

01177

15  
29.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE INGENIERIA

**CINETICA DE LA DEGRADACION DE TOLUENO  
POR Pseudomonas fluorescens**

**T E S I S**  
O U E P R E S E N T A :  
Q.I. ROSA MARIA MELGOZA ALEMAN  
PARA OBTNER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERIA  
( AMBIENTAL )

DIRIGIDA POR:

M.I. ESPERANZA RAMIREZ CAMPEROS



MEXICO, D. F.

MARZO DE 1998

2596/10

**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.

## DEDICATORIAS

*A DIOS*

*POR HACERME SENTIR EN CADA MOMENTO SU PRESENCIA*

A MI HIJA ALEJANDRA

CON MUCHO AMOR POR SER MI PRINCIPAL MOTIVO DE SUPERACIÓN EN LA  
VIDA

A MI MADRE SRA. EMA ALEMÁN MARTÍNEZ

POR SU INCONDICIONAL AMOR Y APOYO EN CADA MOMENTO DE MI VIDA

CON CARÍÑO

A MI ABUELITO MANUEL

A MIS HERMANOS CLAUDIA, MIGUEL ANGEL Y  
JOSÉ MARCOS

A MIS SOBRINOS CLAUDIA, MIGUEL ANGEL, MARCOS GERARDO,  
JORGE FERNANDO Y OLIVER EDUARDO

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL INSTITUTO MEXICANO DE TECNOLOGÍA DEL AGUA  
(IMTA)**

A TRAVÉS DE LA SUBCOORDINACIÓN DE TRATAMIENTO DE AGUAS  
RESIDUALES INDUSTRIALES POR EL APOYO BRINDADO PARA LA  
REALIZACIÓN DEL TRABAJO

**A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
(DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA)**

A TRAVÉS DEL PROGRAMA DE BECAS SUPERA ( SUPERACIÓN  
ACADÉMICA) POR EL APOYO BRINDADO PARA LA REALIZACIÓN DE  
LOS ESTUDIOS DE MAESTRÍA

Y

AL PROGRAMA DE BECAS PROMEP (PROGRAMA DEMEJORAMIENTO AL  
PROFESORADO) POR EL APOYO BRINDADO PARA LA REDACCIÓN DE  
ESTA TESIS

## AGRADECIMIENTOS

AL H. JURADO REVISOR

M.I. M. ESPERANZA RAMIREZ CAMPEROS  
DRA. PETIA MIJAYLOVA NACHEVA  
M.I. GABRIELA MOELLER CHÁVEZ  
M.C. LINA CARDOSO VIGUEROS  
M.C. LUIS GILBERTO TORRES TORRES

POR SUS VALIOSAS OBSERVACIONES PARA MEJORAR  
EL TRABAJO

AL ING. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ GONZALEZ

POR SU APOYO PARA EL DESARROLLO DEL  
PROGRAMA DE COMPUTADORA

A LA Q.I. RAQUEL ARELLANO MARTÍNEZ

POR SU APOYO PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS ESPECTROS DE MASAS

EN ESPECIAL AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE  
ANÁLISIS INDUSTRIALES (F.C.Q.I.), POR SU AYUDA Y COMPRENSIÓN PARA  
FINALIZAR ESTE TRABAJO

## ÍNDICE

Página

Resumen	i
Introducción	iii
Justificación	v
Hipótesis	v
Objetivo general	v
Objetivos específicos	v
1. Tratamiento biológico	1
1.1. Aplicación de los procesos biológicos	1
1.2. Condiciones de crecimiento bacteriano	2
1.3. Degradación de compuestos tóxicos	3
1.3.1. Biodegradabilidad	3
1.3.2. Bases de la biodegradación	4
1.3.3. Biodegradación de xenobióticos recalcitrantes y tóxicos	5
1.4. Importancia de las cepas puras en la degradación de tóxicos	8
1.5. Ingeniería genética y la adaptación de microorganismos a la degradación de compuestos tóxicos	10
1.6. Descripción de la cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	10
1.7. Tolueno	12
1.7.1. Descripción del tolueno	12
1.7.2. Problemática	13
1.7.3. Tecnologías de remoción	15
1.7.3.1. Sistemas de tratamiento para su remoción	16
1.8. Cepas degradadoras del tolueno y su metabolismo	18
2. Crecimiento bacteriano	21
2.1. Modelos de crecimiento	21
2.2. Metabolismo celular	22
2.3. Bioquímica de los procesos biológicos	24
2.4. Características energéticas	24
2.5. Cinética del crecimiento bacteriano	24
2.6. Crecimiento celular	25
2.7. Crecimiento limitado por el sustrato	26
2.8. Crecimiento celular y utilización de sustrato	27
2.9. Efectos del metabolismo endógeno	28
2.10. Aplicación de la cinética del crecimiento bacteriano y consumo de sustrato en un reactor de mezcla completa sin reciclaje	29
2.11. Cinética de degradación de compuestos tóxicos	32
2.11.1. Evaluación de constantes biocinéticas	34
3. Desarrollo experimental	37
3.1. Ubicación del sitio experimental	37
3.2. Materiales y métodos	37
3.2.1. Cepa bacteriana	37

	Página
3.2.2. Medios de cultivo	37
3.2.2.1. Medio de conservación de la bacteria	37
3.2.2.2. Medio para el crecimiento del inoculo	37
3.2.2.3. Medio de mantenimiento	38
3.2.3. Reactivos	38
3.2.4. Materiales	39
3.2.5. Equipo analítico	40
3.3. Metodología	41
3.3.1. Experimentos en matraces para el estudio del crecimiento bacteriano en presencia de tolueno	41
3.3.1.1. Conservación de la cepa	41
3.3.1.2. Propagación del inoculo de <i>Ps. fluorescens</i>	41
3.3.1.3. Crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en matraces, en presencia de tolueno	41
3.3.2. Experimento para el crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en reactores batch de 10 l a temperatura ambiente	42
3.3.2.1. Crecimiento de biomasa	43
3.3.2.2. Acondicionamiento de reactores	43
3.3.2.3. Monitoreo de los reactores	43
3.3.3. Experimentos para la determinación de la cinética de crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> y de la degradación del tolueno	44
3.3.3.1. Crecimiento de biomasa	45
3.3.3.2. Cosecha de biomasa	45
3.3.3.3. Acondicionamiento de reactores	45
3.3.3.4. Monitoreo de los reactores	45
3.3.4. Experimentos para la biodegradación de tolueno en reactores de batch de 3 l	46
3.3.4.1. Monitoreo de los reactores	47
3.3.5. Experimentos para la biodegradación de tolueno en reactores de 3l en semicontinuo	48
3.3.5.1. Monitoreo de los reactores	48
3.3.6. Cuantificación de la biodegradación	49
3.3.6.1. Condiciones cromatográficas CG - EM	49
3.3.6.2. Condiciones del sistema de purga y trampa	49
4. Resultados y discusión	50
4.1. Experimentos en matraces para el estudio del crecimiento bacteriano en presencia de tolueno	50
4.2. Experimentos de crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en reactores batch de 10 l a temperatura ambiente	51
4.3. Experimentos para la determinación de la cinética de crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> y de la degradación del tolueno	56
4.4. Experimentos para biodegradación de tolueno en reactores de batch de 3 l	65

	Página
4.4.1. Sistema alimentado en batch	65
4.4.2. Sistema alimentado en semicontinuo	68
4.5. Experimentos para la biodegradación de tolueno en reactores de 3l en semicontinuo	71
4.6. Cinética del crecimiento bacteriano y de degradación del tolueno por <i>Ps. fluorescens</i>	75
4.6.1. Consideraciones matemáticas	75
4.6.2. Modelo de Haldane	76
4.6.3. Cinética del crecimiento	77
4.6.4. Cinética de degradación del tolueno	79
4.6.5. Vía de degradación del tolueno por <i>Ps. fluorescens</i>	83
4.6.6. Balance de la reacción de oxidación del tolueno	87
5. Conclusiones y recomendaciones	89
Bibliografía	92
Anexo 1. Resultados de los parámetros estimados	100
Anexo 2. Modelo de Haldane	102
2.1 Método de Hooke & Jeeves	103
2.2 Método de Runge - Kutta	107



## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Microorganismos involucrados en la degradación de contaminantes orgánicos en sistemas de tratamiento de aguas residuales	7
Tabla 2. Especies degradadoras de compuestos tóxicos	8
Tabla 3. Características del tolueno	15
Tabla 4. Tecnologías de tratamiento usadas en influentes con concentraciones de tolueno de 0-100 $\mu$ l	16
Tabla 5. Tecnologías de tratamiento usadas en influentes con concentraciones de tolueno >100 - 1000 $\mu$ l	17
Tabla 6. Tecnologías de tratamiento usadas en influentes con concentraciones de tolueno de >1-10 mg/l	17
Tabla 7. Tecnologías de tratamiento usadas en influentes con concentraciones de tolueno de >10-100 mg/l	18
Tabla 8. Preparación del medio de cultivo YPG	37
Tabla 9. Composición del medio mínimo	38
Tabla 10. Equipo analítico utilizado en el estudio de la cinética de degradación del tolueno.	40
Tabla 11. Parámetros y métodos de análisis en los reactores batch	43
Tabla 12. Resultados comparativos de la remoción de tolueno en batch en el experimento 3	64
Tabla 13. Resultados comparativos de la remoción de tolueno en batch y semi-continuo en el experimento 4	71
Tabla 14. Resultados comparativos de la remoción de tolueno en semicontinuo en el experimento 5	74
Tabla 15. Valores experimentales de $\mu$ en la cinética de crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i>	77
Tabla 16. Coeficientes cinéticos para la degradación del tolueno en este estudio	79
	77
Tabla 17. Coeficientes cinéticos reportados para el tolueno	83
Tabla 18. Producción de CO <sub>2</sub> en la degradación del tolueno por <i>Ps. fluorescens</i>	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fórmula estructural del tolueno	12
Figura 2. Vía metabólica TOL del tolueno	19
Figura 3. Vía metabólica TOD del tolueno	20
Figura 4. Curva de crecimiento bacteriano	22
Figura 5. Curva de crecimiento máximo ( $\mu_{max}$ )	26
Figura 6. Esquema de un reactor de flujo completo sin reciclaje	29
Figura 7. Comparación de las funciones de velocidad de crecimiento de Monod (no tóxico) y Haldane (Tóxico)	34
Figura 8. Diagrama de fragmentación del tolueno	84
Figura 9. Cromatograma y espectro de masas para la degradación del tolueno por <i>Ps. fluorescens</i>	85
Figura 10. Probables productos secundarios derivados de la oxidación del tolueno por <i>Ps. fluorescens</i>	86

