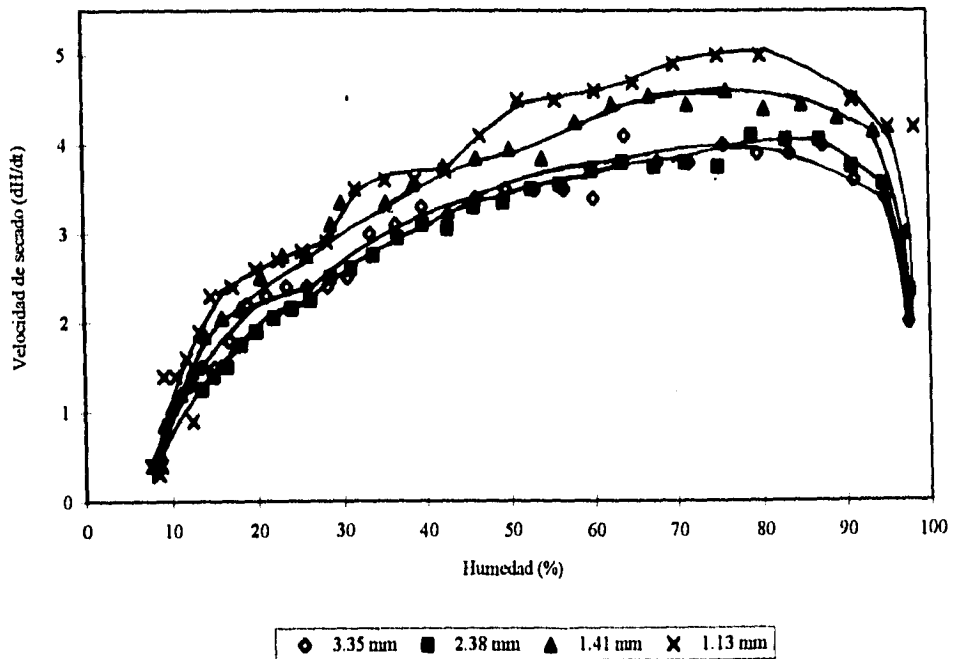


Figura 34 Curvas de secado de esferas con diferente relación alginato/*P. fluorescens*

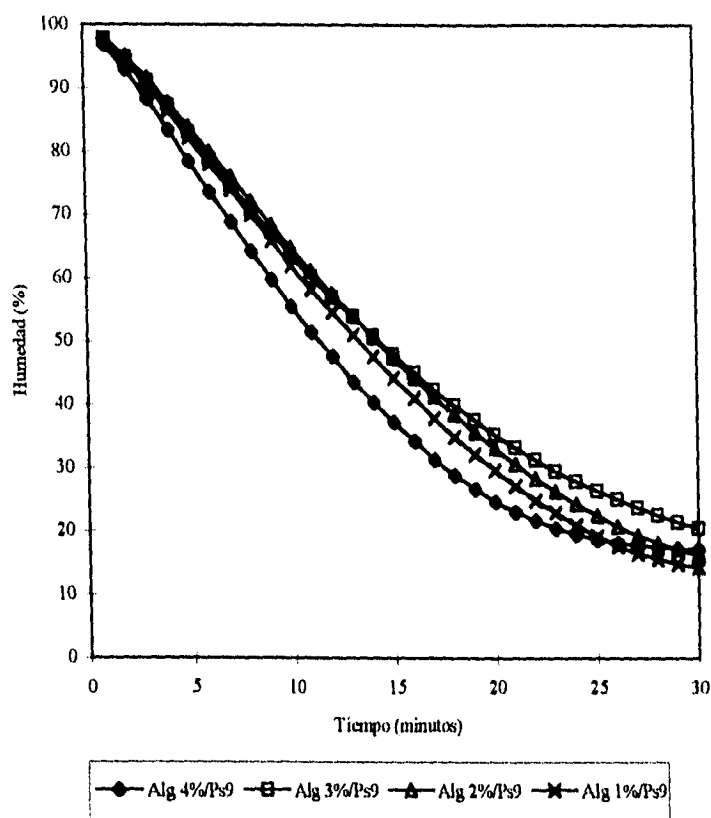
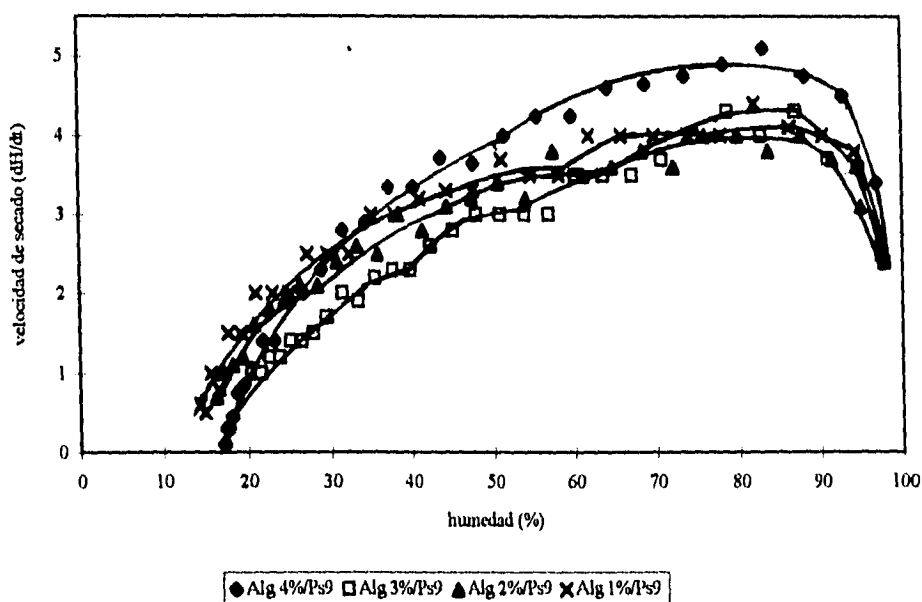


Figura 35 Velocidades de secado de esferas con diferente relación alginato/*P. fluorescens*



Las esferas elaboradas con una concentración de alginato de 2 y 3%, presentaron humedades críticas iguales (49%). Las esferas con alginato al 1% presentaron una humedad crítica mayor (55%). Los tiempos que emplearon estas esferas para alcanzar las humedades críticas fueron casi iguales.

Los tiempos que emplearon las esferas con diferentes diámetros para alcanzar las humedades críticas, estuvieron en función directa al tamaño de partícula. Las esferas con un diámetro de 3.35 mm emplearon 16 minutos y las esferas con 1.13 mm de diámetro requirieron de 12 minutos. El contenido de humedad crítica fue mayor al disminuir el tamaño de partícula en el caso de las esferas con 3.35 mm, 2.38 mm y 1.41 mm, pero no en el caso de las esferas con un tamaño de 1.13 mm, cuya humedad crítica fue menor. Para el caso de las esferas elaboradas con diferentes concentraciones de alginato y células, las humedades críticas aumentaron de manera proporcional al disminuir la concentración de alginato en la mezcla, y los tiempos en alcanzar estas humedades fueron parecidos, entre 12 y 14 minutos.

Tabla 21 Contenido de humedad total y fracciones vacías para esferas con y sin células

Esferas con diámetro de 1.13 mm			Esferas con alginato al 3%			Esferas con diámetro de 1.13 mm		
Conc. de alginato (%)	$\epsilon_{vacía}$	Humedad Total (%)	Diámetro (mm)	$\epsilon_{vacía}$	Humedad total (%)	Relación alginato/células (%/%)	$\epsilon_{vacía}$	Humedad total (%)
4	n.d.	92	3.35	0.6875	93	4/0.067	0.5833	83
3	0.6862	93	2.38	0.6938	93	3/0.067	0.5777	84.5
2	0.6734	95	1.41	0.6346	93	2/0.067	0.6354	85.5
1	0.6930	96	1.13	0.6862	93	1/0.067	0.6428	87

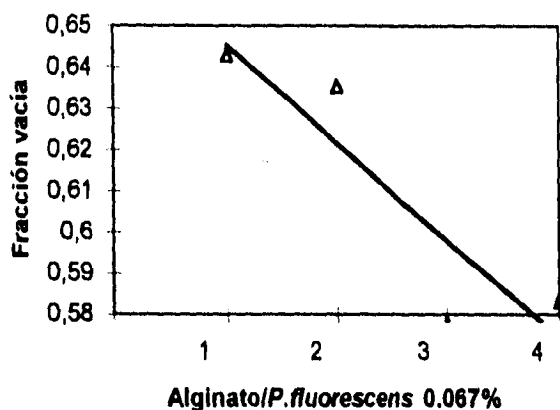
Nota: n.d. = no determinada

Las fracciones vacías (ϵ) de las esferas obtenidas con diferentes concentraciones de alginato presentaron valores promedio de, $\epsilon = 0.6842 \pm 0.0099$. Al modificar los tamaños de partícula, las fracciones vacías obtenidas son, iguales, como se esperaba ($\epsilon = 0.6755 \pm 0.0274$).

En las esferas elaboradas con diferente concentración de alginato/células se observa mayor fracción vacía a menores concentraciones de alginato que en las esferas que contienen mayor cantidad. La figura 36 muestra la relación proporcional entre la fracción vacía y la relación alginato/células.

El contenido de humedad total es inversamente proporcional a la concentración de alginato empleada en las esferas. El contenido de humedad total es el mismo para esferas con diferente diámetro. Al emplear las mezclas alginato/células en las esferas, el contenido de humedad total también es inversamente proporcional al contenido de alginato en la mezcla, y comparándolo con las esferas sin células, el porcentaje de humedad total es menor al contener las células.

Figura 36 Fracciones vacías para esferas con distinta relación alginato/células



4.4.3 Capacidad de adsorción de las esferas de alginato

Las esferas de alginato de calcio elaboradas con alginato al 3% (2 mm diámetro), presentaron interesantes adsorciones de los compuestos tóxicos estudiados en este trabajo. Las esferas adsorbieron el 13.21% de fenol presente en una solución de 1g/L y el 38.31%, 31.32% y 40.47% de un solución con 100 mg/L de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol respectivamente. El comportamiento de las adsorciones se ajustó a la ecuación de Freundlich, con buenos factores de correlación (r). Las pruebas de adsorción de tóxicos hacia el alginato de calcio, indican el nivel de afinidad de los fenoles al material. Una buena afinidad favorece la disponibilidad del tóxico en el biocatalizador para una mejor biodegradación. En la tabla 22 se presentan los valores de K y n obtenidos.

Tabla 22 Constantes de las isotermas de Freundlich para los sistemas alginato de calcio-fenoles

Compuesto	C ₀ del compuesto (mg/L)	Adsorción máxima (%)	K	n	r
Fenol	1000	13.21	1.59	1.52	0.96
2-clorofenol	100	38.31	15.32	4.65	0.90
2,4-diclorofenol	100	31.34	6.63×10^{-6}	5.06×10^{-7}	0.97
2,4,6-triclorofenol	100	40.47	5.77×10^{-1}	3.15×10^{-5}	0.98

En el anexo E se presentan las curvas de adsorción específicas para el fenol.

4.4.4 Capacidad de atrapamiento

En la elaboración del biocatalizador, se desea una partícula con una buena resistencia mecánica capaz de que soportar el esfuerzo de corte en una columna de lecho fijo en operación, y por otro lado, que tenga la mayor carga celular posible para poder obtener una alta actividad en la biodegradación del compuesto tóxico.

Anteriormente se encontró que la relación alginato/células con una buena resistencia mecánica y una buena concentración de células fue de 1.8g/16g.

A partir de una mezcla de alginato/*P.fluorescens* con una relación 2.54g/18.77g, la carga celular que se encontró está expresada en la tabla 23 como unidades formadoras de colonias por gramo de soporte, por mililitro de soporte y por mililitro de columna.

Tabla 23 Capacidad de atrapamiento del biocatalizador

Mezcla alginato/células	UFC/g _{soporte}	UFC/mL _{soporte}	UFC/mL _{columna}
2.54%/18.77%	3.85×10^{14}	1.91×10^{14}	4.03×10^{14}

El gel de alginato tiene una muy buena capacidad de atrapamiento, sin embargo será necesario realizar pruebas reológicas para conocer el comportamiento viscoelástico de los geles con diferentes cargas celulares.

4.4.5 Calcio consumido por el alginato de sodio

Se determinó el calcio consumido por diferentes concentraciones de alginato, y la cantidad de calcio consumido por alginato cuando se mezcla con diferentes relaciones de células. En la tabla 24 se muestran las soluciones con diferente concentración de alginato y en la tabla 25 se muestran las mezclas preparadas con alginato y *S. cerevisiae*.

Tabla 24 Calcio requerido por diferentes soluciones de alginato

Conc. de alginato (%)	Volumen de EDTA requerido (mL)	Calcio en la solución de CaCl ₂ (mg/L)	Calcio consumido por el alginato (mg/L)	Alginato en la solución (mg/L)	Relación $\frac{\text{mg Ca}}{\text{mg Alg}}$
3	17.60	2,555.82	469.05	600	0.7817
2	18.53	2,690.87	334.00	400	0.8350
1	18.60	2,701.04	323.83	300	1.0794
0.5	19.40	2,817.21	207.66	100	2.0766

Este dato es importante en el costeo del biocatalizador y para el escalamiento del proceso, al conocer el contenido de calcio que debe tener la solución de CaCl₂, puede ser recirculada. A partir de 200 mL de alginato de sodio al 3% se obtuvieron 127.71 gramos de esferas de alginato de calcio, y se utilizaron 2 L de CaCl₂ 0.1 M.

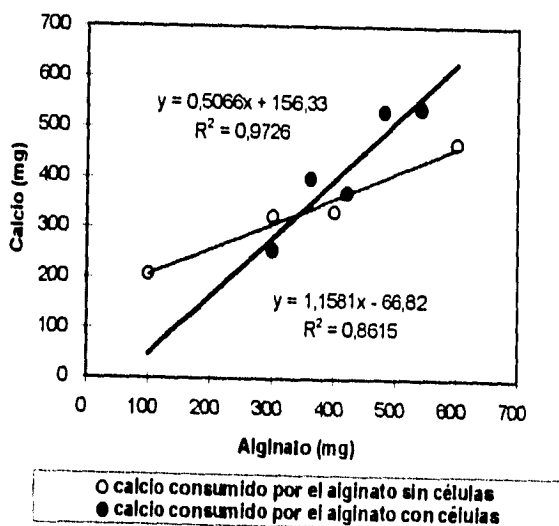
Tabla 25 Calcio requerido por soluciones con alginato/*S.cerevisiae*

Conc. de alginato en la mezcla (%)	Conc. de células en la mezcla (%)	Volumen de EDTA requerido (mL)	Calcio en la solución de CaCl ₂ (mg/L)	Calcio consumido por el alginato (mg/L)	Alginato en la solución (mg/L)	Relación $\frac{\text{mg Ca}}{\text{mg Alg}}$
90	10	19.70	2,892.05	537.31	540	0.9950
80	20	19.73	2,896.46	532.90	480	1.1102
70	30	20.83	3,057.94	371.42	420	0.8843
60	40	20.50	2,775.49	399.90	360	1.1108
50	50	21.56	2,919.01	256.38	300	0.8546

En la figura 37 se graficaron los miligramos de calcio consumidos por el alginato de sodio, y se observa que es directamente proporcional a su concentración. En comparación con las mezclas llevadas a cabo con células, la pendiente de la curva es menor. Esto se debe a un efecto difusional de los iones calcio a través del gel, obviamente el calcio requerido es mayor cuando en las soluciones la concentración del alginato es mayor. El valor promedio de la relación de miligramos de calcio y miligramos de alginato que se obtuvo para las soluciones

de alginato sin células fue de 0.6931 ± 0.4310 y, el valor promedio de la relación de miligramos de calcio y miligramos de alginato de las soluciones de alginato con células fue de 0.99098 ± 0.1210 .

Figura 37 Calcio consumido por el alginato de sodio



4.5 Reología

4.5.1 Reología de las soluciones de alginato

Esta caracterización reológica es importante para el dimensionamiento y selección de equipo de tubería y sistema de bombeo para el transporte del fluido en el escalamiento del proceso de elaboración del biocatalizador. Con la finalidad de caracterizar mejor las soluciones de alginato se prepararon diferentes concentraciones para realizar las determinaciones reológicas antes y después de un tratamiento térmico.

En la figura 38 se muestran las viscosidades en función de las velocidades de deformación para estas soluciones. Se observa que para velocidades de deformación menores a 0.4 s^{-1} , las viscosidades de las soluciones de alginato al 4% y 3% junto con alginato esterilizado al 4% fueron mucho mayores a las viscosidades de las soluciones de alginato esterilizada al 2%, alginato al 1% antes y después de la esterilización, y alginato al 0.5% antes y después de la esterilización, mencionadas en orden descendente. A partir de la velocidad de deformación de 0.4 s^{-1} , se conserva este orden descendente de viscosidades, las viscosidades de alginato al 2% y alginato al 3% esterilizado, son iguales, y sus valores están entre las soluciones de alginato al 4% y al 2% esterilizadas. Las viscosidades de las soluciones de alginato al 2% esterilizado y alginato al 1% muestran valores cada vez más cercanos en las velocidades de deformación de 0.7 a 3 s^{-1} . En todos los casos las viscosidades de las soluciones de alginato tuvieron valores mucho menores después de la esterilización comparadas con sus respectivas soluciones antes de ser esterilizadas; esto puede deberse a un reordenamiento de las cadenas del polímero.

Los valores de K (índice de consistencia) de las soluciones de alginato antes del tratamiento térmico, disminuyeron al disminuir la concentración de alginato. Los valores de n (índice de flujo) fueron menores a uno, lo cual indica que presentaron un comportamiento moderadamente pseudoplástico y viscoso. Los factores de correlación que se obtuvieron fueron buenos (ver tabla 26).