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

	Página
Fotografía 1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> , microfotografía	11
Fotografía 2. Experimento de crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en reactores batch de 10 l	42
Fotografía 3. Experimento para la determinación de la cinética de crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> y la degradación del tolueno	44
Fotografía 4. Experimento de la biodegradación de tolueno en reactores de 3 l	47

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> a diferentes concentraciones de tolueno	51
Gráfica 2. Crecimiento de <i>Ps fluorescens</i> a diferentes concentraciones de tolueno (Turbiedad)	53
Gráfica 3. Crecimiento de <i>Ps fluorescens</i> a diferentes concentraciones de tolueno (Biomasa)	53
Gráfica 4. Crecimiento de <i>Ps fluorescens</i> a diferentes concentraciones de tolueno (D. óptica)	53
Gráfica 5. Crecimiento de <i>Ps fluorescens</i> a diferentes concentraciones de tolueno (ufc/ml)	54
Gráfica 6. Evaluación de la remoción de tolueno mediante DQO <sub>soluble</sub>	54
Gráfica 7. Control del pH en el crecimiento de <i>Ps fluorescens</i>	55
Gráfica 8. Control de temperatura durante el crecimiento de <i>Ps fluorescens</i>	55
Gráfica 9. Control de oxígeno disuelto en el crecimiento de <i>Ps fluorescens</i>	55
Gráfica 10. Cinética de la degradación de tolueno mediante C.G. E.M.	57
Gráfica 11. Cinética de la degradación de tolueno mediante DQO <sub>soluble</sub>	57
Gráfica 12. Crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en la cinética de degradación del tolueno	57
Gráfica 13. Control de oxígeno disuelto en la cinética de degradación del tolueno	57
Gráfica 14. Control del pH en la cinética de degradación del tolueno	58
Gráfica 15. Control de temperatura en la cinética de degradación del tolueno	58
Gráfica 16. Cinética de la degradación de tolueno mediante C.G. E.M.	59
Gráfica 17. Cinética de la degradación de tolueno mediante DQO <sub>soluble</sub>	59
Gráfica 18. Crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en la cinética de degradación del tolueno	59
Gráfica 19. Control de oxígeno disuelto en la cinética de degradación del tolueno	59
Gráfica 20. Control del pH en la cinética de degradación del tolueno	60
Gráfica 21. Control de temperatura en la cinética de degradación del tolueno	60
Gráfica 22. Cinética de la degradación de tolueno mediante C.G. E.M.	61
Gráfica 23. Cinética de la degradación de tolueno mediante DQO <sub>soluble</sub>	61
Gráfica 24. Crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en la cinética de degradación del tolueno	61
Gráfica 25. Control de oxígeno disuelto en la cinética de degradación del tolueno	61
Gráfica 26. Control del pH en la cinética de degradación del tolueno	62
Gráfica 27. Control de temperatura en la cinética de degradación del tolueno	62
Gráfica 28. Cinética de la degradación de tolueno mediante C.G. E.M.	63
Gráfica 29. Cinética de la degradación de tolueno mediante DQO <sub>soluble</sub>	63
Gráfica 30. Crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en la cinética de degradación del tolueno	63
Gráfica 31. Control de oxígeno disuelto en la cinética de degradación del tolueno	63
Gráfica 32. Control del pH en la cinética de degradación del tolueno	64
Gráfica 33. Control de temperatura en la cinética de degradación del tolueno	64
Gráfica 34. Cinética de la degradación de tolueno mediante C.G. E.M.	66
Gráfica 35. Cinética de la degradación de tolueno mediante DQO <sub>soluble</sub>	66
Gráfica 36. Crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en la cinética de degradación del tolueno	67
Gráfica 37. Control de oxígeno disuelto en la cinética de degradación del tolueno	67
Gráfica 38. Control del pH en la cinética de degradación del tolueno	67
Gráfica 39. Control de temperatura en la cinética de degradación del tolueno	67
Gráfica 40. Degradación de tolueno mediante C.G.- E.M. en semicontinuo	69
Gráfica 41. Degradación de tolueno mediante DQO <sub>soluble</sub> en semicontinuo	69
Gráfica 42. Crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en la degradación de tolueno en semicontinuo	69

	Página
Gráfica 43. Control de oxígeno disuelto en la degradación de tolueno en semicontinuo	70
Gráfica 44. Control de pH en la degradación de tolueno en semicontinuo	70
Gráfica 45. Control de temperatura en la degradación de tolueno en semicontinuo	70
Gráfica 46. Degradación de tolueno mediante C.G.- E.M. en semicontinuo	72
Gráfica 47. Crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> en la degradación de tolueno en semicontinuo	73
Gráfica 48. Control de oxígeno disuelto en la degradación de tolueno en semicontinuo	73
Gráfica 49. Control de pH en la degradación de tolueno en semicontinuo	73
Gráfica 50. Control de temperatura en la degradación de tolueno en semicontinuo	74
Gráfica 51. Cinética de crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i> (experimental)	78
Gráfica 52. Cinética de crecimiento de <i>Ps. fluorescens</i>	78
Gráfica 53. Cinética de degradación de tolueno por <i>Ps. fluorescens</i>	79
Gráfica 54. Cinética de degradación de tolueno por <i>Ps. fluorescens</i> (Reactor con concentración de 25 mg/l)	80
Gráfica 55. Cinética de degradación de tolueno por <i>Ps. fluorescens</i> (Reactor con concentración de 50 mg/l)	80
Gráfica 56. Cinética de degradación de tolueno por <i>Ps. fluorescens</i> (Reactor con concentración de 75 mg/l)	81
Gráfica 57. Cinética de degradación de tolueno por <i>Ps. fluorescens</i> (Reactor con concentración de 100 mg/l)	81

## RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la capacidad de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* en condiciones aerobias para degradar tolueno, utilizándolo como única fuente de carbono y energía, en un sistema batch y en semicontinuo.

Se realizaron cinco etapas de experimentación. En las dos primeras se estudió el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en diferentes condiciones experimentales. En la tercera, se determinó la cinética de crecimiento y de consumo de sustrato. En la cuarta y quinta se evaluó el sistema en semicontinuo.

En el Experimento 1, se estudió el crecimiento de la bacteria en matraces cerrados y con agitación de 200 r.p.m. a 35°C. Se observaron curvas de crecimiento típicas a concentraciones de 20 y 40 mg/l de tolueno. A concentraciones de 90 y 180 mg/l de tolueno, se presentó inhibición del crecimiento.

En el Experimento 2, se estudió el crecimiento de la bacteria en reactores de 10 l, y se llevó simultáneamente un control abiótico para evaluar los efectos de la desorción. En las concentraciones de 25 y 50 mg/l de tolueno, se observaron curvas típicas de crecimiento, pero a concentraciones de 100 y 200 mg/l del sustrato se inhibió el crecimiento.

En el Experimento 3, se estudió la cinética de crecimiento y consumo de sustrato de *Ps. fluorescens* en la fase exponencial del sistema batch, utilizando para el ajuste de datos experimentales el modelo de Haldane ya que el efecto del sustrato sobre la población bacteriana fue de tipo inhibitorio. También se determinó la cinética de consumo del sustrato.

En el Experimento 4, se utilizaron reactores de 3l; la concentración alimentada fue de 500 mg/l de tolueno, el experimento se llevó a cabo primero en batch y después en semicontinuo con alimentación de 500 mg/l de tolueno cada 24 horas. En el sistema en batch, la desorción después de 30 minutos de la alimentación de tolueno fue del 96.56 % en los reactores biótico y abiótico; la concentración residual de tolueno fue de 16.91 mg/l en ambos reactores. En el reactor biótico la remoción por biodegradación de ésta concentración residual fue del 99.99 % y en el reactor abiótico la remoción por desorción fue del 88.85 %. En el sistema en semicontinuo, en el reactor biótico la remoción por biodegradación fue del 92.87 % y en el reactor abiótico la remoción por desorción fue del 68.64%, con un tiempo retención hidráulica de 24 horas.

En el Experimento 5, el sistema fue alimentado en semicontinuo con una concentración de 500 mg/l de tolueno cada 24 horas, utilizando reactores de 3l. La desorción 30 minutos después de cada alimentación fue del 93.42 %; la remoción de la concentración residual del tolueno por biodegradación fue del 87.86 %. En el reactor abiótico se observó acumulación del tolueno a concentración hasta de 197.73 mg/l; la desorción fue del 75.67%, con un tiempo de retención hidráulica de 24 hrs.

La ecuación de Haldane se resolvió utilizando el método de regresión no lineal de Hooke y Jeeves, para la determinación de los coeficientes cinéticos y el método numérico de Runge Kutta para la integración numérica de la ecuación de Haldane.

Los coeficientes cinéticos que se determinaron fueron :  $\mu_{max} = 0.4252 \text{ hr}^{-1}$ ,  $K_s = 19.40 \text{ mg/l}$ ,  $K_i = 1.12 \text{ mg/l}$ ,  $Y_{prom} = 3.34 \text{ mg de biomasa / mg de tolueno}$ .

La cepa de *Ps. fluorescens* mostró ser eficiente en la degradación del tolueno utilizándolo como fuente de carbono y energía para el desarrollo de sus funciones metabólicas.

## INTRODUCCIÓN

El incremento en el deterioro de la calidad del agua, ha sido ocasionado por el alto contenido de contaminantes producidos por el hombre a través del avance industrial. La industrialización y el desarrollo de la vida urbana asociado con ésta han dado como resultado la introducción de una amplia gama de compuestos químicos en el ambiente, lo que actualmente es reconocido como una amenaza extrema a la capacidad de autorregulación de la biosfera.

Un inventario reciente de la Comunidad Europea enumera más de 100 000 diferentes sustancias, de las cuales 30 000 fueron consideradas como un peligro para el ambiente y la salud humana por ser compuestos bioacumulativos, recalitrantes y/o tóxicos (Ramírez et al. 1995).

La industria ha alcanzado gran desarrollo y con ello un aumento en la generación de aguas residuales. La industria de síntesis orgánica inició a principios de éste siglo con la extracción y refinación del petróleo y su desarrollo ha conducido a la proliferación de gran número y variedad de sustancias orgánicas complejas con características tóxicas, carcinogénicas, mutagénicas o teratogénicas que pueden tener efectos adversos para el hombre y el ambiente en situaciones de exposición no controladas. Ciento catorce de estos compuestos se consideran de control prioritario para la protección del ambiente y la salud humana (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, 1980). Las industrias más importantes de este giro industrial son: la industria químico-farmacéutica, polímeros y resinas sintéticas, detergentes, industria petroquímica, insecticidas, plaguicidas y pinturas.

Las aguas residuales de estas industrias tienen como características elevada carga orgánica y toxicidad, que requieren procesos específicos de tratamiento para la reducción y condensado de los tóxicos orgánicos a niveles permisibles de descarga.

Esta problemática tiene dos aspectos: primero, la disposición inapropiada de los residuos peligrosos y de las descargas no controladas con respecto al contenido de tóxicos, que han afectado grandemente al medio ambiente, donde es necesaria la aplicación de medidas para la remediación de la contaminación provocada y la recuperación de los sistemas afectados. Segundo, existe la necesidad de prevenir la agudización de los problemas.

En los Estados Unidos en 1977, el Congreso ratificó la Federal Water Control Act (Ley de Agua Limpia), para tratar el creciente interés sobre la toxicidad en las aguas; pero es hasta 1987 con la reautorización de la misma, cuando se fortaleció la legislación existente para descargas de aguas residuales con tóxicos, lo que originó la búsqueda de nuevas tecnologías de tratamiento y la optimización de las existentes para cumplir con los parámetros fijados por las normas. En México las sustancias orgánicas tóxicas se controlan por medio de condiciones particulares de descarga.

La estrategia utilizada hasta el momento para el tratamiento de estas descargas es: tratamiento terciario, modificaciones a los procesos biológicos de tratamiento, combinaciones con procesos físico-químicos o procesos biotecnológicos avanzados como el uso de microorganismos específicos, enzimas o microorganismos genéticamente modificados.

El tratamiento de las aguas residuales debe incluir la remoción de compuestos orgánicos tóxicos recalcitrantes de los efluentes residuales, sobre todo de los industriales y evitar la propagación de la contaminación al ambiente o el transporte costoso de estas sustancias a los rellenos sanitarios o a los confinamientos.

La creciente concientización pública y política con respecto a los efectos del manejo inadecuado de residuos, basado en dilución, entierro o incineración, ha llevado a considerar la necesidad de incorporar la remoción de los compuestos tóxicos y recalcitrantes a aspectos preventivos y correctivos de la estrategia del control de la contaminación ambiental.

El desarrollo de la biotecnología ha demostrado que la biodegradación de compuestos orgánicos específicos es una alternativa realista para el control de la contaminación. El uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos, puede ser aplicable en dos campos afines de la ingeniería ambiental, i.e. el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales y la biorremediación de suelos y acuíferos.

La tecnología de biodegradación de tóxicos por medio de microorganismos inmovilizados o en suspensión, ha demostrado ser una herramienta en la solución del problema del agua residual industrial con compuestos tóxicos orgánicos.

En el presente estudio se determinó la capacidad de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* para degradar tolueno, compuesto orgánico volátil clasificado como contaminante prioritario de acuerdo a la clasificación de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA).

En el capítulo 1 se encuentran los aspectos relevantes del tratamiento biológico. En el capítulo 2, los fundamentos del crecimiento bacteriano y la cinética de la degradación de compuestos tóxicos. En el capítulo 3, el desarrollo experimental del trabajo. El capítulo 4 presenta los resultados y análisis de los experimentos realizados y en el capítulo 5, las conclusiones y recomendaciones del estudio.

En el anexo 1 se encuentra el programa en lenguaje C, utilizado para obtener las constantes cinéticas y resolver la ecuación de Haldane. En el anexo 2, las tablas de resultados obtenidos con el programa.

## JUSTIFICACIÓN

Las aguas residuales de los procesos de síntesis orgánica, contienen alta carga orgánica y compuestos tóxicos recalcitrantes que presentan efectos de bioacumulación, causando efectos nocivos al medio ambiente y a la salud humana.

Actualmente los municipios e industrias que colectan y tratan aguas residuales tienen que cumplir con normas de calidad de agua cada vez más estrictas en relación a las emisiones de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) a la atmósfera (Corsi y Birkett, 1995), debido a que :

- a) Son altamente reactivos en aires urbanos y contribuyen a la producción de elevados niveles de ozono.
- b) Son relativamente inertes en la troposfera pero actúan de manera similar a los clorofluorocarburos en la deflexión del ozono estratosférico.
- c) La acumulación de VOC's en espacios confinados por ejemplo, atmósferas de drenajes, contribuyen a los riesgos de explosión.

Los VOC's por ejemplo el tolueno, es considerado como contaminante prioritario en agua, clasificado como sustancia peligrosa y desecho peligroso, de acuerdo a la clasificación de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA). Es un contaminante tóxico del aire, agua y suelo que producen riesgos crónicos a la salud de empleados de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales o de industrias y al público en general. El límite máximo permisible de concentración de vapor de tolueno en el aire es de 0.75 mg/l. ya que en este límite hay pérdida de la facultad de coordinación de movimiento y se hace más lento el tiempo de reacción; produce irritación de ojos y piel y efectos narcóticos (Enc. Tec. Quim. Vol. 15 ).

El uso de procesos biológicos para el tratamiento de residuos tóxicos o inhibitorios ofrece gran ventaja sobre las tecnologías de tratamiento alternativas como son los tratamientos físico-químicos e incineración. Los sistemas biológicos no sólo son capaces de detoxificar residuos, sino también de completar la oxidación de la materia orgánica tóxica a productos finales simples como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$  y biomasa. Existen varias cepas bacterianas particularmente del género *Pseudomonas* capaces de degradar compuestos xenobióticos. En los trabajos de Vecht et al (1988), observaron el crecimiento de *Ps. putida* utilizando tolueno como única fuente de carbono y energía; Suzuki et al (1990), encontraron que *Ps. putida* codifica las enzimas para el catabolismo oxidativo del tolueno; Duetz et al (1994), trabajaron con cepas de *Ps. putida mt-2*, *Ps. cepacia G4*, *Ps. mendocina KR1* y *Ps. putida* para degradar tolueno por diferentes vías metabólicas.

En México, el conocimiento de ésta tecnología de tratamiento es escaso y se deben establecer líneas de investigación con el propósito de establecer estudios de vanguardia en el área que ayuden a resolver los problemas que se producen en los efluentes industriales debido a productos que no son fácilmente biodegradables, tales como los compuestos aromáticos que requieren de la manipulación de microorganismos seleccionados para su degradación.



La biodegradación es la tecnología de tratamiento de mejor costo-efectivo para remover compuestos orgánicos del agua residual y es el principal mecanismo responsable de su remoción en la naturaleza ( Naziruddin et al, 1995).

La información sobre la cinética de biodegradación es esencial durante el diseño del sistema de tratamiento y para el proceso de establecer límites de descarga de éstos compuestos al medio ambiente. Consecuentemente es necesaria una base de datos sobre parámetros cinéticos de biodegradación. La mayoría de los datos publicado es información cualitativa, y si es cuantitativa los valores de los parámetros no son intrínsecos, limitando su aplicación.

Es importante señalar que algunos contaminantes orgánicos clasificados como tóxicos en sentido regulatorio pueden ser metabolizados por microorganismos, pero pueden inhibir la velocidad de crecimiento de las poblaciones aclimatadas a concentraciones relativamente altas de sustrato, por lo que en el tratamiento biológico algunos tóxicos orgánicos podrían ser designados como orgánicos inhibitorios.