Tabla 26 Caracterización reológica de las soluciones de alginato antes de la esterilización

Aguja No.	Concentración de alginato (%)	Índice de consistencia K (Ns ² /m ²)	Índice de flujo n	Factor de correlación r
4	4	16.99	0.88	0.99
4	3	6.65	0.86	0.99
4	2	1.31	0.67	0.94
1	1	0.19	0.95	0.99
1	0.5	0.04	0.83	0.98

Los valores de K (índice de consistencia) para las soluciones de alginato después del tratamiento térmico fueron también disminuyeron al disminuir la concentración de alginato. Los valores de n (índice de consistencia) fueron también menores a uno. El comportamiento de estas soluciones es moderadamente pseudoplástico y viscoso. Los factores de correlación fueron buenos (ver tabla 27).

Tabla 27 Caracterización reológica de las soluciones de alginato esterilizadas

Aguja No.	Concentración de alginato (%)	Índice de consistencia K (Ns ² /m ²)	Índice de flujo (n)	Factor de correlación (r)
4	4	2.75	0.77	0.97
4	3	1.15	0.73	0.94
1	2	0.26	0.90	0.99
1	1	0.06	0.84	0.99
1	0.5	0.02	0.75	0.97

El tratamiento térmico en las soluciones de alginato produjo un abatimiento drástico de la viscosidad.

Para estudiar el efecto de la concentración celular se realizaron diferentes mezclas alginato/*S.cerevisiae*. En la figura 39 se comparan las curvas de flujo de las soluciones de alginato con y sin adición de células. Se graficaron las viscosidades en función de las velocidades de deformación. Se observa que al mezclar el alginato con las células, los valores de las viscosidades están por encima de los valores de las viscosidades de alginato al 3%. Para velocidades de deformación menores a 0.4 s^{-1} , las viscosidad mayor la presentó la mezcla de alginato/*S.cerevisiae* de 2%/20%, siguieron los valores de las viscosidades en orden descendente las mezclas de 2.4%/16%, 2.8%/12%, 3.2%/8% y la menor viscosidad la presentó la mezcla 3.6%/4%. A velocidades de deformación mayores a 0.4 s^{-1} , las viscosidades de la mezcla 2%/20% fueron menores a las de la mezcla 2.4%/16%, pero siguieron siendo mayores a las de la mezcla 2.8%/12%. A simple vista se puede observar también que todas las curvas de flujo con alginato/*S.cerevisiae* presentan pendientes mayores a las pendientes de las curvas de alginato al 4 y 3%, y su comportamiento de la viscosidad con respecto a las velocidades de deformación es parecido al comportamiento que presenta el alginato al 2%, sin embargo las viscosidades son mucho mayores a las de éste último. A velocidades de deformación menores a 0.3 s^{-1} , las viscosidades de la solución de alginato al 4% son menores a los valores de las mezclas, para velocidades de deformación de 0.4 a 1.5 s^{-1} aproximadamente, sus viscosidades son mayores a las de la mezcla 3.6%/4%, y menores a las de la mezcla 3.2%/8%; para velocidades de deformación de entre 1.5 y 5 s^{-1} , las viscosidades de la solución de alginato al 4% fueron menores a las de la mezcla 2.4%/16%, y a velocidades de deformación mayores a 5 s^{-1} son mayores a las de esta mezcla.

Los valores de K (índice de consistencia) para las relaciones alginato/*S. cerevisiae* disminuyeron al disminuir la concentración de alginato y al aumentar la concentración de células en la mezcla. Los valores de n (índice de flujo) para las mezclas también fueron menores a uno. Si comparamos los valores de n de estas mezclas con los valores de n de las soluciones de alginato sin tratamiento térmico, éstos valores son menores que los últimos. Los factores de correlación que se obtuvieron fueron buenos. El comportamiento que presentaron estas mezclas fue también moderadamente pseudoplástico y viscoso (ver tabla 28).

Tabla 28 Caracterización reológica de las mezclas alginato/*Saccharomyces cerevisiae*

Aguja No.	Concentración de alginato en la mezcla (%)	Concentración de levadura en la mezcla (%)	Índice de consistencia (Ns^n/m^2) K	Índice de flujo n	Factor de correlación r
4	90	10	25.18	0.567	0.98
4	80	20	25.57	0.637	0.99
4	70	30	21.19	0.614	0.99
4	60	40	18.38	0.617	0.98
4	50	50	13.20	0.644	0.97

Para estudiar la reología de las soluciones de alginato con *P. fluorescens*, se realizaron mezclas de un cultivo que contenía 0.067% de células con diferentes concentraciones de alginato. En la figura 40 se presentan las viscosidades contra las velocidades de deformación de las soluciones de alginato con y sin *P. fluorescens*. Se observa que para velocidades de deformación menores a 0.3 s^{-1} , las viscosidades con valores de entre 20 y 30 Pa·s, fueron mayores para el alginato al 3% con *P. fluorescens*. En orden descendente siguieron los valores de alginato al 4% con *P. fluorescens* y alginato al 4%. Las menores viscosidades las presentaron las soluciones de alginato al 1% con *P. fluorescens* y alginato al 1%. Para velocidades de deformación de 0.3 s^{-1} en adelante, las viscosidades fueron iguales para las soluciones de alginato al 4% y alginato al 4% con *P. fluorescens*, para velocidades de deformación de entre 0.4 y 1 s^{-1} las viscosidades de alginato al 3% con *P. fluorescens* fueron iguales a estas últimas, pero a velocidades de deformación mayores a 1 s^{-1} las viscosidades del alginato al 3% con *P. fluorescens* fueron menores a las del alginato al 4% sin y con células. Las viscosidades de la solución de alginato al 2% con *P. fluorescens* fueron mayores a las viscosidades de alginato al 2% y menores a las viscosidades de la solución de alginato al 3%, y las viscosidades de la solución de alginato al 1% con *P. fluorescens* fueron mayores a los valores de la solución de alginato al 1%. En la mayoría de los casos las viscosidades de las soluciones aumentaron en presencia de las células.

Los valores de K (índice de consistencia) para las relaciones alginato/*P. fluorescens* disminuyeron al disminuir la concentración de alginato en la mezcla. Los valores de n (índice de flujo) también fueron menores a uno. El comportamiento de las mezclas fue también moderadamente reofluidificante y viscoso. Los factores de correlación fueron buenos (ver tabla 29).

Tabla 29 Caracterización reológica de las mezclas alginato/*P. fluorescens*

Aguja No.	Concentración de alginato en la mezcla (%)	Concentración de <i>P. fluorescens</i> en la mezcla (%)	Índice de consistencia K (Ns^2/m^2)	Índice de flujo n	Factor de correlación r
4	4	0.067	18.22	0.84	0.99
4	3	0.067	17.00	0.76	0.99
4	2	0.067	4.02	0.70	0.97
1	1	0.067	0.34	0.96	0.99

Los valores de viscosidad y pseudoplasticidad de las soluciones están fuertemente influenciados por la concentración de células presentes. Los experimentos realizados con *P. fluorescens*, se llevaron a cabo utilizando un alginato diferente al utilizado con *S. cerevisiae*. Es importante mencionar que la viscosidad y de las soluciones de alginato no sólo son función de la concentración de alginato, sino que dependen fuertemente del origen del alginato y de su pureza, así como de su composición en la frecuencia de las de unidades de ácido gulurónico y ácido manurónico.

En el anexo B se presenta la caracterización reológica cada una de las soluciones de alginato de sodio antes y después del tratamiento térmico, y con las diferentes relaciones alginato/células (*S. cerevisiae* o *P. fluorescens*).

Figura 38 Curvas de flujo de las soluciones de alginato antes y después de la esterilización

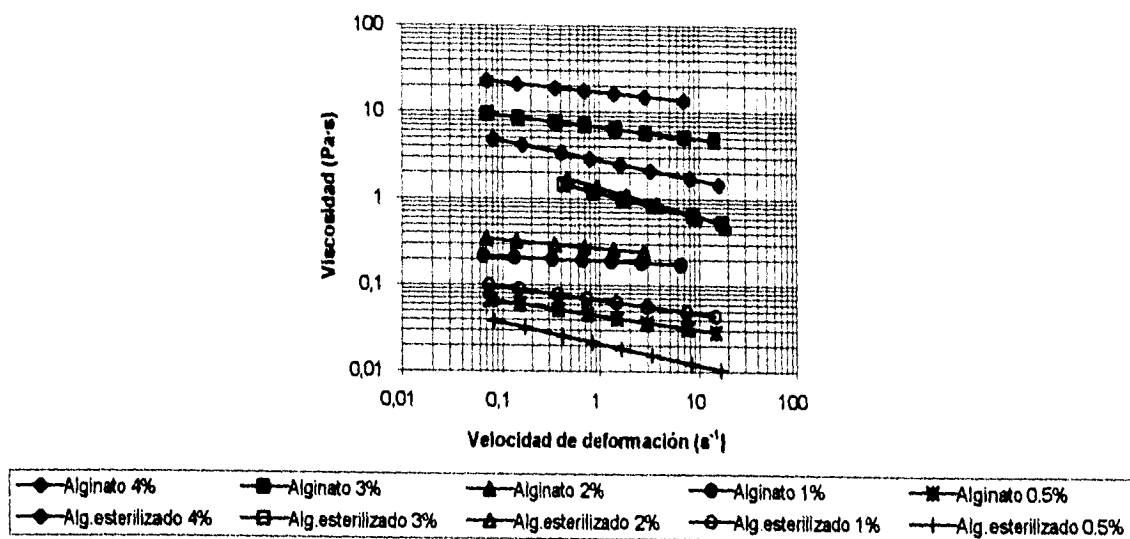


Figura 39 Curvas de flujo de soluciones de alginato y alginato/*S.cerevisiae*

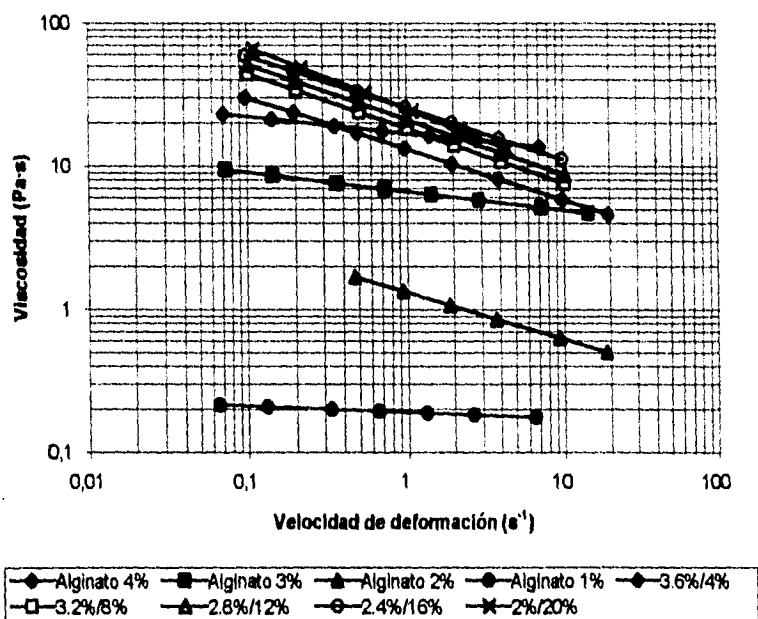
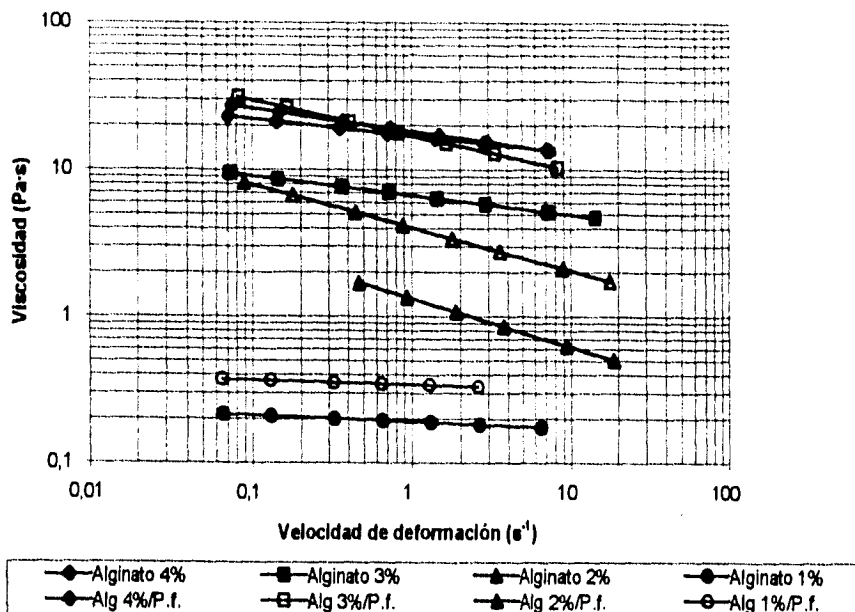


Figura 40 Curvas de flujo de soluciones de alginato y alginato/*P.fluorescens*

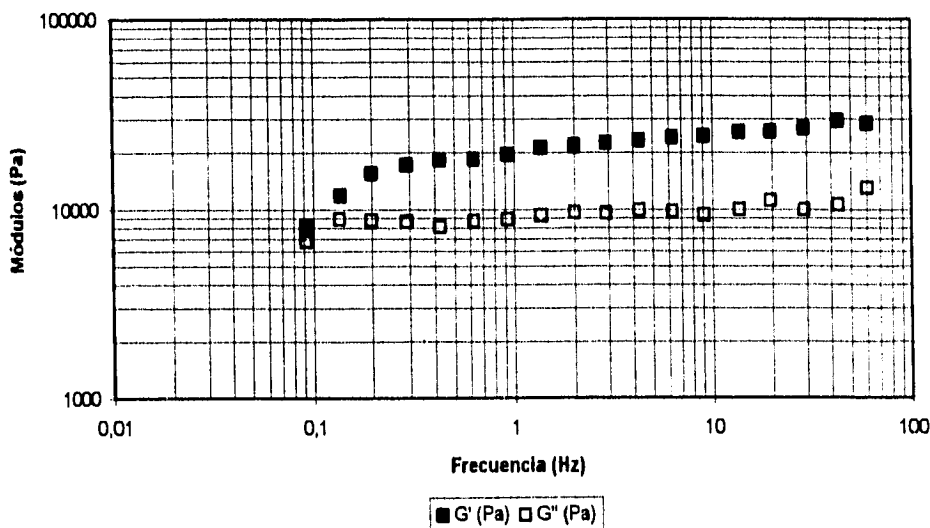


4.5.2 Reología de los geles de alginato

La caracterización reológica de los geles de alginato sirve para evaluar la resistencia mecánica del alginato de calcio, ya que el material está sujeto a esfuerzos de corte al operar en columna empacada. La estabilidad mecánica del material depende de varios factores importante tales como pH, temperatura, concentración de soluciones electrolíticas y carga celular. La caracterización de geles elaborados con 4, 3 y 2% de alginato, se llevó a cabo para estudiar su comportamiento viscoelástico.

La figura 41 se muestra la reología de cizallamiento oscilatorio del gel de alginato 3%, los valores de los módulos elástico (G') y viscoso (G'') están graficados contra la velocidad angular medida en Hertz. En la figura se puede apreciar que los valores del módulo G' se mantuvieron superiores a los valores de G'' . Los valores de ambos módulos son muy cercanos a una velocidad angular de 0.09 Hz, en este punto el comportamiento sólido-liquido es casi igual. A medida que aumenta la velocidad angular (valores mayores a 0.01 Hz), el comportamiento es cada vez más sólido y moderadamente líquido, porque el módulo G' aumenta de 10,000 a 12,000 Pa, y en general el módulo G'' se mantiene entre 9,000 y 10,000 Pa.

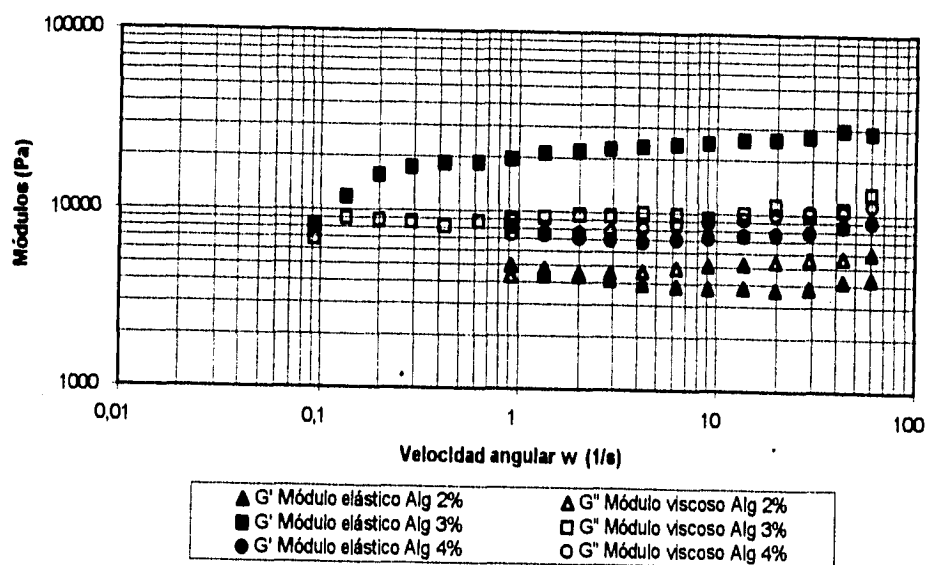
Figura 41 Reología de cizallamiento oscilatorio de gel de alginato 3% a $T=25^{\circ}\text{C}$



En la figura 42 se presentan las reologías de cizallamiento oscilatorio de los tres geles de alginato, se graficaron los módulos elástico (G') y viscoso (G'') en función de la velocidad angular. Se muestra que para el caso de los geles con 4 y 2% de alginato, el módulo viscoso presentó valores mayores a los del módulo elástico, caso contrario al gel elaborado con 3% de alginato. Se puede observar que el gel con 3% de alginato a velocidades angulares de 0,09 a 60 Hz, presentó un comportamiento sólido ya que los valores de G' fueron mayores a los de G'' , a menores valores de velocidad angular, G' y G'' son muy cercanos. En el caso del gel con 4% de alginato a velocidades angulares menores a 1,4 Hz aproximadamente, se observa un comportamiento sólido, *i.e.* G' mayor a G'' ; a velocidades angulares mayores a 1,4 Hz el comportamiento es líquido, *i.e.* valores de G'' mayores a los de G' . El gel con alginato al 2% presentó valores de G' mayores a los de G'' a velocidades angulares menores a 2 Hz (su comportamiento es sólido), y a partir de esta velocidad angular en adelante cambia el comportamiento de sólido a líquido porque aumentan los valores de G'' y disminuyen los valores de G' .