## HIPÓTESIS

La cepa de *Pseudomonas fluorescens* es capaz de degradar tolueno utilizándolo como única fuente de carbono y energía, siguiendo una cinética de tipo inhibitorio.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* para la degradación del tolueno, compuesto orgánico volátil, tóxico y recalcitrante que inhibe los sistemas de tratamiento biológico y determinar la cinética de crecimiento y consumo de sustrato de la bacteria.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el crecimiento de la cepa de *Ps. fluorescens* en diferentes condiciones experimentales de temperatura y concentración de tolueno.
2. Determinar la remoción de tolueno por *Ps. flourescens* en un sistema en batch y en semicontinuo.
3. Determinar la cinética de crecimiento de *Ps. fluorescens* y de consumo de sustrato.
4. Implementar el método de cromatografía de gases - espectroscopia de masa por purga y trampa para la determinación de concentraciones residuales de tolueno
5. Proponer la vía metabólica de degradación del tolueno por *Ps. fluorescens*.
6. Probar la aplicación de un programa de computadora para resolver los modelos de Monod y de Haldane para la evaluación de la cinética obtenida.

## 1. TRATAMIENTO BIOLÓGICO

### 1.1. Aplicación de los procesos biológicos

El tratamiento biológico ha sido muy exitoso en la remoción de contaminantes orgánicos en estado disuelto y coloidal de las aguas residuales. El propósito del tratamiento biológico es convertir estos contaminantes, en general de estructuras complejas, en productos finales simples ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ) y un material sedimentable (biomasa), el cual puede ser fácilmente removido del sistema.

La mayoría de los procesos biológicos convencionales de tratamiento de agua están basados en fenómenos biológicos que ocurren en forma natural, pero son llevados a cabo en bioreactores a mayores velocidades. En estos procesos los principales biodegradadores son las bacterias, pero también es importante el papel de otros microorganismos, como son los protozoarios, rotíferos, hongos y algas.

La dinámica de la población bacteriana en los procesos de tratamiento biológico depende de varios factores ambientales incluyendo pH, temperatura, tipo y concentración del sustrato, aceptores de hidrógeno, disponibilidad y concentración de los nutrientes y micronutrientes esenciales tales como nitrógeno, fósforo y algunos minerales, la presión osmótica, la toxicidad del medio o de los productos intermedios, el nivel y el tipo de mezclado.

Dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno, los procesos biológicos pueden ser aerobios, anaerobios o combinados. Los microorganismos aerobios utilizan oxígeno como aceptor terminal de electrones para la respiración aerobia. El oxígeno molecular es requerido como co-sustrato para la degradación microbiana de una amplia variedad de compuestos químicos orgánicos, incluyendo hidrocarburos y anillos aromáticos. Aunque los microorganismos aerobios parecen tener alta afinidad por el oxígeno disuelto, se han notado efectos de la limitación de oxígeno sobre la actividad microbiana (Shaler et al, 1986).

Existen sistemas biológicos de tratamiento en los cuales los microorganismos están en suspensión, tales como lodos activados convencionales y sus modificaciones, lagunas aereadas y de estabilización, diferentes tipos de digestores anaerobios y también sistemas de biopelícula fija, como son los biofiltros y los biodiscos.

Para la realización de los procesos biológicos se utilizan fundamentalmente tres tipos de reactores: batch o en lote, continuos de mezcla completa y de flujo pistón. Estas tecnologías han encontrado una amplia aplicación inicialmente para el tratamiento de aguas residuales domésticas y después para el tratamiento de efluentes industriales de alto contenido de materia orgánica.

En un principio la aplicación de los sistemas biológicos fue exclusivamente dirigida hacia la remoción de la materia orgánica contenida en el agua (medida con los parámetros

convencionales de demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos) y a la estabilización de lodos residuales. La tecnología operaba en su inicio como una caja negra y la eficiencia de los procesos frecuentemente era baja.

La mayor parte de los procesos biológicos trabajaban en forma óptima solamente durante dos tercios del tiempo (DSTI/STP/BE, 1993). Esto creó la necesidad de optimizar y desarrollar sistemas de medición confiables, controlar los procesos, estudiar los mecanismos de los mismos, desarrollar modelos para pronosticar los resultados y diseñar mejor los sistemas. Como resultado fueron desarrollados procesos modificados, reactores y sistemas mas efectivos.

Posteriormente, el desarrollo tecnológico fue enfocado hacia la remoción de nitrógeno y fósforo. El entendimiento de que la desnitrificación era un proceso anóxico, permitió realizar modificaciones del reactor biológico convencional y mediante una combinación de zonas aerobias y anóxicas se lograron desarrollar diferentes sistemas donde se combinaba la reducción de la materia orgánica con la remoción de nitrógeno y posteriormente con la de nitrógeno y fósforo. Ésta de hecho, fue la primera aplicación de microorganismos especializados en la biotecnología del tratamiento.

Desde que se conoció el efecto de muchos compuestos tóxicos y refractarios en aguas residuales, el foco del desarrollo tecnológico ha sido extendido hacia la reducción de la toxicidad y la degradación de compuestos orgánicos complejos. Este último enfoque presentó la necesidad de analizar en detalle los procesos de biodegradación, estudiar el comportamiento, la capacidad y la cinética de biodegradación de compuestos específicos, desarrollar pruebas para identificar los efectos de bioinhibición, el proceso de adaptación de microorganismos, estudiar las actividades metabólicas y genéticas de las diferentes especies de microorganismos y su interacción en la comunidad microbiana que lleva a cabo el proceso de biodegradación.

Actualmente en la literatura se han reportado un buen número de trabajos, en los que por medio de los procesos biológicos se tratan aguas residuales muy complejas, con altas cargas orgánicas y aún con valores altos de toxicidad (Beltrán, 1994).

## **1.2. Condiciones de crecimiento bacteriano**

El principal objetivo de los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales es remover la materia orgánica disuelta y coloidal. La biodegradación ocurre debido a la capacidad de los microorganismos para producir dióxido de carbono y/o metano, agua y energía. Para poder llevar un control adecuado del proceso de tratamiento biológico es fundamental conocer qué son los microorganismos, cuáles son las condiciones básicas de su crecimiento, cómo funcionan, cuál es su estructura y actividades bioquímicas, así como cuál es la naturaleza de la materia orgánica de que están constituidos.

Actualmente la clasificación de los seres vivos más aceptada es aquella propuesta por Whittaker (1969) en la que se divide a los seres vivos en cinco reinos: monera, protista, vegetales, animales y hongos.

Las células están constituidas por :

- Pared celular, que es una membrana flexible o rígida.
- Flagelos o cilios, si las células son móviles. Los flagelos y los cilios son apéndices de apariencia capilar.
- El interior de las células contienen una suspensión coloidal de proteínas, carbohidratos y otros compuestos orgánicos complejos, llamado citoplasma. Cada célula contiene ácidos nucleicos, producto hereditario vital para la reproducción. La región citoplasmática contiene ácido ribonucleico (ARN), cuya misión principal consiste en la síntesis de proteínas.

En el interior de la pared celular se halla la región del núcleo, rica en ácido desoxirribonucleico (ADN) que contiene toda la información necesaria para la reproducción de todos los componentes de la célula. En algunas células el ADN está cubierto por una membrana y el núcleo queda claramente definido. Estas células se denominan células eucarióticas. En otras el núcleo no está bien definido y se denominan células procarióticas.

A fin de continuar sus funciones vitales adecuadamente, un organismo debe tener una fuente de energía y de carbono para la síntesis de nueva materia celular. Los elementos inorgánicos, tales como el nitrógeno y el fósforo son vitales para la síntesis celular. Son necesarios también en concentraciones menores el azufre, el potasio, el calcio y el magnesio.

Dos de las fuentes más comunes de carbono celular para los microorganismos son el bióxido de carbono y el carbono de la materia orgánica. Si un organismo obtiene su carbono celular a partir de bióxido de carbono se le llama autótrofo y si utiliza carbono orgánico, heterótrofo.

La energía es también necesaria para la síntesis de nueva materia celular. En los microorganismos autótrofos, la energía puede proporcionarla el sol, como en la fotosíntesis, o en una reacción orgánica de oxidación-reducción. Si la energía utilizada es la solar al microorganismo se le llama autótrofo fotosintético. Si es proporcionada por una reacción inorgánica de oxidación-reducción se le conocerá por el nombre de autótrofo quimiosintético. Los heterótrofos reciben la energía requerida para la síntesis celular de la oxidación o fermentación de la materia orgánica.

### **1.3. Degradación de compuestos tóxicos**

#### **1.3.1. Biodegradabilidad**

La conversión completa de un compuesto orgánico a los productos finales como bióxido de carbono y agua, es denominada **mineralización**. Un compuesto es biodegradable cuando puede ser convertido por la acción de los microorganismos a otro compuesto. No siempre la biodegradación de un compuesto en los procesos de tratamiento biológicos es

completa, éstos pueden ser simplemente transformados a otros, llamados metabolitos intermedios. En ocasiones, parte de la remoción de algunas sustancias se debe a su bioadsorción en la biomasa, la cual posteriormente es separada del sistema.

La persistencia es un estado condicional de los compuestos biodegradables, en el cual éstos no pueden ser degradados por la ausencia de condiciones y factores adecuados que hagan posible la biodegradación.

Los compuestos orgánicos que no pueden ser oxidados o reducidos bajo ninguna circunstancia ambiental se clasifican como **refractarios o recalcitrantes**. Se consideran altamente recalcitrantes por ejemplo, los pesticidas. En ésta categoría están muchos compuestos aromáticos halogenados y poliaromáticos. Existen sin embargo, microorganismos que son capaces de transformar un gran número de compuestos clasificados como recalcitrantes para la mayoría de los microorganismos, a compuestos que pueden ser utilizados por otras especies de una comunidad microbiana.

En general, son más fácilmente degradables los compuestos solubles que los insolubles. Las moléculas orgánicas que pueden atravesar la membrana celular, pueden ser degradados más rápidamente. Los compuestos con enlaces no saturados se degradan más fácilmente que los compuestos con enlaces saturados. Los compuestos tales como alcoholes, aldeídos, ácidos, amidas y aminoácidos son más biodegradables que los correspondientes alcanos, alquenos, cetonas, ácidos dicarboxílicos, aminas y los cloroalcanos.

Algunos compuestos orgánicos son tóxicos a las bacterias en concentraciones menores que las letales. Una gran parte de los compuestos recalcitrantes presentan toxicidad a los microorganismos en los sistemas de tratamiento biológico.

Los pesticidas no biodegradables y otros compuestos orgánicos pueden ser parcialmente transformados y en su degradación se pueden formar compuestos intermedios tóxicos, a veces más tóxicos que los originales. Si estas transformaciones son inevitables, se requerirá un proceso de tratamiento adicional, como por ejemplo la adsorción con carbón activado.

### 1.3.2. Bases de la biodegradación

La biodegradación ocurre debido a la capacidad de los microorganismos de metabolizar la materia orgánica mediante sistemas enzimáticos para producir bióxido de carbono, agua y energía, si ésta se realiza en medio aerobio. La energía es utilizada para el crecimiento, la reproducción, la movilidad y la respiración de los microorganismos.

La materia disuelta es absorbida dentro de las células y oxidada, para convertir las moléculas orgánicas más complejas, tales como las proteínas y las grasas, a una forma soluble y adsorbible, para lo que las células excretan extracelularmente enzimas que hidrolizan estos compuestos. De aquí que la materia orgánica más compleja necesita más tiempo para ser procesada.

En un proceso biológico, la descomposición de los constituyentes del agua residual se realiza mediante una o más vías, las cuales pueden incluir un número grande de compuestos intermediarios. Cada paso en este proceso incluye un sistema enzimático

especifico, constituido por una o varias enzimas las cuales son catalizadores orgánicos y que son producidas por los microorganismos.

Químicamente las enzimas son proteínas combinadas con una molécula inorgánica o con una molécula orgánica de bajo peso molecular. Si la producción de una de las enzimas requeridas es inhibida por la presencia de alguna sustancia química, la cadena de reacciones puede ser bloqueada y puede ocurrir acumulación de un compuesto intermedio.

Los inhibidores del tratamiento biológico no necesariamente tienen que estar presentes en el sustrato inicial, éstos pueden ser producidos en el mismo proceso mediante biotransformación y mediante la producción de metabolitos cuya velocidad de descomposición es significativamente más baja que la velocidad de su formación.

Las vías enzimáticas requeridas para la descomposición de los carbohidratos, las proteínas y las grasas son muchas, por lo cual no tienen lugar las inhibiciones en la oxidación biológica de estos sustratos comunes. Sin embargo, la oxidación de algunas sustancias orgánicas presentes en los efluentes industriales pueden incluir mecanismos enzimáticos selectivos que pueden ser fácilmente inhibidas mediante el bloqueo de al menos una de las reacciones involucradas.

Es posible sin embargo, identificar varios compuestos (factores de crecimiento), los cuales efectivamente evitan este bloque de las reacciones enzimáticas respectivas, cuando son añadidos en pequeñas cantidades al reactor, y de esta forma aceleran la descomposición biológica. Es por esto que algunos efluentes industriales son más fáciles de tratar mezclados con otros afluentes que contengan estos compuestos.

Para mejorar la operación del tratamiento biológico de los efluentes industriales a veces se recomiendan algunos aditivos-biocatalizadores comercialmente disponibles. Estos aditivos generalmente contienen una mezcla de enzimas grado técnico, masa bacteriana seca y productos intermedios de fermentación bacteriana. La aplicación de estos aditivos sin previo estudio de la dinámica de la población y del metabolismo microbiano y sin el control de los sistemas, puede incurrir en aumentos substanciales de los costos sin una aportación de gran valor.

### **1.3.3. Biodegradación de xenobióticos recalcitrantes y tóxicos**

Los estudios sobre la biodegradación de contaminantes específicos presentes en las descargas de algunos sectores industriales empiezan en los años 60 - 70's. En los casos de degradación de hidrocarburos y detergentes, la adición de co-sustratos y nutrientes a sistemas de lodos activados han sido exitosamente utilizados para estimular el proceso de degradación.

Está bien documentada la biodegradabilidad aerobia de aromáticos sustituidos, los anillos de los cuales son transformados a derivados dihidroxilados mediante mono y dioxidación antes del rompimiento del anillo ( Hayaishi, 1964; Dagley, 1975; Fewson, 1981; Gibson y Subramanian, 1984.). También existe información disponible sobre biodegradación anaerobia de algunos aromáticos sustituidos que siguen vías reductivas (Evans, 1977; Balba y Evans, 1980; Healy et al., 1980; Boyd y Shelton, 1984).

Gran cantidad de estudios sobre biodegradación aerobia y anaerobia han demostrado que en un ambiente de sustrato múltiple, los compuestos estructuralmente relacionados tienen un efecto similar sobre la velocidad metabólica neta (Zollinger, 1966; Chou et al., 1978; Haller and Finn, 1978; Deshpande and Chakrabarti, 1988; Godbole and Chakrabarti, 1991).

Muchos autores observaron y describieron los efectos de antagonismo y sinergismo en los sistemas de tratamiento. Bauer y Capone (1988) demostraron que el naftaleno estimula la biodegradación del fenantreno pero no la del antraceno. Arvin et al (1989), demostraron la interacción de sustratos aromáticos durante la biodegradación del benceno. Los autores reportan que el tolueno y el xileno tuvieron un efecto antagónico sobre la utilización del benceno. Smith et al (1991), observaron inhibición completa del crecimiento de *Pseudomonas sp.* en una mezcla de bifenilo y etilbenceno, aunque ambos compuestos son biodegradables cuando están presentes individualmente.

Latkar M. y Chakrabarti (1994), estudiaron la degradación anaerobia de tres fenoles dihidrónicos (resorcinol, catecol e hidroxiquinona) en sustratos mono y binarios en tres reactores anaerobios de película fija y flujo ascendente aclimatados a éstos compuestos hidroxí-aromáticos. Se llegó a la conclusión de que el resorcinol, el catecol y la hidroxiquinona son fácilmente degradables en condiciones anaerobias.

Además del aspecto de biodegradabilidad de compuestos específicos, los estudios se han desarrollado también en el aspecto de la identificación de los microorganismos que constituyen la biocomunidad en los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, sus interacciones y capacidad de biodegradación. Hasta el momento, más del 80 % de las especies presentes en estas comunidades necesitan todavía ser aislados e identificados (DSTI/STP/BE, 1993).

El crecimiento y la predominancia de algunas especies de microorganismos son determinados por muchas circunstancias incluyendo el tipo de la materia orgánica en los efluentes y la velocidad del metabolismo, entre otros.

La predominancia de ciertos microorganismos puede ser un indicador de la presencia de algún contaminante específico y de la eficiencia de tratamiento. La tabla 1 muestra algunos microorganismos involucrados con la degradación de contaminantes orgánicos.



CONTAMINANTE	MICROORGANISMOS
Hidrocarburos del petróleo	Más de 200 especies de bacterias, levaduras y hongos
Pesticidas/herbicidas del tipo ciclodieno (Aldrin, Dieldrin)	<i>Zylerion xilestrix</i>
Pesticidas / herbicidas del tipo organofosforados (paratión, malatión)	<i>Pseudomonas sp.</i>
2,4 - D	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Athobacter sp.</i>
DDT	<i>Penicillium sp.</i>
Cetona	<i>Pseudomonas sp.</i>
ácido piperonílico	<i>Pseudomonas sp.</i>
Bis (2-etilhexil)ftalato	<i>Serratia marcescens</i>
Dimetilnitrosamina	Bacterias fotosintéticas
Etilbenceno	<i>Nocerdisa tartaricans</i>
Pentaclorofenol	<i>Pseudomonas sp.</i>
Efluentes fenólicos de fabricación de pulpa y papel	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Athrobacter sp.</i> <i>Chromobacter sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Xanthomonas sp.</i>
Residuos de celulosa en el agua residual municipal	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Thermonosporta</i>

TABLA 1. Microorganismos involucrados en la degradación de contaminantes orgánicos en sistemas de tratamiento de aguas residuales (Ramírez et al, 1995).

Se ha visto que muchos microorganismos pueden usar compuestos xenobióticos para su crecimiento o degradarlos por varios mecanismos. En la tabla 2 se presentan algunas especies degradadoras de diferentes compuestos, reportadas en la literatura.

Los trabajos de aislamiento e identificación se enfocaron primero a los microorganismos capaces de degradar compuestos tóxicos orgánicos. Como resultado, en la literatura se han reportado muchas especies capaces de degradar tóxicos específicos, ya sea dentro de un sistema de lodos activados o bien aisladamente. Entre ellas encontramos los géneros *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Nitrosomonas*, *Rhodococcus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Staphylococcus*, *Desulfovibrio*, *Azetobacterium pelobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Citrobacter* y *Achromobacter* (Mijailova et al, 1997).