En general los valores de los módulos de almacenamiento G' y de pérdida de energía G'' de los geles elaborados con alginato al 2 y 4% son menores a los valores que presentó el gel con alginato al 3%, y el rango de velocidad angular como respuesta a la señal sinusoidal para los tres geles fue diferente. Mientras que el gel con 3% de alginato se trabajó en un rango de 0.09 a 60 Hz de velocidad angular, los otros geles se trabajaron dentro del rango de 9 a 60 Hz. Los puntos en los que el comportamiento elástico es igual al comportamiento viscoso se presentaron casi en la misma velocidad angular para el caso de los geles con alginato al 2 y al 4%. Este punto lo presenta el gel con alginato al 3% a una frecuencia mucho mayor. En el anexo B se presenta la caracterización reológica de los tres geles de alginato de sodio.

Figura 42 Reología de cizallamiento oscilatorio de geles de alginato a $T=25^{\circ}\text{C}$



Durante la medición de los módulos G' (elástico) y G'' (viscoso) de los geles se presentaron algunas dificultades técnicas en el momento de medir por triplicado cada una de las determinaciones. Los resultados variaron bastante para cada determinación de un mismo gel, como ya se mencionó antes, el alginato forma un gel heterogéneo debido a la difusión de los iones calcio a través de él. En el momento de rebajar el cilindro en hojas de 1 mm y tomar tres de éstas, cada una contiene diferente concentración de calcio lo que hace que varíen los resultados; ya que entre más iones calcio contenga la rodaja, su comportamiento será más sólido y menos líquido. Otro factor importante es determinar el tiempo durante el cual es curtido el gel, un mayor o menor contenido de iones calcio, dependerán del tiempo de exposición del gel en la solución de cloruro de calcio.

Los resultados que aquí se presentan son algunas de las pruebas preliminares que se realizaron, y ayudan a comprender este tipo de evaluación mecánica. Este trabajo ayudó a montar la metodología para este tipo de caracterización, pero hay mucho por hacer por ejemplo, evaluar el efecto de la concentración de otros iones presentes en el gel sobre la resistencia del material; algunos autores (Baré *et al.*, 1994) mencionan que al curtir las esferas de alginato por una hora en una solución de cloruro de calcio 1%, y sumergirlas en una solución de cloruro de bario 0.8% durante 5 minutos adquieren mayor dureza sin dañar las células. El efecto de la carga celular en el estudio de diferentes relaciones alginato/células, sería importante estudiarlo para poder encontrar la relación óptima, que pueda operar de la mejor manera en una columna empacada. El efecto del pH, y de la temperatura también sería importante e interesante estudiarlo.

4.6 Biodegradación de fenol y clorofenoles

4.6.1 Empleo de células libres

Los resultados de la biodegradación de los compuestos tóxicos por las células libres se muestran en la tabla 30. Las células libres fueron capaces de degradar altas concentraciones de fenol, hasta 1000 mg/L. La biodegradabilidad del 2-clorofenol y del 2,4-diclorofenol fue menor que para el fenol y mayor que para el 2,4,6-triclorofenol, las células fueron capaces de degradar una concentración de 10 mg/L de cada compuesto tóxico, sin embargo, no fueron capaces de degradar una concentración mayor (50 mg/L). La biodegradabilidad del 2,4,6-triclorofenol fue la menor de todas, las células fueron capaces de degradar 1 mg/L, su capacidad de degradar concentraciones mayores (10 y 50 mg/L) fue inhibida. Los resultados muestran que los compuestos clorados tienen un alto nivel de toxicidad hacia las células libres. Las células libres son capaces de biodegradar altas concentraciones de fenol.

A continuación se presenta en la misma tabla, las concentraciones de fenol y de clorofenoles degradadas por las células libres y las concentraciones que han podido ser degradadas por las células inmovilizadas en este trabajo.

Tabla 30 Pruebas de biodegradación con *P. fluorescens* libres e inmovilizadas

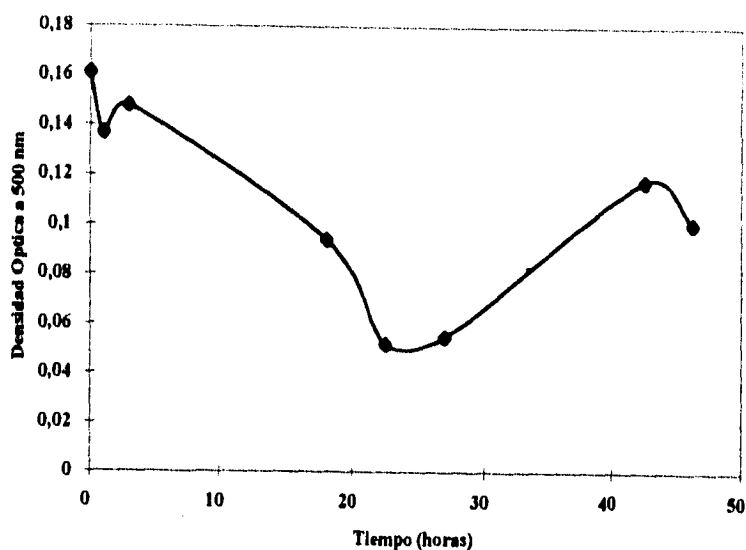
Compuesto	Concentraciones biodegradadas (mg/L)								
	1	10	50	100	200	400	500	700	1000
Fenol	SI	SI	SI	SI	SI	N.E.	SI	N.E.	SI SI a
2-clorofenol	SI	SI	NO	N.E.	N.E.	N.E.	N.E. SI a	N.E.	N.E.
2,4-diclorofenol	SI	SI	NO	N.E.	N.E.	N.E. SI a	N.E.	N.E. SI a	N.E.
2,4,6-triclorofenol	SI	NO	NO	N.E. SI a	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

Nota: SI = Prueba exitosa, NO = Biodegradación negativa, N.E. = no evaluada, a = Llevada a cabo por células inmovilizadas.

4.6.2 Uso de las células inmovilizadas

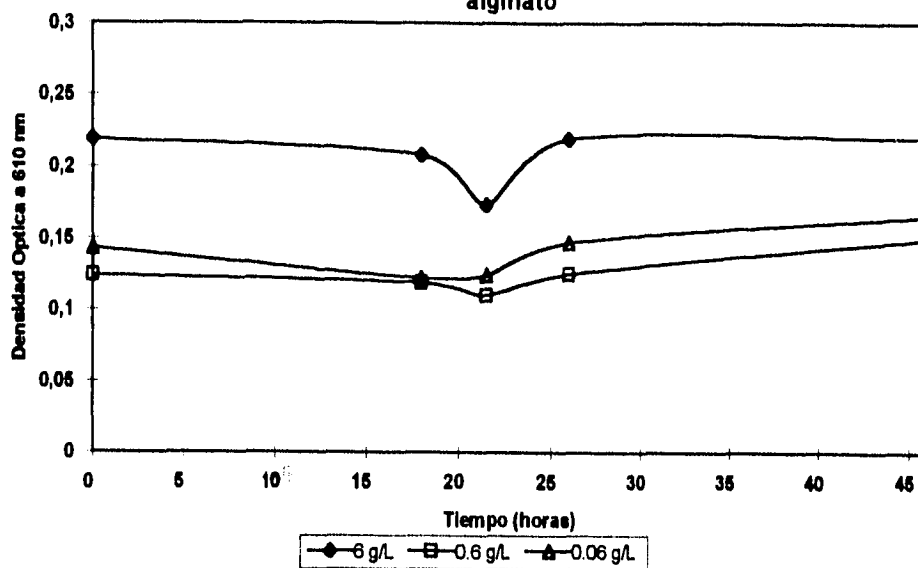
Las esferas elaboradas con la mezcla de alginato 2.54% y *P. fluorescens* 18.77%, se emplearon para la biodegradación de 100 mg/L de fenol en un matraz que contenía 100 mL de medio Dapaah, a 35 °C en agitación a 2,000 r.p.m.

En la figura 43 se muestra la cinética de biodegradación de esta experiencia, se observa que alrededor de las 27 horas pareciera que la concentración de fenol aumenta, ya que la densidad óptica obtenida a partir de este punto fue mayor. La explicación a este fenómeno es que la densidad óptica se incrementó debido a que el catalizador se disolvió. Las esferas, al ser agitadas se sujetan a un esfuerzo cortante que provoca su desintegración. Adicionalmente la presencia de iones Na^+ y K^+ provoca su dilución en agua.

Figura 43 Biodegradación de 100 mg/L de fenol en medio Dapaah a nivel matraz, 35°C

Con el fin de analizar lo anterior, se colocó igual cantidad de esferas en cada uno de tres matraces con medio Dapaah, a cada uno de ellos se le adicionó diferente concentración de calcio, 6, 0.6 y 0.06 g/L. La figura 44 muestra las densidades ópticas leídas a 610 nm con respecto al tiempo en que se dejaron agitando a 2,000 r.p.m. a 35°C; como se puede ver, alrededor de las 22 horas disminuyeron las densidades ópticas (probablemente se debe al intercambio de los iones calcio del medio Dapaah hacia las esferas). El peso de las esferas antes y después de esta experiencia fue casi el mismo para cada matraz, (de 5 a 6 gramos), por lo que la cantidad de peso perdida estuvo dentro del rango de miligramos. Las densidades ópticas a partir de la hora 22 aumentaron muy ligeramente, tal vez porque la disolución de las esferas fue muy pequeña. Los perfiles de las variaciones de las densidades ópticas en los tres casos son similares. Al emplear un 10% de calcio en el medio mínimo, las densidades ópticas al inicio y al final fueron casi iguales, por lo que es recomendable la adición de calcio al medio para mantener mejor el biocatalizador.

Figura 44 Efecto de la concentración de calcio del medio Dapaah sobre las esferas de alginato

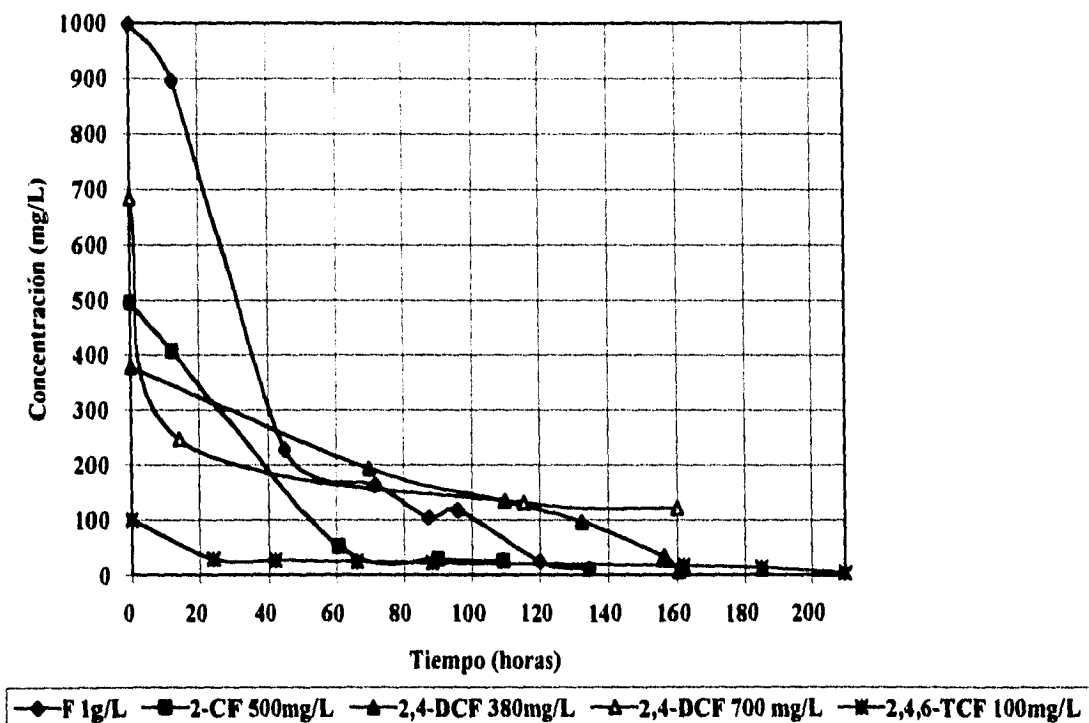


Se realizó la biodegradación de fenol y los tres clorofenoles empleando el biocatalizador de alginato de calcio con una carga celular inicial de $2,8 \times 10^8$ UFC/g_{cat}. Se empacó la columna como se describió en materiales y métodos y se operó por lotes, a temperatura ambiente no controlada. Se realizó la biodegradación de 1000 mg/L de fenol, 500 mg/L de 2-clorofenol, para el 2,4-diclorofenol se trabajaron dos concentraciones de 380 y 700 mg/L y el 2,4,6-triclorofenol realizó la biodegradación de 100 mg/L.

En la figura 45 se presentan las cinéticas de biodegradación donde se puede apreciar cómo disminuyó la concentración de cada uno de los tóxicos con respecto al tiempo de biodegradación.

El porcentaje de biodegradación en todos los casos fue mayor al 95%. Este porcentaje se fijó para poder comparar los tiempos de biodegradación. Mientras que para la biodegradación de fenol a la columna le tomó 120 horas, el 2,4-diclorofenol le llevó más de 150 horas, el 2-clorofenol tomó alrededor de 110 horas y el mayor tiempo empleado en la biodegradación fue para el 2,4,6-triclorofenol, el cual empleó más de 200 horas.

Figura 45 Cinéticas de biodegradación de fenol y clorofenoles por *P. fluorescens* inmovilizadas T= 35°C



Es importante tomar en cuenta que las concentraciones de los tóxicos degradados son diferentes en cada caso. Por ejemplo mientras que la columna empleó 120 horas para biodegradar 1000 mg/L de fenol, se necesitaron más de 200 horas para biodegradar 100 mg/L de 2,4,6-triclorofenol, esto se debe al nivel de toxicidad que presenta el triclorofenol, causando un efecto inhibitor. En el anexo F se presentan los valores obtenidos en las cinéticas de biodegradación.

En la figura 46 se presentan los tiempos de biodegradación, las actividades volumétricas y los porcentajes de biodegradación de los compuestos tóxicos.

Las actividades graficadas se definen como:

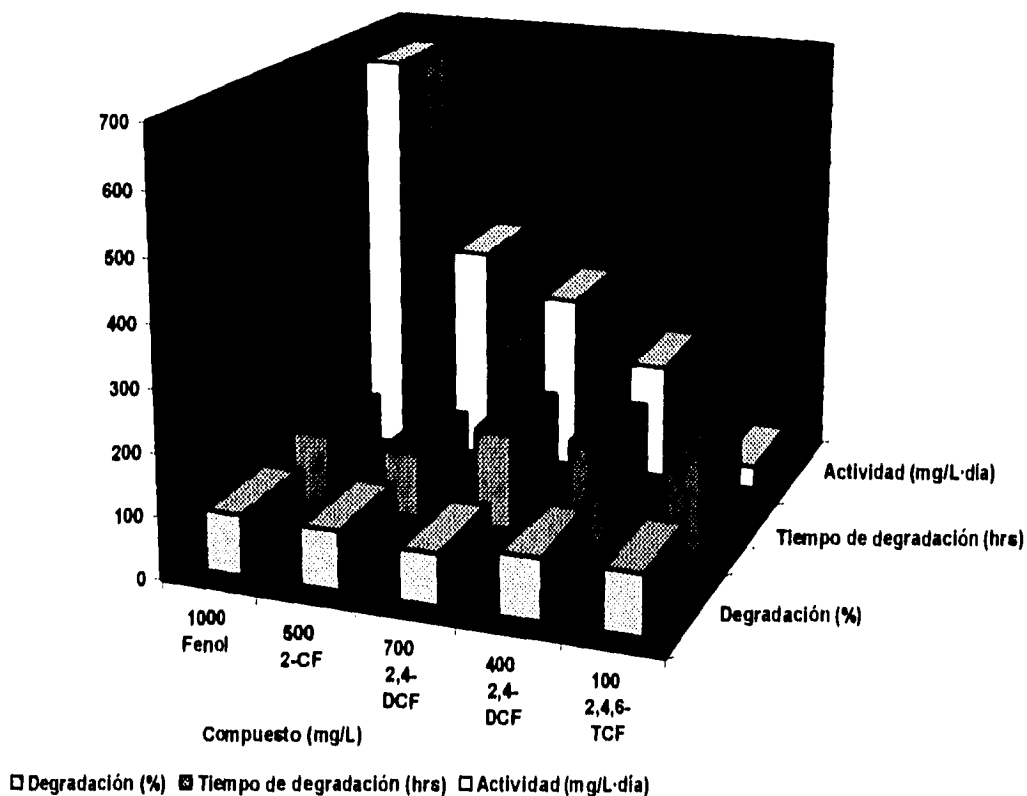
$$\text{Actividad volumétrica} = \text{mg de tóxico} / (\text{L} \cdot \text{día})$$

$$\text{Actividad másica} = \text{mg de tóxico} / (\text{kg}_{\text{cat}} \cdot \text{día})$$

$$\text{Actividad específica} = \text{mg de tóxico} / (\text{UFC} \cdot \text{día})$$

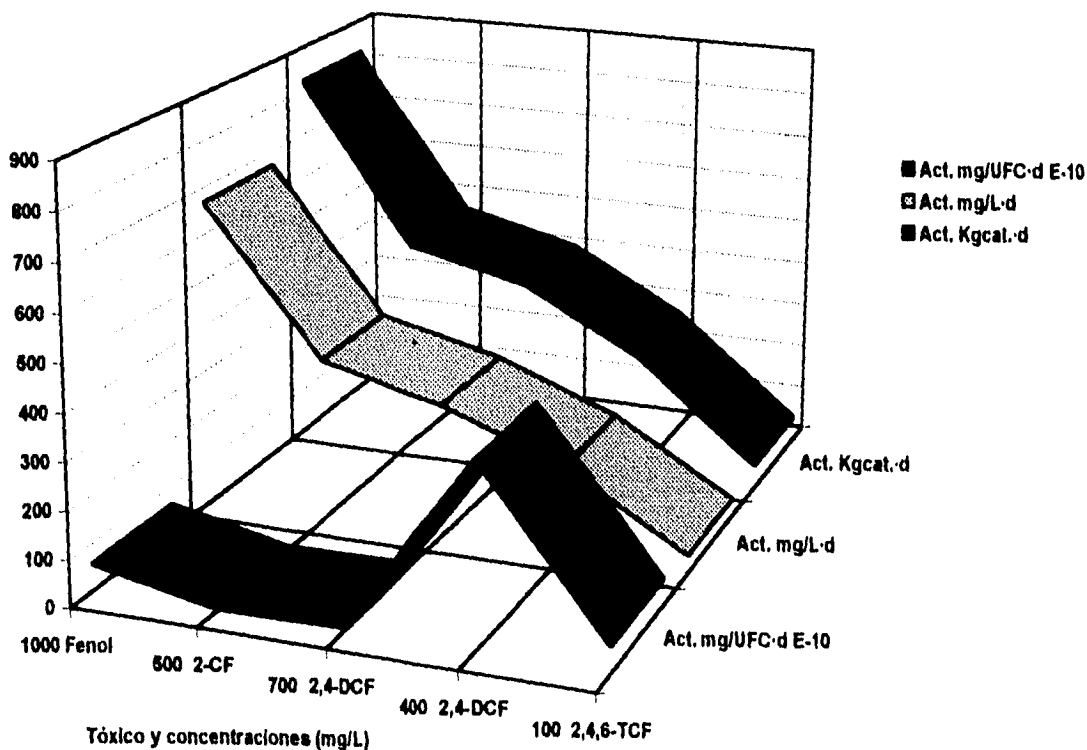
La actividad volumétrica se define como los miligramos del tóxico degradados por volumen de columna y por tiempo de operación. La actividad volumétrica decreció al disminuir la concentración de cada tóxico. Se aprecia que la mayor actividad volumétrica se presentó en la biodegradación de fenol y la menor en el 2,4,6-triclorofenol. Con respecto al cambio de las concentraciones (2,4-diclorofenol) se observó que la actividad volumétrica decreció al disminuir la concentración del tóxico.

Figura 46 Operación de la columna empacada con alginato de calcio a temperatura ambiente no controlada



La actividad másica son los miligramos del tóxico degradados por kilogramo de catalizador por tiempo de operación. La actividad específica son los miligramos del tóxico degradados por unidades formadoras de colonia por tiempo de operación. La actividad másica disminuyó considerablemente al terminar de degradar fenol, mientras que la actividad específica disminuyó moderadamente. La actividad másica permaneció casi constante al terminar de degradar el 2-clorofenol, mientras que la actividad específica aumentó ligeramente. La actividad másica disminuyó moderadamente al terminar de biodegradar 2,4-diclorofenol (700 mg/L) mientras que la actividad específica incrementó considerablemente. Al degradar 2,4-diclorofenol (400 mg/L) y 2,4,6-triclorofenol las actividades másica y específica disminuyeron notablemente. Con respecto al cambio de concentraciones (2,4-diclorofenol) la actividad másica decreció al disminuir la concentración del tóxico y el nivel de toxicidad fue menor para las células alcanzándose una alta actividad específica. El nivel de toxicidad fue muy alto para las células al degradar 2,4,6-triclorofenol (ver figura 47).

Figura 47 Actividades del catalizador de alginato



Se calcularon las unidades formadoras de colonia por gramos de soporte, antes y después de la biodegradación de cada tóxico y el promedio de ellas se graficó en la figura 48, aquí se puede ver cómo varió la actividad celular al cambiar de tóxico y de su concentración. Al degradar fenol la actividad fue de 1.41×10^8 UFC/g_{cat}, al cambiar a 2.clorofenol la actividad aumenta a 1.41×10^9 UFC/g_{cat}. Al degradar 2,4-diclorofenol (700 mg/L) la actividad disminuye a 5.64×10^8 UFC/g_{cat}. Cuando se disminuye la concentración de 2,4-diclorofenol (400 mg/L), la actividad decrece a 6.9×10^6 UFC/g_{cat}. Finalmente, al cambiar a 2,4,6-triclorofenol casi se mantiene constante 9.6×10^6 UFC/g_{cat}. Es interesante observar que a mayor número de cloros sustituyentes en la molécula de fenol las actividades decrecen.

En la tabla 31 se resume los resultados obtenidos de la biodegradación de los compuestos en la columna:

Figura 48 Actividad promedio (Unidades Formadoras de Colonia / g soporte) del catalizador de alginato

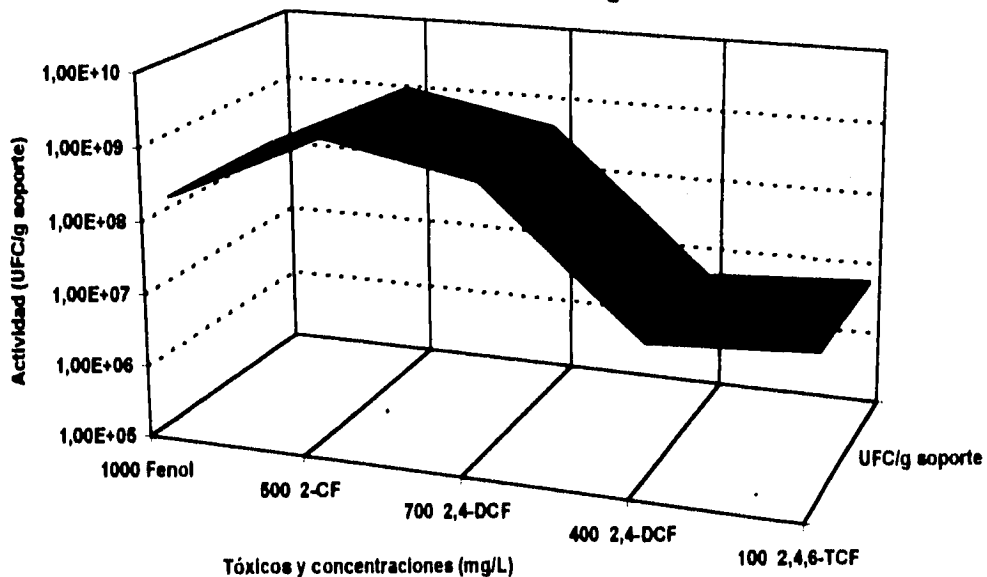


Tabla 31 Experiencias de la biodegradación de los clorofenoles en la columna

Toxico	C ₀ (mg/L)	Peso en la columna (g)	UFC/g _{sol} x 10 ⁵ antes de la biodegradación	UFC/g _{sol} x 10 ⁶ después de la biodegradación	UFC/g _{sol} x 10 ⁶ promedio	Conversión (%)	Tiempo de operación (horas)	Actividad volumétrica (mg/L·día)	Actividad másica (mg/kg _{sol} ·día)	Actividad específica (mg/UFC·día) x 10 ⁻¹⁰
Fenol	1000	23.65	2800	2.84	141	98	120	669.2	823.4	58.4
2-clorofenol	500	22.11	28.4	280	1410	95	109	354.9	467.1	3.31
2,4- diclorofenol	700	10.79	2800	849	564	82	160	289.5	405.2	7.18
2,4- diclorofenol	400	10.79	8.9	13	6.9	98	160.5	190.7	267.0	3.86
2,4,6- triclorofenol	100	10.79	130	6.3	9.6	97	210	37.9	53.1	55.3

La biodegradación de 1000 mg/L de fenol por *P.fluorescens* fue llevada a cabo exitosamente tanto por células inmovilizadas como por células libres. En el caso del 2-clorofenol sólo se biodegradó una concentración de 10 mg/L por células libres mientras que las células inmovilizadas se degradó una concentración de 500 mg/L. Las células inmovilizadas degradaron concentraciones de 400 mg/L y 700 mg/L de 2,4-diclorofenol mientras que las células libres biodegradaron una concentración de 10 mg/L. La concentración de 2,4,6-triclorofenol que solo pudo ser biodegradado por las células libres fue de 1 mg/L, mientras que cuando se inmovilizan las células puede alcanzarse a biodegradar una concentración 100 mg/L.

Esto demuestra que a pesar de lo tóxico que pueden resultar los compuestos a las células, concentraciones muy pequeñas pueden ser biodegradados por ellas, pero exitosamente pueden alcanzar a biodegradar cantidades mucho mayores al inmovilizarlas en alginato de calcio, por la protección que la matriz les confiere contra el efecto inhibitor de estos compuestos.

5. Conclusiones

El sistema de inmovilización por atrapamiento de microorganismos en alginato de calcio es una buena alternativa para la eliminación de tóxicos a altas concentraciones, por las ventajas que ofrece sobre los sistemas de tratamiento convencionales. En la elaboración del biocatalizador de alginato de calcio:

Se identificaron las condiciones necesarias para el cultivo de las células de *Pseudomonas fluorescens* en matraces de 250 mL y en fermentador de 5L (Volumen de operación 3.5 L).

A nivel matraz:

- a) En medio YPG se obtiene el mayor crecimiento celular, poco antes de las 24 horas.
- b) Se encontró que el Fe^{2+} y el Cu^{2+} son cationes activadores de la producción de sideróforo y de polímero, y que la presencia de polímero influyó en la viscosidad del medio.
- c) Al realizar el crecimiento de la cepa en distintos medios: (concentrado, diluido, adicionado con Cu y adicionado con Fe), el mayor crecimiento obtenido fue para el medio YPG con Fe con una mayor cantidad de polímero, el cual es indeseable.
- d) Se recomienda emplear YPG adicionado con cobre porque produce la menor viscosidad con una mayor concentración celular.

A nivel fermentador:

- a) Se pudo llevar a cabo el crecimiento a temperatura ambiente (30°C), hasta por 48 horas sin que se presente producción de polímero o sideróforo. En este punto se obtuvieron hasta 1.48×10^{30} UFC/mL.
- b) La velocidad de agitación mayor y la temperatura ambiente (no controlada) favorecieron una mayor concentración celular en menos tiempo. La D.O. del cultivo se triplicó hacia la hora 20, sin que hubiese presencia de polímero o sideróforo.

En cuanto al cultivo de la cepa en dos medios mínimos con distintas cantidades de sales de fosfatos, no se observó un efecto importante sobre su crecimiento:

- a) Se encontró que el medio Dapaah es el más apropiado por contener menos cantidad de fosfatos, lo que implica que el biocatalizador tenga una mejor estabilidad química al ser puesto en contacto con el medio.
- b) Se obtiene un ahorro de estas sales, lo que tiene una repercusión económica.
- c) La adición de un 10% de calcio al medio mínimo favorece el crecimiento celular y ayuda a la estabilidad del gel de alginato.

La separación de la biomasa se obtuvo a una velocidad de centrifugación de 8,000 r.p.m.

En cuanto a la elaboración del biocatalizador:

- a) El tamaño es una función directa de la presión de aire empleada y de la concentración de alginato.
- b) La carga celular, la velocidad de alimentación y la altura de adición de la mezcla no influyeron sobre la distribución de tamaño de partícula.
- c) La altura modifica la esfericidad de las partículas, y ya que la operación es independiente de la velocidad de alimentación, se puede trabajar con altas velocidades de alimentación de la mezcla.
- d) Se establecieron las condiciones de operación para la elaboración del biocatalizador para obtener un tamaño de partícula de entre 1.13 y 1.41 μm .

En la caracterización fisicoquímica del biocatalizador se encontró que:

- a) La densidad real es independiente de la relación alginato/células (*S. Cerevisiae* o *P. fluorescens*) en el catalizador.
- b) La densidad aparente se modifica con la carga celular de las esferas y con el tamaño de partícula de manera proporcional.
- c) A partir de las diferentes proporciones de células en el biocatalizador (4-20%) y alginato (1.5-2.7%) se encontró que hasta un contenido máximo de células del 16%, el catalizador presenta una consistencia adecuada.

- d) La fracción vacía no es un efecto directo del tamaño y de la concentración de alginato en el catalizador, pero sí es una relación inversamente proporcional a la relación alginato/células.
- e) El contenido de humedad total en el catalizador resultó ser una función directa de la concentración de alginato y de la relación alginato/células.
- f) Las esferas de alginato de calcio presentaron una adsorción significativa de fenol y clorofenoles (13 - 40%).
- g) La capacidad de atrapamiento celular fue muy buena: 3.85×10^{14} UFC/g_{soporte}.
- h) La cantidad de calcio requerida para la gelificación del alginato es una función de la concentración del alginato mismo, lo que pone en evidencia la problemática de la difusión del calcio en el gel de alginato de calcio.

A partir de la caracterización reológica de las soluciones de alginato antes y después de tratamiento térmico, así como de las soluciones con células, se generaron las curvas de flujo, en las que se presenta un comportamiento pseudoplástico y viscoso.

Los geles de alginato de calcio presentaron diferentes comportamientos sólido-líquido en la reometría de cizallamiento oscilatorio, al determinar los módulos de almacenamiento G' y de pérdida G'' , debido a que alginato de calcio forma un gel heterogéneo por la difusión del calcio en él.

De los resultados obtenidos en la biodegradación de los compuestos tóxicos se concluye que:

- a) La columna empacada con alginato de calcio inoculado con *P. fluorescens* fue capaz de eliminar más del 95% de fenol y los tres clorofenoles, en concentraciones de 100 a 1000 mg/L con actividades volumétricas de hasta 700 mg_{fenol}/L·d.
- b) Las actividades estuvieron influidas por la carga celular. La actividad fue directamente proporcional a la concentración del tóxico evaluado.
- c) Las concentraciones biodegradadas de los tóxicos por el biocatalizador de alginato de calcio con *P. fluorescens* fueron significativamente superiores a las concentraciones biodegradadas por las células libres.

Recomendaciones:

- a) Continuar con experiencias de fermentación con el fin de escalar el proceso, evaluando el efecto de la velocidad de agitación, pH, temperatura, aireación, etc.

- b) Llevar a cabo la caracterización reológica del gel de alginato de calcio con diferentes relaciones de alginato/células, y estudiar el efecto de la presencia de otros iones (como el bario) y otros factores como la temperatura, el pH, etc. Es importante recordar que la composición química y la estructura de bloques de gulurónico y manurónico influyen en la fuerza mecánica del gel de alginato.

- c) Evaluar los efectos difusionales internos y externos del biocatalizador.

6. Bibliografía

- Adlercreutz P., Holz O. y Mattiasson B. (1982) Oxygen supply to immobilized cells:
2. Studies on a coimmobilized algae-bacteria preparation with in situ oxygen generation.
Enzyme Microbiology Technology. 4 : 395-400.
- Almemark M., Finnveden G. y Frostell B. (1991) Treatment technologies for
organochlorine-containing sludges and concentrates from external treatment of pulp and
paper wastewaters. **Water Science Technology** 24 (3/4) : 319-329.
- Amihay F. y Dror Y. (1994) Immobilization of "distinguished" Yeast in Chemically
Crosslinked Chitosan Beads. **Biotechnology and Bioengineering**. 44 : 1083-1188.
- Anselmo A.M., Mateus M., Cabral J.M.S. y Novais J.M. (1985) Degradation of phenol by
immobilized cells of *Fusarium flocciferum*. **Biotechnology Letters**. 7 (12) : 889-894.
- APHA, AWWA, WPCF (1989) Standar Methods for the examination of water and
wastewater. 17va. edición, Wahington, D. C. U.S.A.
- Atkins E. D. T., Mackie W. y Smolko E. E. (1970) Cristalline structure of alginic acids.
Nature (London) 225 : 626-628.
- Atkins E. D. T., Mackie W., Parker K. D. y Smolko E. E. (1971) Crystalline structure of
poly-D-manuronic and poly-L-guluronic acids. **Journal of Polymer Science. Part B:
Polymer Letters**. 9 : 311-316.
- Baré G., Delaunois V., Rikir R. y Thonart Ph. (1994) Bioconversion of vanillin into vanillic
acid by *Pseudomonas fluorescens* Strain BTP9. **Applied Biochemistry and
Biotechnology**. 45/46 : 599-610.
- Battersby N. S. y Wilson V. (1989) Survey of the anaerobic biodegradation potencial of
organic chemicals in digesting sludge. **Applied Environmental Microbiology**. 55 (2) :
433-439.
- Becker J. M., Caldwell G. A., Zachgo E. A. (1990) Protein Assays. **Biotechnology
Laboratory Course**. Academic Press Incorporation. San Diego, California. 115-119.
- Bettmann H. y Rehm H. J. (1984) Degradation of phenol by polymer entrapped
microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 20 : 285-290.
- Bettman H. y Rehm H. J. (1985) Continuous degradation of phenol(s) by *Pseudomonas
putida* P8 entrapped in polyacrylamide-hydrazide. **Applied Microbiology and
Biotechnology**. 22 : 389-393.