En la degradación de fluoreno (uno de los 16 hidrocarburos policíclicos, considerados como prioritarios), se ha identificado a *Arthrobacter sp.*, aislada de un sistema de lodos activados de una refinería de petróleo (Grifoll, 1992).

La degradación completa del ácido 4-clorobenzoico, se ha realizado en condiciones aerobias por el género *Acinetobacter sp.*, aislado de una muestra de suelo (Tobita, 1992).

Microorganismos	Compuesto Tóxico	Referencia
<i>Acinetobacter, sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ácido 4-clorobenzoico</li> </ul>	Tobita y Lyobe, 1992
<i>Alcaligenes, sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>4-clorofenol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Balfanz y Rehm, 1981</li> <li>Westmeir y Rhem, 1987</li> </ul>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mono y diclorofenoles</li> <li>ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Haggbiom, 1992</li> <li>Stenstrom, 1989</li> <li>Haggbiom, 1992</li> </ul>
<i>Arthrobacter, sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>fluoreno</li> <li>naftaleno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Haigler y Spain, 1993</li> <li>Ortega-Calvo y M. Alexander, 1994</li> </ul>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>fenoles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bubhan, et al, 1995</li> </ul>
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>p-nitrofenol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Heitkamp, et al, 1990</li> </ul>
<i>Pseudomonas, sp</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ácidos aromáticos sulfónicos (ac. sulfónico-piridínico y ac. sulfónico de tolueno, ac. sulfónico bencénico)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Worizan y Clark, 1993</li> </ul>
<i>Pseudomonas pickettii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Triclorofenos y sus derivados clorados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kiyohara et al, 1992</li> </ul>
<i>Pseudomonas putida</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2,3 y 4 clorofenol</li> <li>fenol</li> <li>4-clorofenol</li> <li>mezcla de fenol y 4-clorofenol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Depaha y Hill, 1992</li> <li>Sáez, 1992</li> </ul>

Tabla 2. Especies degradadoras de compuestos tóxicos

Una razón por la cuál las bacterias son eficientes en la biodegradación es que éstas son capaces de degradar orgánicos diferentes a los compuestos que ellos normalmente utilizan. Muchos compuestos inertes bioquímicamente, tales como los alcanos, las estructuras de anillo saturado y el benceno no sustituido no tienen oxígeno y no son sujetos a reacciones de hidrogenación. La habilidad de las bacterias para utilizar estos compuestos se basa en el hecho de que estas pueden catalizar la oxidación utilizando oxígeno.

De lo anterior se puede concluir que en el desarrollo de un proceso de tratamiento biológico y en el diseño de los reactores son de gran importancia la fisiología de las comunidades que participan en el proceso de degradación y las actividades metabólicas y genéticas que controlan la capacidad y la expresión de estas actividades.

#### 1.4. Importancia de las cepas puras en la degradación de compuestos tóxicos

Desde que los microbiólogos llegaron a interesarse en aspectos de biodegradación de químicos antropogénicos, se han detectado un gran número de cepas capaces de degradar sustancias problemáticas. En muchos casos, la enzima responsable del proceso de biodegradación y su codificación genética se conocen.

Se han aplicado distintas cepas para el tratamiento de contaminantes líquidos y sólidos. El problema es que bajo condiciones prácticas, la sustancia de interés en la mayoría de

los casos, se encuentra mezclada con otros materiales degradables. Muchos de estos substratos concomitantes podrían ser mucho más atractivos para los microorganismos especializados que la sustancia de interés. Asimismo, el substrato podría no estar disponible permanentemente y variar ampliamente en concentración. Como resultado, la selección podría no ser la adecuada y la capacidad especial metabólica de los microorganismos podría desaparecer rápidamente. Más aún, la cepa que posee la capacidad especial degradativa podría no ser capaz de competir exitosamente con otros microorganismos y además competir con la actividad de los predadores.

Los microorganismos “especialistas” y sus propiedades degradativas pueden ser mantenidas en cultivos mixtos, y dependen de las condiciones del influente y de los métodos de control de proceso aplicados. Los hallazgos de Cook (1990) confirman esta teoría.

Los microorganismos “especialistas” y sus capacidades desaparecen rápidamente cuando se agregan a cultivos microbianos mixtos. Las ventajas selectivas deben ser de acuerdo a favorecer la sobrevivencia y crecimiento de cualquier especialista. En este contexto, se debe tener atención especial al proceso periódicamente, ya que se ha demostrado por varios autores que los cambios periódicos de condiciones ambientales seleccionadas, son significativos para un buen control de los grupos de actividad específica de microorganismos en comunidades microbianas mixtas, (Rubio et al., 1986; Wilderer et al., 1987).

Para identificar exitosamente a un microorganismo como responsable del proceso de biodegradación, se debe asegurar que sólo su género está presente en el cultivo, esto es que el cultivo debe ser puro (axénico). Con material tan pequeño como son los microorganismos, estar seguro de la pureza no es fácil; Koch puntualizó la importancia de los cultivos puros, desarrollando diversos métodos para obtenerlos, el más útil de los cuales ha sido el que emplea la separación de colonias aisladas (Brock, 1991).

Con base en estas consideraciones, las velocidades de descomposición de los compuestos xenobióticos recalcitrantes y tóxicos pueden ser aceleradas utilizando cepas puras adaptadas, las cuales pueden tener las siguientes aplicaciones concretas:

- a) Intensificar los procesos biológicos, aumentando la capacidad de tratamiento de una planta u optimizando la degradación de compuestos específicos.
- b) Auxiliar en la sana operación del proceso cuando existen problemas como el exceso de grasas, almidón, celulosa, proteínas o carbohidratos.
- c) Eliminar con mejores capacidades los compuestos tóxicos refractarios, tales como polihalogenados, fenólicos, cianuros, alilaminas e hidrocarburos en general.
- d) Aumentar la capacidad de los sistemas para la eliminación de nutrientes específicos, como el nitrógeno y fósforo.

Muchos microorganismos utilizan compuestos xenobióticos para crecer y degradan estos compuestos por varios mecanismos tales como el cometabolismo. La degradación se lleva a cabo en condiciones aerobias o anaerobias, dependiendo del código genético del organismo y las condiciones ambientales.

Un gran número de estos tóxicos son biodegradables si inducen directamente o por medio de otros substratos la síntesis de enzimas apropiadas o si existen enzimas

microbianas que acepten estructuras similares a las de los compuestos (Hutzinger y Verkam, 1981).

El tratamiento biológico de los tóxicos, es una alternativa viable debido a que se han hecho avances considerables en los estudios de la biodegradabilidad y en el desarrollo de la biotecnología (Grady, 1989).

Otra ventaja de la biodegradación es el potencial para lograr la completa mineralización, o por lo menos la reducción de la toxicidad si el tratamiento es cuidadosamente diseñado y operado para prevenir la formación de contaminantes secundarios. La formación de compuestos que se han derivado de la degradación de compuestos tóxicos puede representar un grave problema, ya que muchos de estos compuestos pueden ser más tóxicos al ambiente que sus antecesores.

### **1.5. La Ingeniería Genética y la adaptación de microorganismos a la degradación de tóxicos.**

La Ingeniería Genética ha jugado un papel importante en la adaptación de microorganismos a la degradación de tóxicos, sin embargo, no es una práctica común utilizar microorganismos modificados genéticamente para la biodegradación de compuestos recalcitrantes o tóxicos, ya que la liberación de estos microorganismos esta controlada (IICA, 1990). Sin embargo, la modificación del material genético ha sido una herramienta fundamental en la selección y adaptación de microorganismos, ya sea como auxiliar en la detección de microorganismos potencialmente útiles (Diels y Mergeay, 1990) en el estudio de los mecanismos de degradación y las secuencias genómicas de los microorganismos (Silver and Misra, 1988; Coco et al., 1993), aptas en el establecimiento de la evolución de los microorganismos con capacidad de biodegradación. En términos genéticos (Rothmel et al, 1990) y en el estudio de cómo el ambiente modula la actividad microbiana, factor clave para el desarrollo de la biorremediación (Daubaras and Chakrabarty, 1992).

### **1.6. Descripción de la cepa de *Pseudomonas fluorescens*.**

Las bacterias son organismos procarióticos unicelulares que pertenecen al reino Monera, de acuerdo a la clasificación del Manual de Bergey (Williams y Wilkins, 1974).

Los organismos del género *Pseudomonas* son bacilos rectos o curvos; tamaño de 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  por 1.5-4.0  $\mu\text{m}$  sin esporas; Gram-negativos, móviles por flagelos polares. Son aerobios organotróficos y nunca presentan un metabolismo de fermentación. (Collins and Lyne, 1987 )

Las especies del género *Pseudomonas* son metabólicamente versátiles y pueden utilizar un gran número de compuestos orgánicos, entre ellos hidrocarburos aromáticos, como única fuente de carbono y energía. Esta versatilidad muestra que pueden estar presentes en muchos ambientes como microflora autóctona natural con un alto potencial para la biorremediación de contaminantes.

Los representantes del género de *Pseudomonas* tienen, en la mayor parte de los casos, requerimientos de nutrición muy sencillos y se desarrollan organotróficamente a valores

neutros de pH y a temperaturas entre los límites de las mesófilas, su hábitat natural son el suelo y ambientes acuáticos.