- Boross L., Papp P. y Szajani B. (1990) Determination of the Growth of Gel-Entrapped Microbial Cells at various depths of the Alginate Gel. *Physiology of Immobilized Cells. Proceedings of an International Symposium Held at Wageningen, The Netherlands.*
- Brito E. (1988) Reología de fluidos, Ley de potencia (software), Departamento de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.
- Buchholz K. (1979) Characterization of Immobilized Biocatalists. Ed. DECHEMA Frankfurt, Alemania. 84 : 73-94.
- Busto M. D., Ortega N. y Pérez M. (1995) Studies on Microbial β -D-Glucosidase Immobilized in Alginate Gel Beads. *Process Biochemistry*. 30 (5) : 421-426.
- Cabello M. (1995) Biodegradación aerobia de fenol y clorofenoles por medio de *Pseudomonas*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- CEPIS (1988) Manual de evaluación de manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales. Sección 1 : 1.6-1.13.
- Chapman V. J. (1970) *Seaweeds and Their Uses*. 2da. Edición. Methuen & Co., London.
- Cheetham P.S.J., Blunt K.M. y Bucke C. (1979) Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium Alginate Gels. *Cell Immobilization in Alginate Gels. Biotechnology and Bioengineering*. 21 : 2155-2168.
- Cheetham P.S.J. y Bucke C. (1984) Immobilisation of Microbial Cells and Their use in Waste Water Treatment. *Microbiological Methods for Environmental Biotechnology*. 219-234.
- Chevalier P. y de la Noüe J. (1985) Efficiency of Immobilized Hyperconcentrated Algae for Ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. *Biotechnology Letters*. 7 (6) : 395-400.
- Chevalier P. y de la Noüe J. (1995) Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microbiology Technology*. 7 : 621-624.
- Chevalier P. y de la Noüe J. (1986) Behaviour of co-immobilized microalgae and bacteria: growth and amylase production. *International Symposium "Food and Biotechnology"*. 187-191.
- Chevalier P. y de la Noüe J. (1987) Enhancement of α -amylase production by immobilized *Bacillus subtilis* in an airlift fermenter. *Enzyme Microbiology Technology*. 9 : 53-56.

- Chevalier P. y de la Noüe J. (1988) Behavior of algae and bacteria co-immobilized in carrageenan, in a fluidized bed. **Enzyme Microbiology Technology**. 10 : 19-23.
- Dapaah S. y Hill G. A. (1992) Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomona putida*. **Biotechnology and Bioengineering**. 40 (11) : 1353-1358.
- Diamadopoulos E., Samaras P. y Sakellaropoulos G. P. (1992) The effect of activated carbon properties on the adsorption of toxic substances. **Water Science Technology**. 25 (1) : 153-160.
- Eckenfelder W. W. (1991) Strategies for toxicity reduction in industrial wastewaters. **Water Science Technology**. 24 (7) : 185-193.
- Ehrhard H. M. y Rehm H. J. (1989) Semicontinuous and continuous degradation of phenol by *Pseudomona putida* P8 adsorbed on activated carbon. **Applied Microbiology Biotechnology**. 30 : 312 - 317.
- Fujiyama S., Yokota T. y Koga K. (1988) Immobilization of beta-glucosidase in calcium alginate gel using genipin as a new type of cross-linking reagent of natural origin. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 28 : 440-441.
- García M. J. del R. (1992) Contaminantes tóxicos prioritarios en agua. **Universidad Autónoma de Chapingo** 12-16, 211-232.
- Graham H. D. (1971) Microdetermination of Keltrol (xanthan gum). **Journal of Dairy Science**. 54 : 1162-1628.
- Grant G. T., Morris E. R., Rees D. A., Smith P. J. C. y Thom D. (1973) Biological interactions in polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**. 32 : 195-198.
- Hannah S., Austern B., Eralp A. y Wise R. (1986) Comparative removal of toxic pollutants by six wastewater treatment processes. **Journal WPCF** 68 (1) : 27-34.
- Haug A. (1964) Composition and Properties of Alginates. **Rep. Norw. Inst. Seaweed Res.** 30 : 25-45.
- Hendriksen H. V., Larsen S. y Ahring B. K (1991) Anaerobic degradation of Pentachlorophenol and phenol in fixed-film reactors : the influence of an additional substrate. **Water Science Technology**. 24 (3/4) : 431-436.
- Hertzberg S., Kvittingen L., Anthonsen T. y Skjak-Braek G. (1992) Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in a two-phase liquid system: Application in lipase-catalysed reactions. **Enzyme Microbiology Technology**. 14 : 42-47.

- Hiemstra H., Dijkhuizen L. y Harder W. (1983) Diffusion of oxygen in alginate gels related to the kinetics of methanol oxidation by immobilized *Hansenula polymorpha* cells. **Eur. Journal of Applied Microbiology Biotechnology**. 18 : 189-196.
- Jang L.K. (1994) Diffusivity of Cu²⁺ in Calcium Alginate Gel Beads. **Biotechnology and Bioengineering**. 43 : 183-185.
- Jang L.K. (1994) Diffusivity of Cu²⁺ in Calcium Alginate Gel Beads. **Biotechnology, and Bioengineering**. 43 : 183-185.
- Jang L.K., Nguyen D. y Greese G.C. (1995) Effect of pH on the absorption of Cu (II) by alginate gel. **Wat. Res.** 29 (1) : 315-321.
- Jatinder K., Bewtra y Biswas N. (1990) Biological process in toxic waste treatment. En: **Wastewater Treatment by Immobilized Cells**. Tyagi R. D., y Vembu. K. CRC Press, U.S.A. 8 : 191-222.
- Jiménez B. y Ramos J. (1995) Estudio de la disponibilidad de agua en México en función del uso, calidad y cantidad. Informe final proyecto 3320. **Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México**.
- Karel S., Libickis S. y Robertson C. (1985) The immobilization of whole cells : engineering principles. **Chemical Engineering Science**. 40 (8) : 1321-1354.
- Karel S., Salmon P., Stewart P. y Robertson C. (1990) Reaction and diffusion in immobilized cells : fact and fantasy. En : **Physiology of Immobilized Cells**. Bont J., J. Visser, B. Mattiasson y J. Tramper (Editors). Elsevier Science Publishers. B. V., Amsterdam 115-125.
- Kelco. Division of Merck & Co. Inc. **Alginate Products for scientific water control**.
- Kennedy A. F. D. y Sutherland I. W. (1987) Analysis of bacterial exopolysaccharides. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 9 : 12-19.
- Keweloh H., Heipieper H.J. y Rehm H.J. (1989) Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 31:383-389.
- Keweloh H., H. J. Heipieper y H. J. Rehm (1990) **Physiology of Immobilized Cells**. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. The Netherlands.
- Kidambi S. P., Sundin G. W., Palmer D. A., Chakrabarty A. M. y Bender C. L. (1995) Copper as Signal for alginate synthesis in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**. 61 (6) : 2172-2179.

- Kim J. H., Oh D. K., Park S. H. y Wallis D. A. (1986) Production of penicillin in a fluidized bed bioreactor using a carrier-supported mycelial growth. **Biotechnology and Bioengineering**. **28** : 1838-1844.
- Klein J. y Ziehr H. (1990) Immobilization of microbial cells by adsorption. **Journal of Biotechnology** **16** : 1-16.
- Lee C. M., Lu C. J. y Chuang M. S. (1994) Effects of immobilized cells on the biodegradation of chlorinated phenols. **Water Science Technology**. **30** (9) : 87-90.
- Loyde A. (1993) Elaboración de un biocatalizador con células de levadura de *Kluyveromyces fragilis* con actividad de β -galactosidasa utilizando como soporte kappa-carragenina. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Marcipar A., Cochet N., Brackenridge L. y Lebault J. M. (1980) Immobilization of yeast on ceramic supports. **Biotechnology Letters**. **1** : 65-70.
- Martinsen A., Skjåk-Braek G. y Smidsrod O. (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlation between Chemical and Physical Properties of alginate gel beads. **Biotechnology and Bioengineering**. **33** : 79-89.
- Martinsen A., Storro I. y Skjåk-Braek G. (1992) Alginate as Immobilization Material. III Diffusional Properties **Biotechnology and Bioengineering**. **39** : 186-194.
- Marwaha S.S., Kennedy J. K., Khanna P. K., Tewariy H. K. y Redhu A. (1990) Comparative Investigations on the physiological parameters of free and immobilized yeast cells for effective treatment of dairy effluents. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Moo-Young M., Lamprey J. y Robinson C. W. (1980) Immobilization of cells by adhesion on various supports for ethanol production. **Biotechnology Letters**. **2** : 541-548.
- Mörsen A. y Rehm H. J. (1990) Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass. **Applied Microbiology Biotechnology**. **33** : 306-312.
- Mozes N. y Rouxhet P. C. (1987) Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. **Journal Microbiology Methods**. **6** : 99-112.
- Messing R. A. y Opermann R. A. (1979) Pore dimensions for accumulating biomass I. Microbes that reproduce by fission or budding. **Biotechnology and Bioengineering**. **21** : 49-58.

- Messing R. A. (1982) Immobilized microbes and a high rate, continuous waste process for the production of high btu gas and the reduction of pollutants. **Biotechnology and Bioengineering**. 24 : 1115-1123.
- Mohn W. y Kennedy K. (1992) Limited degradation of chlorophenols by anaerobic sludges granules. **Applied Environmental Microbiology**. 58 (7) : 2131-2136.
- Morris E. R. (1986) Molecular interactions in Polysaccharides Gelation. **British Polymer Journal**. 18 (1) : 245-246.
- Nicell J. A., Bewtra J. K., Taylor K. E., Biswas N. y Pierre C. St. (1992) Enzyme catalysed polymerization and precipitation of aromatic compounds from wastewaters. **Water Science Technology** 25 (3) : 157-164.
- Ospina S. (1992) Characterization and Use of a Penicillin Acylase Biocatalyst. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 53 : 205-214.
- Oyaas J., Storro I., Svendsen H. y Levine D. W. (1995) The Effective Diffusion Coefficient and the Distribution Constant for Small Molecules in Calcium-Alginate Gel Beads. **Biotechnology. and Bioengineering**. 47 : 492-500.
- Perry R. H. y Green W. (1984) Perry's Chemical Handbook. 6a. edición. Mc Graw-Hill. 5-53, 20-4, 20-9, 20-10.
- Pringle H. J. y Fletcher M. (1986) Influence of substrate hydration and adsorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. **Applied Environmental Microbiology**. 51 : 1321-1325.
- Puhakka J. A., Melin E., Järvinen K., Tuhkanen T. y Shieh W. K. (1991) Oxidic fluidized-bed treatment of chlorophenols. **Water Science Technology**. 24 (3/4) : 171-177.
- Puhakka J. A., Shieh W. K. , Järvinen K. y Melin E. (1992) Chlorophenol degradation under oxidic and anoxic conditions. **Water Science Technology**. 25 (1) : 147-152.
- Quirasco M. C. (1994) Producción y caracterización de un biocatalizador con actividad glucosiltransferasa. UACP y PICCH, Tesis de maestría en biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
- Rees D. A. (1969) Structure conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. En: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Editado por M. L. Wolfrom y R. S. Tipson. Academic, New York 24 : 267-332.

- Rocherfort W. E., Rehg T. y Chau P. C. (1986) Trivalent cation stabilization of alginate gel for cell immobilization. **Biotechnology Letters**. 8 : 115-120.
- SEDESOL (1993) Normas Oficiales Mexicanas en Materia de Protección Ambiental. Diario Oficial de la Federación. México, 18 de octubre de 1993.
- Schlegel H. G. (1993) **General Microbiology**. Cambridge University Press. 17va. edición, Great Britain, England. 85-88, 111.
- Scott G. W. (1969) **Elementary Rheology**. Academic, New York.
- Scott C. D. (1987) Immobilized cells : a review of recent literature. **Enzyme Microbiology Technology**. 9 : 66-73.
- Shatwell K. P. y Shutherland I. W. (1991) Influence of the acetyl substituent on the interaction of xanthan with plant polysaccharides-II. Xanthan-guar gum systems. **Carbohydrate Polymers**. 14 : 115-130.
- Shigeaki F., Yokota T. and Koga K. (1988) Immobilization of β -glucosidase in calcium alginate gel using genipin as a new type of cross-linking reagent of natural origin. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 28 : 440-441.
- Skjak-Braek G. y Martinsen A. (1991) Applications of some algal polysaccharides in biotechnology. En: **Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential**. Guiry M. D. y G. Blonden. Editorial John Willey & Sons Ltd., England. 219-257.
- Smiksrod O. and Skjåk-Braek G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**. 8 (3) : 71-78.
- Stewart W. W. y Swaisgood H. E. (1993) Characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards. **Enzyme Microbiology Technology**. 15 : 922-927.
- Swedish Pulp and Paper Association (1982) **Environmentally Harmonized production of bleached pulps**. Final Report Stockolm.
- Torres L. G. (1994) Eliminación de fenol y clorofenoles en agua por medio de microorganismos inmovilizados. **Biotecnología** 4 (2) : 49-65.
- Tseng J. M. y Huang C. P. (1991) Removal of chlorophenols from water by photocatalytic oxidation. **Water Science Technology**. 23 : 377-387.
- Uotila J. (1993) Dehalogenases for polyhalogenated aromatic compounds in *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Mycobacterium fortuitu* G-2. Ph D. Tesis, Universidad de Helsinki, Finlandia.

- Van der Mei H. C., Leonard A. J., Weerkamp A. H., Rouxhet P. C. y Busscher H. J. (1988) Surface properties of *Streptococcus salivarius* HB and non fibrillar mutants: measurement of Zeta potential and elemental composition with X-ray photoelectron spectroscopy. **Journal of Bacteriology**. **170** : 2462-2466.
- Van Ginkel C.G., Tramper J., Luyben K. Ch. A. M. y Klapwijk A. (1983) Characterization of *Nitrosomonas europaea* immobilized in calcium alginate. **Enzyme Microbiology Technology**. **5** : 297-303.
- Westmeier F. y Rehm H.J. (1985) Biodegradation of 4-chlorophenol by entrapped *Alcaligenes sp.* A 7-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**. **22** : 301-305.
- Wiesmann R., Götz P. y Fachgebiet R. B. (1993) Measurement and modelling of oxygen transport into biotechnical immobilizates for cell entrapment. **Chemical Engineering Technology**. **65** : 1125.
- Wijffels, R.H., de Gooijer C. D., Kortekaas S. y Tramper J. (1991) Growth and Substrate Consumption of *Nitrobacter agilis* Cells Immobilized in Carrageenan : Part 2. Model Evaluation. **Biotechnology and Bioengineering**. **38** : 232-240.
- Wijffels R.H., England G., Hunik J. H., E. Leenen E. J. T. M., Bakketum A., Günther A., Obón de Castro J. M. y Tramper J. (1995) Effects and Diffusion Limitation on Immobilized Nitrifying Microorganisms at Low Temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**. **45** : 1-9.
- Wu W., Sikhoun y Delancey G.B. (1994) Diffusion of Acetophenone and Phenethyl Alcohol in the Calcium-Alginate-Bakers' Yeast-hexane System. **Biotechnology and Bioengineering**. **44** : 1217-1227.
- Young-xiang G., Zhong-Cheng H. y Korus R. A. (1994) Effects of adsorption on mass transfer in immobilization matrices. **The Chemical Engineering Journal**. **54** : B1-B8.
- Zache G. and Rehm H.J. (1989) Degradation of phenol by a coimmobilized entrapped mixed culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**. **30** : 426-432.
- Zitomer D. H. y Speece R. E. (1993) Sequential environments for enhanced biotransformation of aqueous contaminants. **Environmental Science Technology** **27** (2) : 227-244.

CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

TABLA A-1 CULTIVOS A NIVEL MATRAZ 250 mL, MEDIO YPG A T=35°C

CINÉTICA 1		CINÉTICA 2	
D.O. ^{610 nm}	tiempo (horas)	D.O. ^{610 nm}	tiempo (horas)
0.068	2.5	0.056	0
0.129	5	0.626	24.75
0.148	7.5	0.501	48
0.324	22.5	0.165	101.5
0.195	25		

TABLA A-2 CULTIVO A NIVEL FEMENTADOR 3.5 L TEMPERATURA A 30°C

Tiempo (horas)	D.O. total	D.O. sobrenadante	D.O. biomasa	Conductividad (μSiemens)	pH	Peso seco (g/L)	UFC/mL
0	0.034	0.018	0.016	4190	7.91	0	3.7 x 10 ¹¹
5	0.112	0.039	0.073	4960	7.85	0.106	
8	0.137	0.043	0.094	5100	7.80	0.235	
12	0.171	0.045	0.126	5040	7.78	0.412	
16	0.185	0.053	0.132	6140	7.84	0.484	
20	0.213	0.061	0.152	6300	7.90	0.629	
24	0.200	0.149	0.051	7130	8.01	0.562	7.6 x 10 ²⁴
28	0.177	0.040	0.137	6920	8.45	0.443	
44	0.190	0.020	0.170	7420	8.64	0.510	
48	0.209	0.051	0.158	8160	8.80	0.609	
52	0.223	0.052	0.171	8040	9.44	0.681	1.48x10 ³⁰

TABLA A-3 CULTIVO A NIVEL FEMENTADOR 3.5 L A TEMPERATURA AMBIENTE NO CONTROLADA

Tiempo (horas)	D.O. total	Conductividad (μSiemens)	pH	viscosidad (Pa·s)
0	0.040	2930	7.11	3.3
2.5	0.068	4650	6.96	2.9
17	0.611	4790	7.33	3.1
20	0.669	5380	6.99	3.6

TABLA A-4 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS

tiempo (horas)	D.O. YPG solo	D.O. YPG 1:10	D.O. YPG con Cu	D.O. YPG con Fe
0	0.006	0.005	0.007	0.006
4	0.009	0.009	0.014	0.011
8	0.135	0.041	0.098	0.025
24	0.522	0.127	0.657	0.425
28	0.526	0.116	0.710	0.485
32	0.428	0.103	0.748	0.533
48	0.542	0.081	0.356	0.700

TABLA A-5 CRECIMIENTO EN MEDIOS MÍNIMOS PARA *PSEUDOMONAS* Y DAPAAH

Tiempo (horas)	Medio <i>Pseudomonas</i> D.O.	Medio Dapaah D.O.
0	0.034	0.040
3	0.046	0.046
18	0.064	0.066
22	0.032	0.034
26	0.033	0.041

TABLA A-6 CRECIMIENTO EN MEDIO MÍNIMO DAPAAH CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO A 35°C

Tiempo (horas)	Medio con 6 g/L de Ca	Medio con 0.6 g/L de Ca	Medio con 0.06 g/L de Ca
0	0.052	0.037	0.040
16	0.108	0.086	0.085
20	0.178	0.118	0.104
24	0.158	0.119	0.114
45	0.084	0.033	0.029

**CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE
CRECIMIENTO DE *P. fluorescens***

TABLA B-1 CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DEL MEDIO YPG-SOLO

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
3.0	0.50	0.722968	0.008061	0.013437
6.0	1.30	1.445936	0.020959	0.012270
12.0	2.30	2.891872	0.037082	0.011204
30.0	4.20	7.229681	0.067715	0.009936
60.0	7.70	14.459362	0.124145	0.009073

**TABLA B-2 CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DEL MEDIO YPG ADICIONADO
CON Fe**

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
3.0	0.60	0.674751	0.009674	0.016940
6.0	1.50	1.349503	0.024184	0.016149
12.0	3.00	2.699006	0.048368	0.015395
30.0	6.20	6.747515	0.099961	0.014452
60.0	10.30	13.495029	0.166063	0.013777

**TABLA B-3 CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DEL MEDIO YPG ADICIONADO
CON Cu**

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
6.0	0.50	1.480922	0.008061	0.004713
12.0	0.70	2.961844	0.011286	0.004243
30.0	1.35	7.404609	0.021766	0.003692
60.0	3.70	14.809218	0.059654	0.003324

TABLA B-4 CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DEL MEDIO YPG DILUIDO 1:10

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
6.0	0.45	1.394822	0.007255	0.004091
12.0	0.50	2.789645	0.008061	0.003819
30.0	1.30	6.974111	0.020959	0.003487
60.0	3.40	13.948223	0.054817	0.003256

**CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LAS SOLUCIONES DE ALGINATO ANTES
DE LA ESTERILIZACIÓN**

TABLA B-5

Solución de alginato : 4%
aguja No. 4

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	1.40	0.070822	1.752855	22.914911
0.6	2.30	0.141643	2.879691	21.188830
1.5	5.10	0.354108	6.385401	19.104982
3.0	9.70	0.708216	12.144783	17.665886
6.0	18.70	1.416432	23.413138	16.335191
12.0	35.40	2.832865	44.322197	15.104732
30.0	77.50	7.082162	97.033059	13.619234

TABLA B-6

Solución de alginato : 3 %
aguja No. 4

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	0.70	0.070822	0.876428	9.395013
0.6	0.90	0.141643	1.126836	8.577496
1.5	1.90	0.354108	2.378875	7.604937
3.0	3.50	0.708216	4.382138	6.943185
6.0	7.10	1.416432	8.889480	6.339016
12.0	13.90	2.832865	17.403349	5.787420
30.0	31.80	7.082162	39.814855	5.131213
60.0	56.65	14.463634	70.928036	4.684715

TABLA B-7

Solución de alginato : 2 %
aguja No. 4

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
1.5	0.40	0.467425	0.500816	1.691039
3.0	0.60	0.934850	0.751224	1.347130
6.0	1.10	1.869701	1.377243	1.073162
12.0	2.40	3.739401	3.004895	0.854912
30.0	5.90	9.348503	7.387033	0.632978
60.0	11.30	18.697005	14.148046	0.504249

TABLA B-8

Solución de alginato : 1 %
aguja No. 1

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	1.00	0.065711	0.016123	0.214711
0.6	1.60	0.131421	0.025796	0.208263
1.5	3.60	0.328553	0.058042	0.200035
3.0	7.80	0.657106	0.125757	0.194928
6.0	15.40	1.314211	0.248289	0.188201
12.0	30.35	2.628423	0.489323	0.182549
30.0	74.50	6.571057	1.201139	0.175338

TABLA B-9

Solución de alginato : 0.5 %
aguja No. 1

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	0.50	0.074842	0.008061	0.066497
0.6	0.60	0.149684	0.009674	0.059490
1.5	0.75	0.374211	0.012092	0.051348
3.0	1.60	0.748421	0.025796	0.045937
6.0	3.20	1.496843	0.051593	0.036767
12.0	6.60	2.993685	0.106410	0.031735
30.0	16.90	7.484213	0.272473	0.031735
60.0	34.15	14.968426	0.550589	0.028391

**CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LAS SOLUCIONES DE ALGINATO
DESPUÉS DE LA ESTERILIZACIÓN**

TABLA B-10

Solución de alginato : 4%

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	0.50	0.080935	0.626020	4.835130
0.6	0.60	0.161871	0.751224	4.140284
1.5	0.75	0.404677	0.939030	3.372572
3.0	1.30	0.809354	1.627651	2.887907
6.0	2.50	1.618707	3.130099	2.472892
12.0	5.20	3.237414	6.510605	2.117518
30.0	12.90	8.093536	16.151309	1.724877
60.0	25.90	16.187071	32.427822	1.476999

TABLA B-11

Solución de alginato : 3%

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
1.5	0.30	0.429869	0.375612	1.443990
3.0	0.45	0.859739	0.563418	1.198099
6.0	1.00	1.719477	1.252039	0.994081
12.0	2.10	3.438954	2.629283	0.824803
30.0	5.60	8.597386	7.011421	0.644436
60.0	11.15	17.194772	13.960240	0.534698

TABLA B-12

Solución de alginato : 2 %

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	1.60	0.069255	0.025796	0.340749
0.6	2.70	0.138511	0.043531	0.319494
1.5	5.70	0.346277	0.091899	0.293416
3.0	11.20	0.692554	0.180574	0.275114
6.0	22.35	1.385108	0.360342	0.257952
12.0	44.75	2.770216	0.721489	0.241862

TABLA B-13
Solución de alginato : 1%

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	0.60	0.073974	0.009674	0.098209
0.6	0.90	0.147949	0.014510	0.088463
1.5	1.40	0.369872	0.022572	0.077047
3.0	2.50	0.739743	0.040307	0.069401
6.0	4.80	1.479486	0.160421	0.062514
12.0	9.95	2.958973	0.160421	0.056310
30.0	24.80	7.397432	0.399842	0.049043
60.0	49.80	14.794865	0.802909	0.044176

TABLA B-14
Solución de alginato: 0.5 %

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	0.30	0.083287	0.004837	0.037805
0.6	0.40	0.166574	0.006449	0.031884
1.5	0.50	0.416436	0.008061	0.025455
3.0	0.70	0.832871	0.011286	0.021469
6.0	1.40	1.665742	0.022572	0.018106
12.0	2.75	3.331485	0.044337	0.015270
30.0	7.40	8.328712	0.119308	0.012192
60.0	15.50	16.657423	0.249901	0.010282

CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LAS MEZCLAS ALGINATO/*S. cerevisiae*

TABLA B-15

Solución alginato/células : 3.6 %/4 %

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	3.35	0.097502	4.194332	30.212987
0.6	4.20	0.195005	5.258566	23.611037
1.5	4.90	0.487511	6.134993	17.043739
3.0	6.90	0.975023	8.639072	13.319449
6.0	14.30	1.950046	17.904165	10.408968
12.0	26.30	3.900091	32.928638	8.134467
30.0	51.90	9.750228	64.980849	5.871903
60.0	86.20	19.500456	107.925803	4.588812

TABLA B-16

Solución alginato/células : 3.2 %/8 %

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	4.50	0.101701	5.634178	44.056555
0.6	5.30	0.203401	6.635809	33.800691
1.5	8.10	0.508503	10.141520	23.811762
3.0	12.15	1.017005	15.212280	18.268655
6.0	22.60	2.034010	28.296092	14.015920
12.0	38.50	4.068020	48.203520	10.753173
30.0	67.65	10.170051	84.700471	7.575348

TABLA B-17

Solución de alginato/células : 2.8 %/12 %

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	5.00	0.102163	6.260197	51.022846
0.6	6.40	0.204327	8.013053	39.069428
1.5	9.55	0.510817	11.956977	27.452954
3.0	14.30	1.021635	17.904165	21.021392
6.0	25.40	2.043279	31.801803	16.096589
12.0	44.60	4.086539	55.840961	12.325548
30.0	77.00	10.216349	96.407040	8.660805

TABLA B-18

Solución de alginato/células : 2.4 %/16 %

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	5.80	0.098561	7.261829	59.247027
0.6	7.10	0.197121	8.889480	46.079217
1.5	10.70	0.492804	13.396822	33.052284
3.0	17.30	0.985607	21.660283	25.706325
6.0	30.60	1.971215	38.312408	19.993026
12.0	53.10	3.942430	66.483296	15.549522
30.0	97.40	9.856074	121.948645	11.153558

TABLA B-19

Solución de alginato/células : 2 %/20 %

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	6.80	0.110771	8.513868	65.275422
0.6	8.40	0.221542	10.517132	48.354668
1.5	12.10	0.553856	15.149678	32.521926
3.0	1.20	1.107711	22.787118	24.091563
6.0	33.10	2.215423	41.442507	17.846526
12.0	53.80	4.430845	67.359724	13.220334

CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LAS MEZCLAS DE ALGINATO/*P. fluorescens*

TABLA B-20

Solución de alginato 4 % con *Pseudomonas fluorescens*

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s ⁻¹)	Esfuerzo cortante (N/m ²)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	2.00	0.074126	2.504079	27.108729
0.6	2.60	0.148252	3.255303	24.389040
1.5	5.40	0.370630	6.761013	21.207970
3.0	10.40	0.741260	13.021211	19.080276
6.0	20.20	1.482521	25.291197	17.166043
12.0	38.70	2.965041	48.453928	15.443857
30.0	85.20	7.412604	106.673763	13.429510

TABLA B-21

Solución de alginato 3 % con *Pseudomonas fluorescens*

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s^{-1})	Esfuerzo cortante (N/m^2)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	2.20	0.082441	2.754487	30.796789
0.6	3.40	0.164882	4.256934	26.113184
1.5	6.30	0.412206	7.887849	20.996626
3.0	11.20	0.824411	14.022842	17.803439
6.0	20.10	1.648822	25.165993	15.095876
12.0	35.10	3.297644	43.946586	12.800081
30.0	69.00	8.244111	86.390724	10.292062

TABLA B-22

Solución de alginato 2 % con *Pseudomonas fluorescens*

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s^{-1})	Esfuerzo cortante (N/m^2)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	0.90	0.088833	1.126836	8.173195
0.6	1.00	0.177667	1.252039	6.671753
1.5	1.30	0.444167	1.627651	5.101636
3.0	2.10	0.888335	2.629283	4.164450
6.0	4.00	1.776670	5.008158	3.399427
12.0	7.80	3.553339	9.765908	2.774941
30.0	17.70	8.883349	22.161099	2.121892
60.0	30.45	17.766697	38.124602	1.732094

TABLA B-23

Solución de alginato 1 % con *Pseudomonas fluorescens*

Velocidad (r.p.m.)	Lectura	Velocidad (s^{-1})	Esfuerzo cortante (N/m^2)	Viscosidad (Pa·s)
0.3	1.50	0.064780	0.024184	0.371154
0.6	3.00	0.129561	0.048368	0.363449
1.5	6.80	0.323902	0.109634	0.353510
3.0	13.80	0.647804	0.222493	0.346171
6.0	27.30	1.295609	0.440149	0.338986
12.0	54.30	2.591217	0.875461	0.331949

REOLOGÍA DE CIZALLAMIENTO OSCILATORIO DE LOS GELES DE ALGINATO

TABLA B-24
Gel de alginato al 4 %

w (s ⁻¹)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G* (Pa)	Eta' (Pa·s)	tan (δ)
0.924	8150	7430	11000	8050	0.912
1.36	7530	7440	10600	5460	0.987
2.00	7130	7550	10400	3770	1.06
2.91	6980	7750	10400	2660	1.11
4.27	6820	8180	10700	1920	1.20
6.28	7060	8570	11100	1360	1.21
9.11	7250	8850	11400	972	1.22
1.36	7470	9250	11900	682	1.24
1.97	7640	9800	12400	498	1.28
2.91	7850	10200	12800	349	1.29
4.36	8540	10300	13400	237	1.21
6.04	9070	11200	14400	186	1.24

TABLA B-25
Gel de alginato al 3 %

w (s ⁻¹)	G' (Pa)	G'' (Pa)	G* (Pa)	Eta' (Pa·s)	tan (δ)
0.924	8160	6790	10600	73500	0.832
1.36	11800	8880	17800	65500	0.752
1.99	15600	8720	17900	43900	0.558
2.91	17300	8590	19300	29500	0.496
4.25	18300	8080	20000	19000	0.442
6.28	18500	8650	20400	13800	0.468
9.24	19500	8850	21500	9590	0.453
1.36	21200	9230	23100	6770	0.436
2.00	21800	9600	23800	4790	0.441
2.91	22600	9500	24500	3260	0.420
4.27	23200	9860	25200	2310	0.426
6.28	24000	9730	25900	1550	0.405
9.11	24500	9290	26200	1020	0.379
1.36	25700	9970	27500	735	0.388
1.97	26000	11100	28300	565	0.427
2.91	27000	10000	28800	345	0.372
4.36	29500	10600	31300	243	0.359
6.04	28600	13000	13300	215	4.54

TABLA B-26
Gel de alginato al 2 %

w (s^{-1})	G' (Pa)	G'' (Pa)	G^* (Pa)	Eta' (Pa·s)	$\tan(\delta)$
0.924	4950	4420	6570	4670	0.872
1.36	4770	4430	6510	3250	0.930
2.00	4400	4480	6280	2240	1.02
2.91	4150	4530	6150	1560	1.09
4.27	3950	4670	6120	1090	1.18
6.28	3860	4870	6210	774	1.26
9.11	3800	5070	6340	557	1.33
1.36	3810	5180	6430	382	1.36
1.97	3720	5380	6540	274	1.45
2.91	3810	5570	6750	191	1.46
4.36	4190	5670	7050	130	1.35
6.04	4350	6040	7440	99.8	1.39

GRANULOMETRÍA DE LAS ESFERAS ELABORADAS A DIFERENTES PRESIONES DE AIRE

TABLA C-1

Presión de aire empleada : 0 Kg/cm²

tiempo de agitación : 10 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
6	3.35	80.2	98.53	1.47	98.53
8	2.38	1.2	1.47	0	100
10	1.68	0	0	-	100

Figura C-1 Curva granulométrica de esferas elaboradas con P=0 kg/cm²

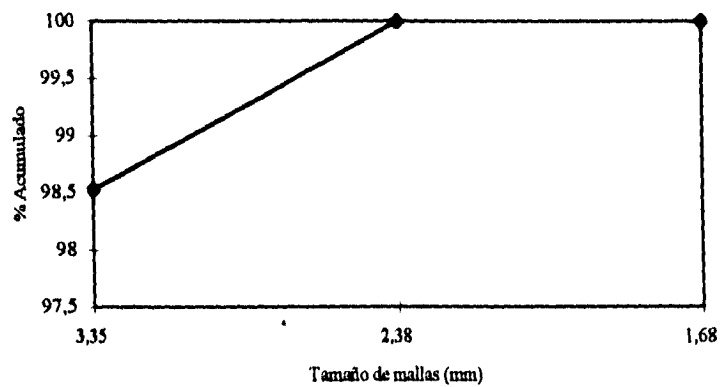


TABLA C-2

Presión de aire empleada : 1 kg/cm²
 tiempo de agitación : 10 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
6	3.35	0.7	0.99	99.01	0.99
8	2.38	61.0	86.53	12.48	87.52
10	1.68	8.8	12.48	0	100

Figura C-2 Curva granulométrica de esferas elaboradas con P=1 kg/cm²

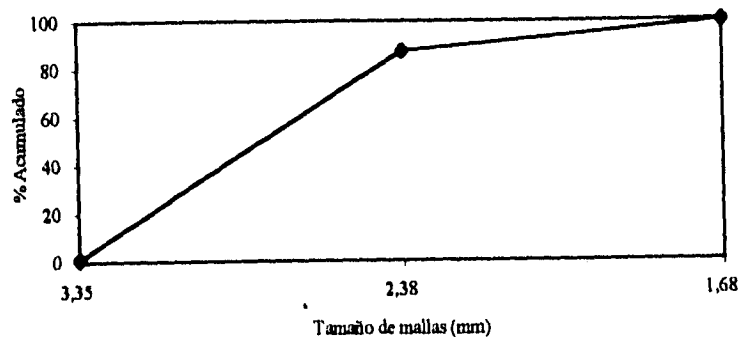


TABLA C-3

Presión de aire empleada : 2 kg/cm^2
 tiempo de agitación: 10 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
10	1.68	6.34	10.30	89.7	10.30
12	1.41	53.39	86.76	2.94	97.06
16	1.13	1.81	2.94	0	100

Figura C-3 Curva granulométrica de esferas elaboradas con $P=2 \text{ kg/cm}^2$

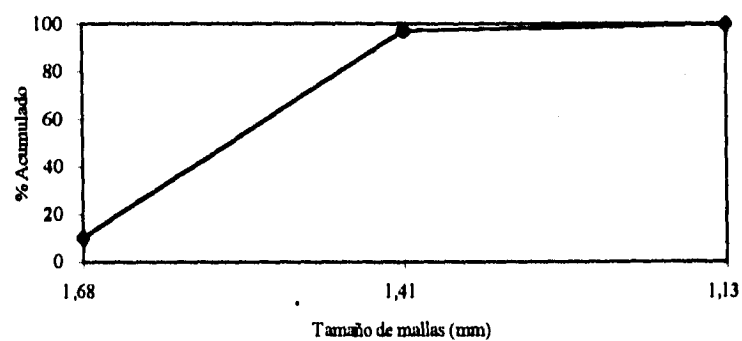
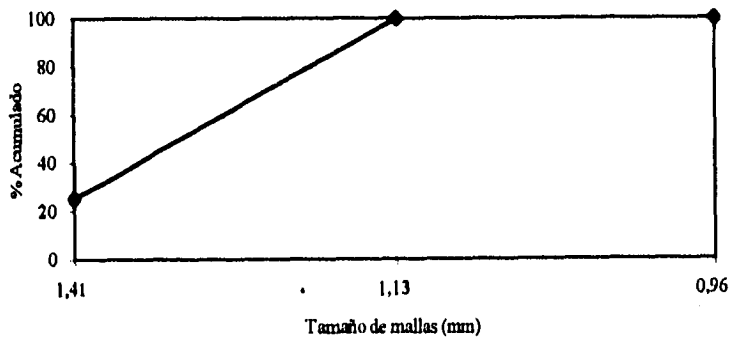


TABLA C-4

Presión de aire empleada : 3 kg/cm²
 tiempo de agitación : 10 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
12	1.41	10.71	25.41	74.59	25.41
16	1.13	31.40	74.50	0.09	99.91
18	0.96	0.04	0.09	0	100