El género *Pseudomonas* tiene una capacidad asombrosa de descomponer cualquier tipo de compuestos orgánicos del carbono. No sólo pueden metabolizar los azúcares, proteínas ácidos orgánicos y alcoholes, sino también algunos compuestos orgánicos cíclicos, como los que se encuentran en el petróleo, los polisacáridos complejos, las más resistentes fibras naturales y una gran gama de productos metabólicos vegetales, (Margulkis and Aschwartz, 1993).

Dentro de éste género la bacteria *Pseudomonas fluorescens* (Fotografía 1) juega un papel importante en el ambiente. Por una parte interactúa con plantas y por otra tienen habilidad para degradar compuestos tóxicos. Sus principales usos se encuentran en la agronomía como biopesticida (supresora de patógenos en las raíces de las plantas), así como para mejorar el rendimiento de cultivos (ayuda a la formación de colonias de nitrobacterias) (Hosain, A.K.M., and M. Alexander, 1984; O'Sullivan, D.J. and F. O'Gara, 1992; Thomashaw, L.S., and D.M, Weller, 1988).

*Pseudomonas fluorescens* produce un pigmento fluorescente llamado fluoresceína que es un colorante orgánico luminiscente que al ser excitado con luz ultravioleta emite una fluorescencia color verde -amarillo. El crecimiento ocurre en un rango de 4 - 42 °C. Este organismo saprófito se encuentra en el suelo, alimentos, agua clara y agua negra.

El creciente interés en el uso de este organismo para ingeniería genética y ambiental, alienta los estudios para un mejor entendimiento de las bases genéticas para su supervivencia y distribución en suelos y agua.



Fotografía 1. *Pseudomonas fluorescens*, microfotografía.  
Fuente: Q. Manuel Sanchez Zarza, IMTA.  
Microscopio de transmisión JEOL 100. Esc. 1:1400

## 1.7. Tolueno

### 1.7.1. Descripción

El tolueno (metilbenceno, metilbenzol, toluol, fenilmetano) (Figura1), con fórmula condensada  $C_6H_5CH_3$  y peso molecular 92.13 g/mol, es un hidrocarburo líquido incoloro, segundo miembro de la serie aromática que comienza por el benceno; es volátil y tiene un olor característico semejante al de las resinas balsámicas. Sus principales características se describen en la tabla 3.

Las fuentes industriales más importantes del tolueno son el petróleo y la hulla grasa. Se emplea como materia prima para obtener el explosivo trinitrotolueno, como disolvente industrial para pinturas y revestimientos, grasas, resinas, la mayoría de aceites, caucho, disolvente de lacas de nitrocelulosa, disolventes de adhesivos de paquetes de plástico, productos químicos y detergentes; como componente de la gasolina para aviación y mezclas de alto octanaje y como materia prima para obtener productos químicos intermedios en la producción de materias colorantes, perfumes y medicamentos (Enc. Tec. Quím. vol. 15. pp 540-551).

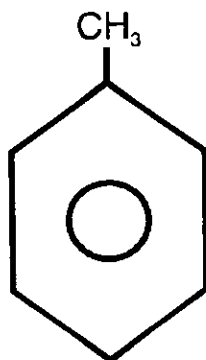


Figura 1. Fórmula estructural del tolueno

### 1.7.2. Problemática

Actualmente los municipios e industrias que colectan y tratan aguas residuales tienen que cumplir con normas de calidad de agua cada vez más estrictas en relación a las fuentes de emisiones de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) a la atmósfera (Corsi y Birkett, 1995), debido a lo siguiente :

- a) Son altamente reactivos en aires urbanos y contribuyen a la producción de niveles de ozono elevados.
- b) Son relativamente inertes en la troposfera pero actúan de manera similar a los clorofluorocarburos en la deflexión del ozono estratosférico.
- c) Los VOC's por ejemplo el tolueno, están considerados como compuestos prioritarios por ser contaminantes tóxicos del aire, agua y suelo que producen riesgos crónicos a la salud de empleados de municipios o industrias y al público en general.
- d) La acumulación de VOC's en espacios confinados por ejemplo, atmósferas de drenajes, contribuyen a los riesgos de explosión.

Con relación a los contaminantes tóxicos del aire y la producción de elevadas concentraciones de ozono, se ha motivado al desarrollo de regulaciones locales, estatales y federales, intentando reducir las emisiones de VOC's desde los colectores de aguas residuales y facilitar su tratamiento.

Los resultados de las investigaciones relacionadas a la emisión de VOC's desde agua residuales, han sido ampliamente estudiados (Barton, 1987; Corsi y Card, 1991; Namkung y Rittmann, 1987). Las emisiones de los drenajes no han sido estudiados extensamente, sin embargo, las disposiciones de la nueva Ley Federal de Aire Limpio requerirá el control de contaminantes orgánicos volátiles de riesgo al aire (VOHAP's) emitidas desde los procesos industriales, incluyendo sitios de drenajes. Por ejemplo, se han desarrollado las regulaciones o normas para el control de emisiones de VOHAP's desde los drenajes en la industria de manufactura de síntesis de compuestos químicos orgánicos.

El tolueno es considerado como contaminante prioritario en agua, clasificado como sustancia peligrosa y desecho peligroso, de acuerdo a la clasificación de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (U.S. EPA), con números de código:

CAS-108-88-33  
RTECS XS5250000  
UN 11294

Los límites máximos permitidos son los siguientes :

- a) Protección de la vida acuática de agua dulce : 17500 µg/l para toxicidad aguda.
- b) Protección de la vida acuática de agua salada : 6300 µg/l para toxicidad aguda y 5 000 µg/l para toxicidad crónica.

c) Protección de la salud humana : 14.3 mg/l.

En relación a su bioacumulación y biotransformación/biodegradación, no existe información que fundamente el criterio, sólo existen cálculos teóricos y estimaciones de sustancias químicas similares. (CEPIS, OMS/OPS, 1986).

En este estudio el compuesto utilizado como sustrato o fuente de carbono fue el tolueno. La característica principal de este compuesto es su volatilidad, lo que hace difícil el tratamiento del agua residual por métodos biológicos. La vida media del tolueno es de 5 horas. La concentración letal es de 26 mg/l, lo que nos indica su gran toxicidad.

Algunos de los factores enlistados en la tabla 5, afectan la remoción de compuestos orgánicos volátiles en el agua como es la solubilidad y difusividad del contaminante en el aire y agua, y la temperatura. La eficiencia de transferencia del contaminante en el agua al aire depende del coeficiente de transferencia de masa y de la constante de la Ley de Henry. La capacidad de un contaminante de ser desorbido se estima por su constante de la Ley de Henry. Una alta constante indica que el contaminante tiene baja solubilidad en el agua y puede fácilmente ser removido por desorción ( Eckenfelder, W. 1989 ).

La constante de la Ley de Henry se incrementa con el incremento de la solubilidad. En el caso del tolueno, el valor de la constante de Henry es de  $5.93 \times 10^{-3}$   $\text{atmos.m}^3 \text{mol}^{-1}$ , nos muestra la baja solubilidad de este compuesto en el agua.

Una característica que puede contrarrestar la adsorbilidad de un compuesto es la solubilidad. En el tolueno la solubilidad es baja y además el anillo aromático que lo conforma incrementa en gran medida su adsorbilidad.

El punto de ebullición también es un parámetro importante de considerar en el tratamiento de un efluente, por ejemplo en la desorción con calor, un compuesto debe tener un bajo punto de ebullición (  $150^\circ \text{C}$  ) y una constante de la Ley de Henry aceptable para llevar a cabo una efectiva desorción (Eckenfelder, 1989). El tolueno exhibe un punto de ebullición relativamente bajo,  $111^\circ \text{C}$ , lo que hace posible su tratamiento por este método.



Nombre	Tolueno, metilbenceno, metilbenzol, toluol, fenilmetano
Peso molecular	92.13 g / mol
Punto de ebullición	111 ° C ( 760 torr )
Punto de fusión	- 95 ° C
Presión de vapor ( 25 ° C ) torr	28.7
Solubilidad en el agua ( 25 ° C ), mg/l	535
Densidad	0.878
Sistema cristalino	Rómbico
Estado físico	Incoloro y aromático
Coefficiente de partición de agua / log octanol	2.69
Fórmula química	$C_6H_5 - CH_3$
Constante de la Ley de Henry	$5.93 \times 10^{-3} \text{ atmos.m}^3 \text{ mol}^{-1}$
- CE <sub>50</sub> <sup>b</sup> mg / l	26.0
-96 hr CL <sub>50</sub> mg/l <i>Daphnia</i>	
Biodegradabilidad	No hay datos disponibles
Fotólisis	Se desconoce la cantidad de disociación al alcohol benzílico y benzaldehído. La foto-oxidación atmosférica al benzaldehído sigue la volatilización, y es probablemente el principal camino.
Oxidación	Sólo importante como foto-oxidación
Hidrólisis	No tan importante
Volatilización	Ocurre con una vida media de 5 horas
Adsorción	Presumiblemente se adsorbe con materiales orgánicos
Procesos biológicos	La bio-acumulación no es importante; la metabolización produce ácidos ( acético, pirúvico, benzoico)
Otras reacciones o interacciones	No son importantes
Desorción	12 - 16 % de desorción con 3 días de tiempo de retención en lodos activados
Datos de adsorción en carbón ( Filtrasorb-300 )	Adsorbilidad: 340 mg/l; dosis de carbón requerida para reducir la concentración de contaminante de 10 mg/l a 1 mg/l con pH de 5.6
Aplicaciones	Sirve para obtener el aldehído y el ácido benzoico y las aminas llamadas toluidinas, base de materias colorantes

Tabla 3. Características del tolueno

Fuentes : U.S.E.P.A. (1989) ; Puig (1969); Ford, 1992 ; Eckenfelder (1995).  
b = después de 30 minutos de contacto

### 1.7.3. Tecnologías de remoción

Las tecnologías mas ampliamente usadas para la remoción de VOC's, son la adsorción fase - líquida usando carbón activado granular (GAC) y desorción con aire, simplemente transfiriendo los contaminantes de una fase a otra (Voice, 1989; McCarty, 1983). Además se requiere un tratamiento o disposición de la fase receptora.