Figura C-4 Curva granulométrica de esferas elaboradas con P=3 kg/cm²



GRANULOMETRÍA DE ESFERAS ELABORADAS A DIFERENTES VELOCIDADES DE ALIMENTACIÓN

TABLA C-5

Velocidad de alimentación empleada : 1.1 mL/min
tiempo de cribado : 10 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
12	1.41	21.57	26.67	73.33	26.67
16	1.13	59	72.95	0.38	99.62
18	0.96	0.31	0.38	0	100

Figura C-5 Curva granulométrica de esferas elaboradas con $v=1.1$ mL/min

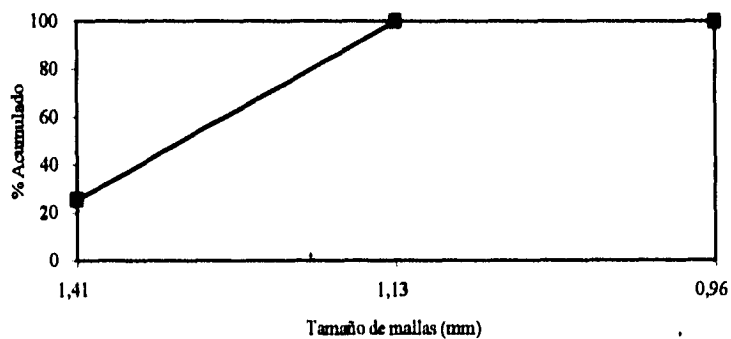


TABLA C-6

Velocidad de alimentación empleada : 30 mL/min
 tiempo de cribado : 10 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
12	1.41	11.99	29.72	70.28	29.72
16	1.13	28.09	69.64	0.64	99.36
18	0.96	0.10	0.25	0.39	99.61
20	0.80	0.13	0.32	0.07	99.93
30	0.59	0.03	0.07	0	100

Figura C-6 Curva granulométrica de esferas elaboradas con $v=$
 30 mL/min

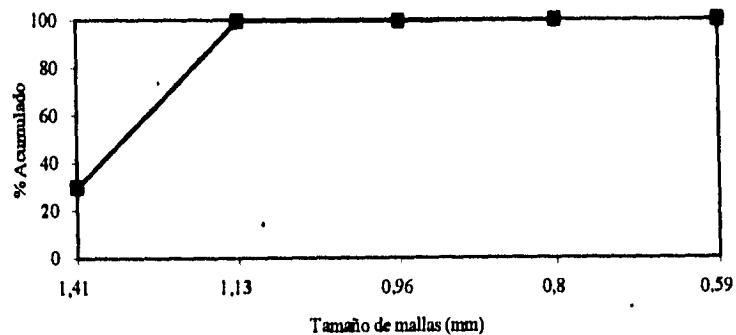


TABLA C-7

Velocidad de alimentación empleada : 150 mL/min
 tiempo de cribado : 10 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
12	1.41	9.73	22.71	77.29	22.71
16	1.13	31.82	74.28	3.01	96.99
18	0.96	0.39	0.91	2.10	97.90
20	0.80	0.61	1.42	0.68	99.32
30	0.59	0.29	0.68	0	100

Figura C-7 Curva granulométrica de esferas elaboradas con $v=150$ mL/min

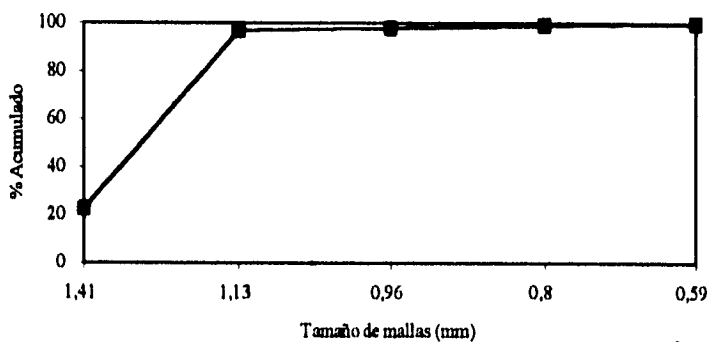
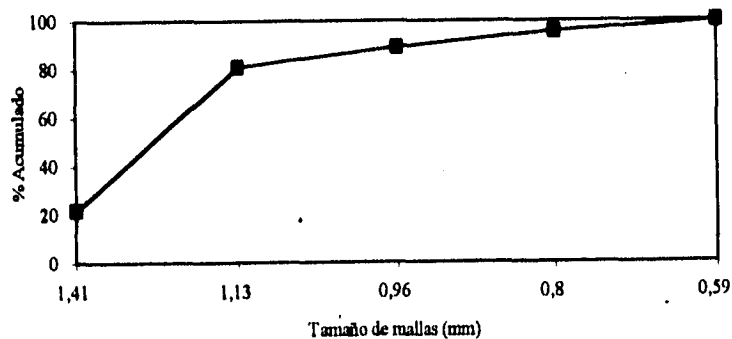


TABLA C-8

Velocidad de alimentación empleada : 325 mL/min
 tiempo de cribado : 10 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
12	1.41	12.83	21.73	78.27	21.73
16	1.13	34.98	59.25	19.02	80.98
18	0.96	4.80	8.13	10.89	89.11
20	0.80	3.82	6.47	4.42	95.58
30	0.59	2.61	4.42	0	100

Figura C-8 Curva granulométrica de esferas elaboradas
 con $v = 325$ mL/min



**GRANULOMETRÍA DE LAS ESFERAS ELABORADAS CON DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE ALGINATO**

TABLA C-9

Concentración de alginato empleada : 4%
tiempo de cribado : 20 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
8	2.38	6.80	11.25	70.28	11.25
10	1.68	25.18	41.68	0.64	52.93
12	1.41	18.72	30.98	0.39	83.91
16	1.13	5.49	9.09	0.07	93
18	0.96	4.23	7.00	0	100

Figura C-9 Curva granulométrica de esferas elaboradas con alginato al 4%

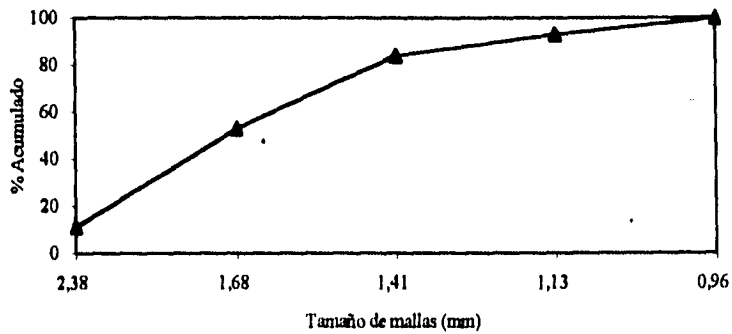


TABLA C-10

Concentración de alginato empleada : 3%
 tiempo de cribado : 20 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
12	1.41	21.57	26.67	73.33	26.67
16	1.13	59	72.95	0.38	99.62
18	0.96	0.31	0.38	0	100

Figura C-10 Curva granulométrica de esferas elaboradas con alginato al 3%

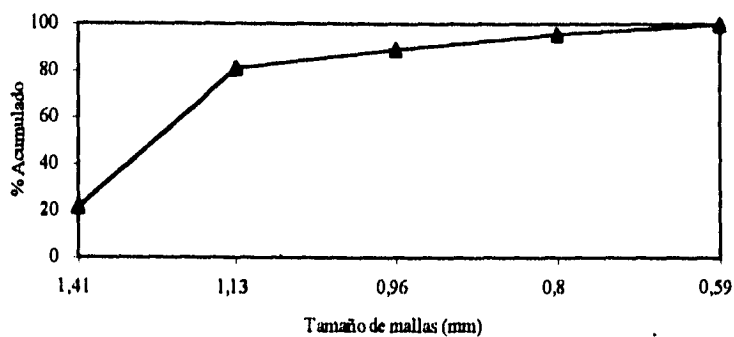


TABLA C-11

Concentración de alginato empleada : 2%
 tiempo de cribado : 20 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
16	1.13	7.83	25.40	74.60	25.4
18	0.96	11.89	38.57	36.03	63.97
20	0.80	10.49	34.02	2.01	94.99
30	0.59	0.62	2.01	0	100

Figura C-11 Curva granulométrica de esferas elaboradas con alginato al 2%

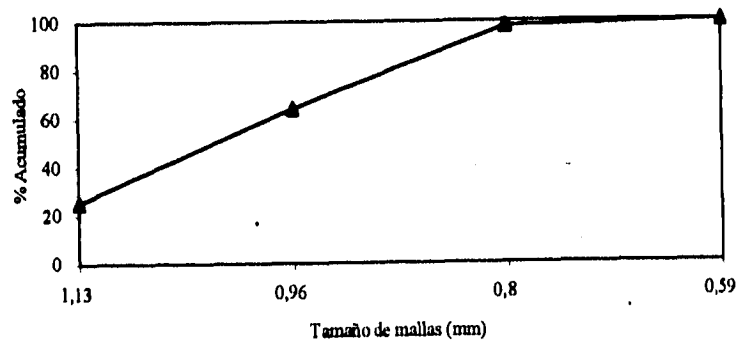
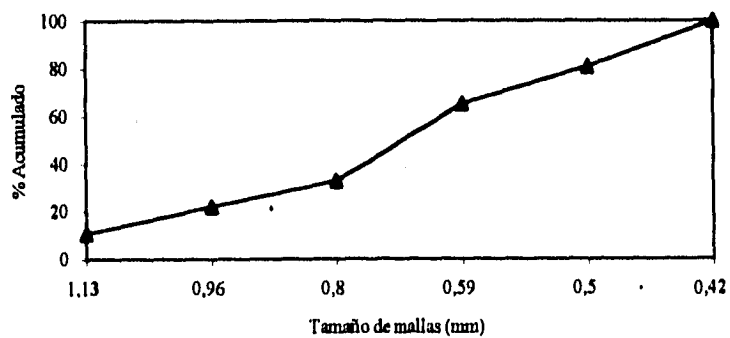


TABLA C-12

Concentración de alginato empleada : 1%
 tiempo de cribado : 20 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
16	1.13	5.38	10.67	89.33	10.67
18	0.96	5.73	11.36	77.97	22.03
20	0.80	5.50	10.90	67.07	32.93
30	0.59	16.18	32.08	34.99	65.01
35	0.50	7.92	15.70	19.29	80.71
40	0.42	9.73	19.29	0	100

Figura C-12 Curva granulométrica de esferas elaboradas con alginato al 1%



**GRANULOMETRÍA DE LAS ESFERAS ELABORADAS CON DIFERENTE
RELACIÓN ALGINATO/CÉLULAS**

TABLA C-13

Mezcla de alginato/células empleada : 2.7 g/ 4g
tiempo de cribado : 20 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
10	1.68	9.24	18.84	81.16	18.84
12	1.41	14.07	28.69	52.47	47.53
16	1.13	25.65	52.29	0.18	99.82
18	0.96	0.08	0.16	0.02	99.98
20	0.80	0.01	0.02	0	100

Figura C-13 Curva granulométrica de esferas elaboradas con
alginato/células: 2.7g/4g

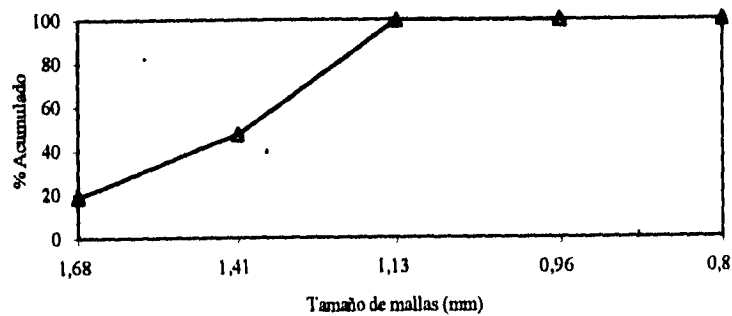


TABLA C-14

Mezcla de alginato/células empleada : 2.4 g/ 8g

tiempo de cribado : 20 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
10	1.68	4.41	8.84	91.16	8.84
12	1.41	8.24	16.52	74.64	25.36
16	1.13	33.97	68.09	6.55	93.45
18	0.96	3.25	6.51	0.04	99.96
20	0.80	0.02	0.04	0	100

Figura C-14 Curva granulométrica de esferas elaboradas con alginato/células: 2.4g/8g

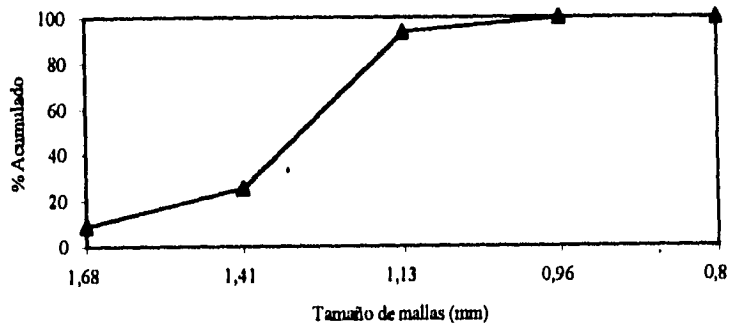


TABLA C-15

Mezcla de alginato/células empleada : 2.1 g/ 12g
 tiempo de cribado : 20 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
10	1.68	6.63	8.94	91.06	8.94
12	1.41	27.01	36.45	54.61	45.39
16	1.13	38.83	52.39	2.22	97.78
18	0.96	1.64	2.21	0.01	99.99
20	0.80	0.01	0.01	0	100

Figura C-15 Curva granulométrica de esferas elaboradas con alginato: 2.1g/12g

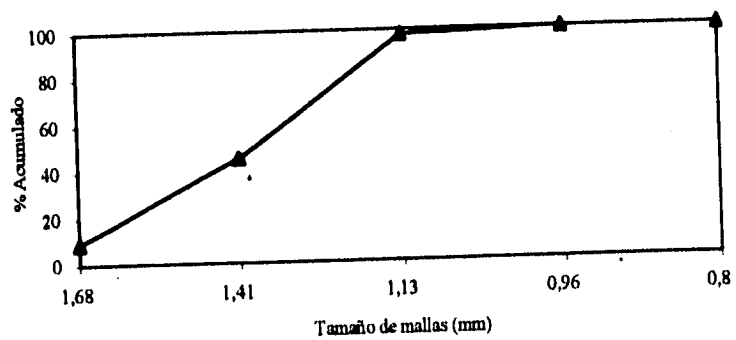


TABLA C-16

Mezcla de alginato/células empleada : 1.8 g/ 16g
tiempo de cribado : 20 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
10	1.68	15.46	10.36	89.64	10.36
12	1.41	42.62	28.55	61.09	38.91
16	1.13	56.70	37.99	23.10	76.90
18	0.96	15.63	10.47	12.63	87.37
20	0.80	13.07	8.76	3.87	96.13
30	0.59	5.78	3.87	0	100

Figura C-16 Curva granulométrica de esferas elaboradas con alginato/células: 1.8g/16g

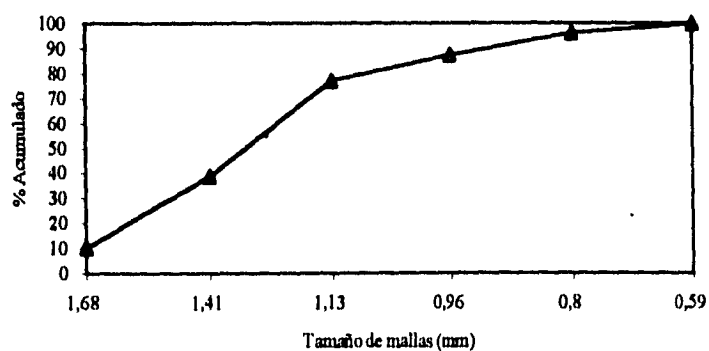
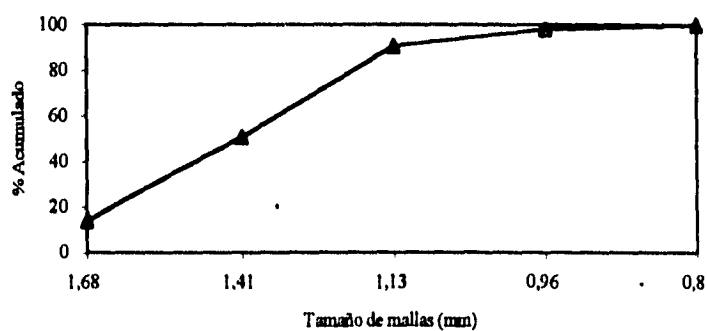


TABLA C-17

Mezcla de alginato/células empleada : 1.5 g/ 20g
 tiempo de cribado : 20 min

Malla No.	Abertura (mm)	Peso retenido (g)	% Retenido parcial	% en Peso que pasa	% Acumulado
10	1.68	11.76	13.81	86.19	13.81
12	1.41	31.39	36.87	49.32	50.68
16	1.13	34.01	39.94	9.38	90.62
18	0.96	6.33	7.43	1.95	98.05
20	0.80	1.66	1.95	0	100

Figura C-17 Curva granulométrica de esferas elaboradas con alginato/células: 1.5g/20g



SECADO DE LAS ESFERAS DE ALGINATO DE CALCIO

TABLA D-1 CURVAS DE HUMEDAD DE ESFERAS CON DIFERENTE
CONCENTRACIÓN DE ALGINATO

Tiempo (minutos)	Alginato 3% Humedad (%)	Alginato 2% Humedad (%)	Alginato 1% Humedad (%)
1	96.8	97	97.1
2	93.1	93.35	93.65
3	88.75	89	89.6
4	83.25	94.5	85.2
5	77.5	79.95	80.8
6	72.5	75.35	76.4
7	67.55	70.75	72.05
8	62.75	66.15	67.75
9	58.1	61.7	63.4
10	53.55	57.35	59.05
11	49.05	53.25	54.8
12	44.75	49.15	50.7
13	40.85	45.1	46.7
14	37.2	41.3	42.85
15	33.6	37.65	39.2
16	30.05	34	35.5
17	26.85	30.65	32
18	24	27.55	28.9
19	21.25	24.55	25.85
20	18.6	21.95	22.95
21	16.1	19.5	20.3
22	13.75	17.15	17.85
23	13.05	15	15.6
24	12.7	13.2	13.55
25	11.2	11.65	11.7
26	9.8	10.2	10.05
27	8.9	9	8.7
28	8.55	8.1	7.65
29	8.2	7.4	6.8

TABLA D-2 CURVAS DE HUMEDAD DE ESFERAS CON DISTINTO DIÁMETRO

Tiempo (minutos)	3 mm Humedad (%)	2.38 mm Humedad (%)	1.41 mm Humedad (%)	1.13 mm Humedad (%)
1	97.4	97.6	97.1	96.8
2	94.7	94.6	93.5	93.1
3	91.2	90.9	89.3	88.75
4	87.4	87.1	94.9	83.25
5	83.45	83	80.5	77.5
6	79.55	78.9	76	72.5
7	75.6	75	71.47	67.55
8	71.7	71.2	66.97	62.75
9	67.9	67.5	62.47	58.1
10	63.95	63.7	58.12	53.55
11	60.2	59.9	54.1	49.05
12	56.75	56.3	50.2	44.75
13	53.25	52.8	46.3	40.85
14	49.75	49.4	42.5	37.2
15	46.3	46	38.8	33.6
16	43	42.9	35.4	30.05
17	39.75	39.8	30	26.85
18	36.55	36.8	28.8	24
19	33.5	33.9	25.9	21.25
20	30.75	31.2	23.1	18.6
21	28.3	28.7	20.5	16.1
22	25.9	26.3	18.17	13.75
23	23.5	24.1	16.1	13.05
24	21.15	22	14.12	12.7
25	18.9	20	12.5	11.2
26	16.9	18.2	11.15	9.8
27	15.25	16.6	10	8.9
28	13.75	15.15	9.1	8.55
29	12.35	13.8	8.4	8.2

**TABLA D-3 CURVAS DE HUMEDAD DE ESFERAS CON DIFERENTE RELACIÓN
ALGINATO/*P. fluorescens***

Tiempo (minutos)	Alg 4% con <i>P. fluorescens</i>	Alginato 3% con <i>P. fluorescens</i>	Alginato 2% con <i>P. fluorescens</i>	Alginato 1% con <i>P. fluorescens</i>
1	96.95	97.8	97.8	97.55
2	93	94.8	95.05	94.4
3	88.37	91.15	91.65	90.5
4	83.45	87.15	87.8	86.45
5	78.45	83	83.9	82.2
6	73.62	78.85	80	78
7	68.92	74.7	76	74
8	64.3	70.85	72.2	70
9	59.87	67.25	68.5	66
10	55.62	63.75	64.8	62
11	51.5	60.25	61.25	58.25
12	47.67	57	57.6	54.75
13	43.97	54	54.1	51.15
14	40.42	51	50.8	47.65
15	37.25	48	47.5	44.35
16	34.3	45.1	44.35	41.1
17	31.45	42.4	41.4	38
18	28.9	39.95	38.5	35
19	26.75	37.65	35.75	32.25
20	24.8	35.4	33.2	29.75
21	23.15	33.35	30.7	27.25
22	21.75	31.4	28.45	25
23	20.52	29.55	26.35	23
24	19.57	27.95	24.35	21
25	18.77	26.5	22.5	19.25
26	18.17	25.1	20.8	17.75
27	17.8	23.8	19.4	16.6
28	17.5	22.6	18.25	15.7
29	17.3	21.5	17.2	14.95
30	17.2	20.5	16.35	14.4

CURVAS DE SECADO

TABLA D-4 VELOCIDADES DE SECADO DE ESFERAS CON DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE ALGINATO

Alginato 3%		Alginato 2%		Alginato 1%	
Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)	Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)	Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)
96.8	3.2	97	3.2	97.1	3.2
93.1	4.2	93.35	4.1	93.65	3.7
88.75	4.5	89	4.6	89.6	4.4
83.25	6.5	94.5	4.4	85.2	4.4
77.5	5	79.95	4.7	80.8	4.4
72.5	5	75.35	4.5	76.4	4.4
67.55	4.9	70.75	4.7	72.05	4.3
62.75	4.7	66.15	4.5	67.75	4.3
58.1	4.6	61.7	4.4	63.4	4.4
53.55	4.5	57.35	4.3	59.05	4.3
49.05	4.5	53.25	3.9	54.8	4.2
44.75	4.1	49.15	4.3	50.7	4
40.85	3.7	45.1	3.8	46.7	4
37.2	3.6	41.3	3.8	42.85	3.7
33.6	3.6	37.65	3.5	39.2	3.6
30.05	3.5	34	3.8	35.5	3.8
26.85	2.9	30.65	2.9	32	3.2
24	2.8	27.55	3.3	28.9	3
21.25	2.7	24.55	2.7	25.85	3.1
18.6	2.6	21.95	2.5	22.95	2.7
16.1	2.4	19.5	2.4	20.3	2.6
13.75	2.3	17.15	2.3	17.85	2.3
13.05	0.9	15	2	15.6	2.2
12.7	1.6	13.2	1.6	13.55	1.9
11.2	1.4	11.65	1.5	11.7	1.8
9.8	1.4	10.2	1.4	10.05	1.5
8.9	1.4	9	1	8.7	1.2
8.55	0.4	8.1	0.8	7.65	0.9
8.2	0.3	7.4	0.6	6.8	0.8

TABLA D-5 VELOCIDADES DE SECADO DE ESFERAS CON DIFERENTE DIÁMETRO

Diámetro 3 mm		Diámetro 38 mm		Diámetro 1.41 mm		Diámetro 1.13 mm	
Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)	Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)	Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)	Humeda d (%)	Velocidad de secado (dH/dt)
97.4	2	97.6	2.35	97.1	3	96.8	3.2
94.7	3.4	94.6	3.55	93.5	4.15	93.1	4.2
91.2	3.6	90.9	3.75	89.3	4.3	88.75	4.5
87.4	4	87.1	4.05	94.9	4.45	83.25	6.5
83.45	3.9	83	4.05	80.5	4.4	77.5	5
79.55	3.9	78.9	4.1	76	4.6	72.5	5
75.6	4	75	3.75	71.47	4.45	67.55	4.9
71.7	3.8	71.2	3.8	66.97	4.55	62.75	4.7
67.9	3.8	67.5	3.75	62.47	4.45	58.1	4.6
63.95	4.1	63.7	3.8	58.12	4.25	53.55	4.5
60.2	3.4	59.9	3.7	54.1	3.85	49.05	4.5
56.75	3.5	56.3	3.55	50.2	3.95	44.75	4.1
53.25	3.5	52.8	3.5	46.3	3.85	40.85	3.7
49.75	3.5	49.4	3.35	42.5	3.75	37.2	3.6
46.3	3.4	46	3.3	38.8	3.55	33.6	3.6
43	3.2	42.9	3.05	35.4	3.35	30.05	3.5
39.75	3.3	39.8	3.1	30	3.35	26.85	2.9
36.55	3.1	36.8	2.95	28.8	3.1	24	2.8
33.5	3	33.9	2.75	25.9	2.75	21.25	2.7
30.75	2.5	31.2	2.6	23.1	2.75	18.6	2.6
28.3	2.4	28.7	2.5	20.5	2.5	16.1	2.4
25.9	2.4	26.3	2.25	18.17	2.15	13.75	2.3
23.5	2.4	24.1	2.15	16.1	2.05	13.05	0.9
21.15	2.3	22	2.05	14.12	1.85	12.7	1.6
18.9	2.2	20	1.9	12.5	1.45	11.2	1.4
16.9	1.8	18.2	1.75	11.15	1.2	9.8	1.4
15.25	1.5	16.6	1.5	10	1.05	8.9	1.4
13.75	1.5	15.15	1.4	9.1	0.85	8.55	0.4
12.35	1.3	13.8	1.25	8.4	0.55	8.2	0.3

TABLA D-6 VELOCIDADES DE SECADO DE ESFERAS CON DIFERENTE RELACIÓN ALGINATO/*P.fluorescens*

Alg 4% con <i>P.fluorescens</i>		Alginato 3% con <i>P. fluorescens</i>		Alginato 2% con <i>P. fluorescens</i>		Alginato 1% con <i>P. fluorescens</i>	
Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)	Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)	Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)	Humedad (%)	Velocidad de secado (dH/dt)
96.95	3.4	97.8	2.4	97.8	2.4	97.55	2.5
93	4.5	94.8	3.6	95.05	3.1	94.4	3.8
88.37	4.75	91.15	3.7	91.65	3.7	90.5	4
83.45	5.1	87.15	4.3	87.8	4	86.45	4.1
78.45	4.9	83	4	83.9	3.8	82.2	4.4
73.62	4.75	78.85	4.3	80	4	78	4
68.92	4.65	74.7	4	76	4	74	4
64.3	4.6	70.85	3.7	72.2	3.6	70	4
59.87	4.25	67.25	3.5	68.5	3.8	66	4
55.62	4.25	63.75	3.5	64.8	3.6	62	4
51.5	4	60.25	3.5	61.25	3.5	58.25	3.5
47.67	3.65	57	3	57.6	3.8	54.75	3.5
43.97	3.71	54	3	54.1	3.2	51.15	3.7
40.42	3.35	51	3	50.8	3.4	47.65	3.3
37.25	3.35	48	3	47.5	3.2	44.35	3.3
34.3	2.9	45.1	2.8	44.35	3.1	41.1	3.23
31.45	2.8	42.4	2.6	41.4	2.8	38	3
28.9	2.3	39.95	2.3	38.5	3	35	3
26.75	2	37.65	2.3	35.75	2.5	32.25	2.5
24.8	1.9	35.4	2.2	33.2	2.6	29.75	2.5
23.15	1.4	33.35	1.9	30.7	2.4	27.25	2.5
21.75	1.4	31.4	2	28.45	2.1	25	2
20.52	1.05	29.55	1.7	26.35	2.1	23	2
19.57	0.85	27.95	1.5	24.35	1.9	21	2
18.77	0.75	26.5	1.4	22.5	1.8	19.25	1.5
18.17	0.45	25.1	1.4	20.8	1.6	17.75	1.5
17.8	0.3	23.8	1.2	19.4	1.2	16.6	0.8
17.5	0.3	22.6	1.2	18.25	1.1	15.7	1
17.3	0.1	21.5	1	17.2	1	14.95	0.5
17.2	0.1	20.5	1	16.35	0.7	14.4	0.6

TABLA E-1 ADSORCIÓN DE FENOL EN ALGINATO DE CALCIO
“CONCENTRACIONES”

Tiempo (min)	Alginato (0g/L)	Alginato (2g/L)	Alginato (4g/L)	Alginato (6g/L)	Alginato (8g/L)	Alginato (10g/L)
0	0.992823	0.9809419	0.9779715	0.9779715	0.9764863	0.98094188
2	0.989853	0.9794567	0.9750011	0.9750011	0.9452971	0.93638588
5	0.986883	0.9735159	0.9660899	0.9705455	0.9319303	0.91113748
10	0.989853	0.9720307	0.9616343	0.9794567	0.9096523	0.87846308
30	0.982427	0.9705455	0.9720307	0.9660899	0.8977707	0.85321468
60	0.977971	0.9750011	0.9542083	0.9363859	0.8903447	0.87400748
100	0.980942	0.9720307	0.9616343	0.9274747	0.9022263	0.87697788
150	0.979457	0.975001	0.9571787	0.9319303	0.9066819	0.89331508
225	0.975001	0.9705455	0.9542083	0.9349007	0.9141079	0.90222628

Figura E-1 ADSORCIÓN DE FENOL EN ALGINATO DE CALCIO

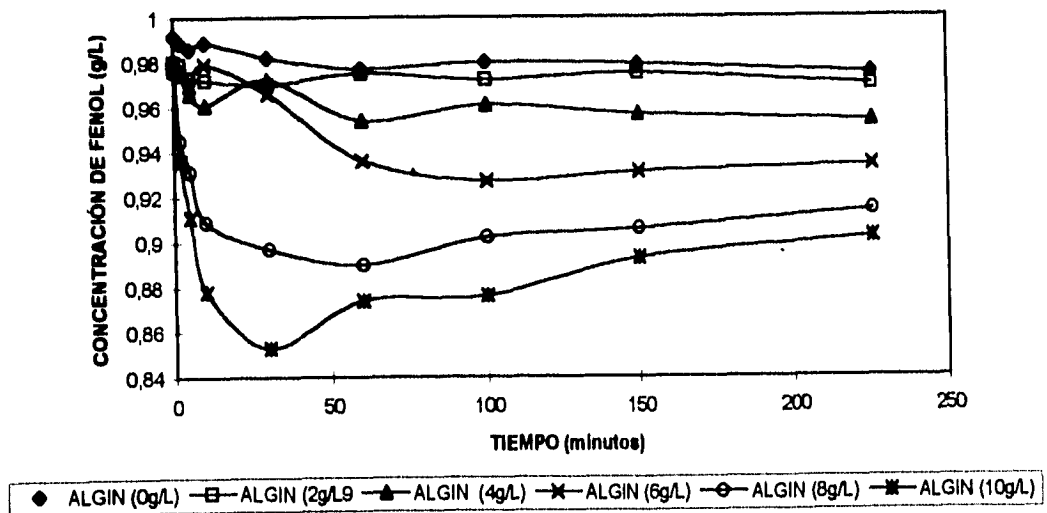
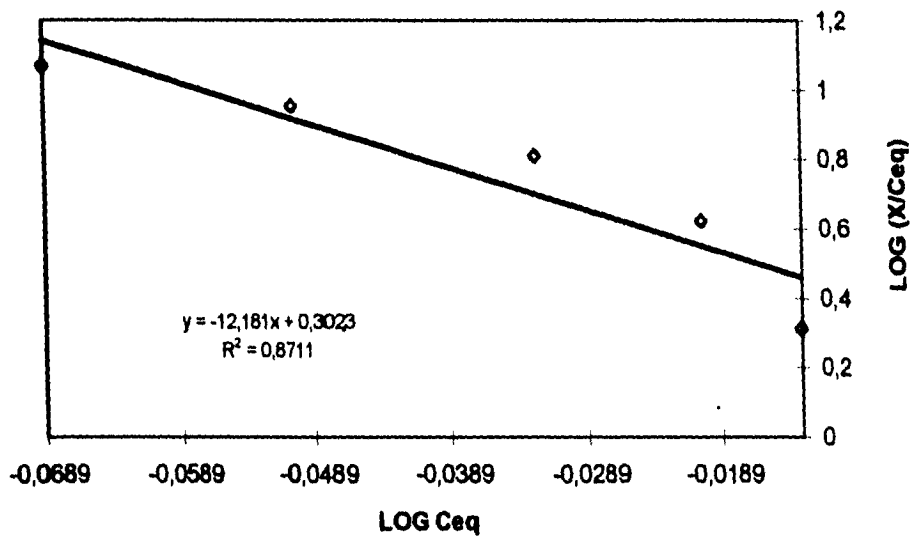


TABLA E-2 ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE FENOL EN ALGINATO DE CALCIO

X (g/L)	Ceq	(X/Ceq)	LOG Ceq	LOG (C/Ceq)	% DE ADSORCIÓN
2	0.970545	2.0606968	-0.0129841	0.314014	1.277033872
4	0.95221	4.1919018	-0.0203511	0.622411	2.937562812
6	0.927475	6.04691793	-0.0326979	0.810849	5.658154816
8	0.890345	8.9852842	-0.0504418	0.953532	9.434983216
10	0.853215	11.72038	-0.0689417	1.068942	13.21181162

Figura E-2 ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE FENOL EN ALGINATO DE CALCIO



NOMENCLATURA

A	volumen de EDTA
Act.	Actividad
Alg	alginato
APHA	American Public Health Association
AWWA	American Water Works Association
B	miligramos de CaCO_3 que equivalen a 1 mL de EDTA
Ceq	concentración en el equilibrio
$D_{\text{mayor}}/D_{\text{menor}}$	relación diámetro mayor entre diámetro menor para determinar la esfericidad
dH/dt	velocidad de secado
D.O. ⁴⁹⁴	densidad óptica a 494 nm
D.O. ⁵⁰⁰	densidad óptica a 500 nm
D.O. ⁵⁹⁵	densidad óptica a 595 nm
D.O. ⁶¹⁰	densidad óptica a 610 nm
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
G'	módulo de elasticidad
G''	módulo de viscosidad
g/g	gramos de alginato/gramo de células
Hz	hertz
ICIDCA	Instituto Cubano de Investigaciones sobre la Caña de Azúcar
K	índice de consistencia o constante de adsorción

Nomenclatura

kg_{cat}	kilogramos de catalizador
M	molar
m	masa
mgCa/mgAlg	miligramos de calcio por miligramos de alginato
mg/Kgcat·d	miligramos por kilogramo de catalizador por día
mg/L·d	miligramos por litro por día
mL/min	mililitros por minuto
mg/UFC·d	miligramos por unidades formadoras de colonia por día
N	normal
n	índice de flujo o constante de adsorción
nm	nanómetros
Pa	pascales
mPa·s	milipascales por segundo
pH	potencial de hidrógeno
p.p.m.	partes por millón
p/v	peso por volumen
Q	gasto de alimentación
r	factor de correlación
r.p.m.	revoluciones por minuto
UFC	unidades formadoras de colonia
UFC/g _{cat.}	unidades formadoras de colonia por gramo de catalizador
UFC/g _{soporte}	unidades formadoras de colonia por gramo de soporte
UFC/mL	unidades formadoras de colonia por mililitro de solución

Nomenclatura

UFC/mL _{columna}	unidades formadoras de colonia por mililitro de columna
UFC/mL _{soporte}	unidades formadoras de colonia por mililitro de soporte
V	volumen o volumen de reactor
X/Ceq	cantidad de adsorbente por concentración en el equilibrio
YPG	levadura-peptona de caseína-glucosa
WPCF	Water Pollution Control Federation

Letras griegas

ε	fracción vacía
$\dot{\gamma}$	velocidad de deformación
μL	microlitros
μm	micrometros
μS	microSiemens
ρ	densidad
θ	tiempo de residencia
τ	esfuerzo de corte