El tratamiento biológico es una alternativa deseable para la remoción, debido a su potencial para destruir completamente los compuestos contaminantes y es generalmente menos caro que el proceso de tratamiento físico-químico. Sin embargo no es ampliamente aceptado para tratamiento de agua subterránea, debido a que se considera que los sistemas biológicos no son suficientemente estables para cumplir consistentemente los estrictos límites de las descargas que se requieren frecuentemente. En los casos en que el tratamiento biológico ha sido empleado, típicamente es seguido por adsorción en carbón activado granular para pulimento del efluente y para proveer un tratamiento alternativo en las fallas eventuales del sistema biológico.

Un alcance promisorio, del proceso carbón activado biológicamente (BAC), integra la remoción biológica y la adsorción con carbón activado granular dentro de un solo proceso unitario.

### 1.7.3.1. Sistemas de tratamiento para su remoción

En la base de datos RREL de la EPA (RREL U.S. EPA, 1994), se tienen datos de tecnologías de tratamiento y porcentajes de remoción para influentes con concentraciones de tolueno de 0 - 100 µg/l ; > 100 - 1000 µg/l ; > 1 - 10 mg/l y > 10 - 100 mg/l.

En los siguientes cuadros, se muestran los sistemas de tratamiento usados en influentes con las concentraciones de tolueno mencionadas, el tipo de agua, así como los porcentajes de remoción y concentraciones de los efluentes.

TECNOLOGÍA	TIPO DE AGUA	CONCENTRACIÓN EN EL EFLUENTE (µg/l)	% DE REMOCIÓN REPORTADO
Lodos activados	Municipal	4 - < 0.1	86 - > 99
Desorción con aire	Subterránea	1.7 - < 0.5	95.3 - > 98.9
Filtros percoladores	Municipal	7 - < 1	86 - > 98.2
Sedimentación	Municipal Industrial	1.9 - 3	0.0 - 83
Clarificación asistida químicamente	Municipal	26 - 1	0.0 - 67
Carbón activado granular	Subterránea	36 - < 10	5 - 85
Lagunas aerobias	Industrial	40	> 50
Carbón activado en polvo agregado a lodos activados PACT	Municipal	< 1	> 98.8
Oxidación química con UV y ozono	Lugar contaminado con desechos peligrosos	20	> 74
Lagunas aerobias y lodos activados	Industrial	2	33
Desorción con aire y carbón activado granular	Subterránea	< 1	> 98
Filtración y carbón activado granular	Tratamiento comercial (almacenamiento y disposición de lliquidos)	< 2	> 94.4

Tabla 4. Tecnologías de tratamiento usadas en influentes con concentraciones de tolueno de 0-100 µg/l (U.S.EPA, 1994).

TECNOLOGÍA	TIPO DE AGUA	CONCENTRACIÓN EN EL EFLUENTE ( $\mu\text{g/l}$ )	% DE REMOCIÓN REPORTADO
Lodos activados	Municipal	< 0.2 - 57	>99.9 - 87
Desorción con aire	Subterránea	< 0.60	> 99.77
Filtros percoladores	Municipal	7	97.8
Lagunas aerobias	Industrial	<10 - <32	> 98.8 - > 96.1
Osmosis inversa	Subterránea	20	92.5
Reactor batch en secuencia	Desechos peligrosos	< 50 - 250	> 92.6 - 63
Carbón activado en polvo agregado a lodos activados PACT	Industrial	<1 - <10	> 99.79 - > 96.3
Carbón activado granular	Industrial	480	59
Resina de adsorción	Industrial	< 10	> 98.3
Película anaerobia	Sintética	740	5

Tabla 5. Tecnologías de tratamiento usadas en influentes con concentraciones de tolueno > 100 - 1000  $\mu\text{g/l}$  (U.S. EPA, 1994).

TECNOLOGÍA	TIPO DE AGUA	CONCENTRACIÓN EN EL EFLUENTE ( $\mu\text{g/l}$ )	% DE REMOCIÓN REPORTADO
Lodos activados	Industrial	410 - <1	86 - > 99.97
Desorción con aire	Subterránea	34 - 270	99.18 - 95.8
Lagunas aerobias	Sintética	90	97
Osmosis inversa	Lugar contaminado con desechos peligrosos	420	94.7
Desorción con vapor	Industrial	10 - 100	99.71 - 98.
Carbón activado en polvo agregado a lodos activados PACT	Tratamiento comercial (almacenamiento y disposición de líquidos)	<1	> 99.96
Carbón activado granular	Lugar contaminado con desechos peligrosos	< 10 - 1200	98.1 - 83
Filtración	Lugar contaminado con desechos peligrosos	6400	9
sedimentación	Lugar contaminado con desechos peligrosos	5600	7
Precipitación química	Lugar contaminado con desechos peligrosos	7000 - 4900	26 - 18
Clarificación asistida químicamente	Lugar contaminado con desechos peligrosos	930 - 5200	15 - 17
Oxidación química con Cl	Sintética	8500	15
Película anaerobia con aire y carbón activado granular	Desechos peligrosos	440 - 1100	94.5 - 87
Filtración y carbón activado granular	Tratamiento comercial (almacenamiento y disposición de líquidos)	< 830	> 90

Tabla 6. Tecnologías de tratamiento usadas en influentes con concentraciones de tolueno > 1 - 10 mg/l (U.S. EPA, 1994).

TECNOLOGÍA	TIPO DE AGUA	CONCENTRACIÓN EN EL EFLUENTE (µg/l)	% DE REMOCIÓN REPORTADO
Lodos activados	Industrial	76	99.90
Desorción con aire	Subterránea	114	99.33
Desorción con vapor	Industrial	12	99.94
Carbón activado granular	Sintética	< 10	>99.95
Filtración y lodos activados	Industrial	< 10	> 99.97
Oxidación con aire húmedo	Industrial Sintética	500	98.9
API oil/separador de agua mas flotación con aire disuelto con lodos activados	Industrial	11	99.92

Tabla 7. Tecnologías de tratamiento usadas en influentes con concentraciones de tolueno > 10 - 100 mg/l (U.S. EPA, 1994).

### 1.8. Cepas degradadoras del tolueno y su metabolismo

Varias cepas bacterianas, particularmente aquellas del género *Pseudomonas*, son capaces de degradar compuestos xenobióticos; el catabolismo de las enzimas involucradas están codificadas por plásmidos grandes, llamados plásmidos catabólicos que proveen a su huésped la ventaja de un rompimiento del espectro de crecimiento.

Para ser competitivo en un nicho, la ventaja debe ser lo bastante grande para compensar el costo de mantenimiento y expresión del plásmido catabólico. Estas consideraciones son importantes para la proliferación de células cosechadoras de plásmidos y pueden explicar porque ciertos compuestos xenobióticos persisten en sistemas biológicos aún pensando que su biodegradación ha sido posible (Duetz et al, 1991).

De acuerdo con Assinder y Williams (1990), el plásmido TOL codifica para la biodegradación de tolueno, xilenos y otros bencenos alquil-sustituídos.

Suzuki et al (1990), encontraron que el plásmido TOL pWWO de *Pseudomonas putida* codifica las enzimas para el catabolismo oxidativo del tolueno y xilenos. Estos compuestos son degradados por la oxidación progresiva de un metilo al lado de la cadena de un ácido carboxílico, seguido por la ruptura oxigenativa de el anillo aromático, la monooxigenasa xileno es la primera enzima en esta vía y oxida tolueno y xileno a alcoholes metílico o bencilico. La enzima tiene amplia especificidad de sustrato y también oxida alcoholes metílico y bencilico a metil y benzaldehído, indol e indoxil. La enzima consiste de dos subunidades de proteínas diferentes codificadas por los genes *xy/M* y *xy/A*. Los autores dedujeron la secuencia completa de los nucleótidos de éstos genes.

Para alquilbencenos sustituidos (Duetz et al, 1994), se pueden distinguir dos rutas para las etapas de degradación inicial: un grupo metilo que puede ser oxidado por una monooxigenasa al correspondiente alcohol (formaTOL), o el núcleo aromático puede ser directamente atacado por una oxigenasa.

Para la degradación de tolueno, ambas rutas son usadas por diferentes cepas. La información genética para la forma TOL, a través de la cuál un m- y p-xileno pueden ser degradados también, está situado en el plásmido TOL pWWO. Varias cepas tienen idénticos genes TOL.

En la segunda ruta, el ataque directo al anillo, también se determinó que es usada por varias bacterias para degradar el tolueno.

En las figuras 2 y 3, se muestran las etapas enzimáticas en cepas individuales que muestran las siguientes variaciones (Whited et al, 1991):

1. Vía TOL, (*Pseudomonas putida* m-2), en la que el tolueno es degradado vía oxidación del grupo metilo a ácido benzoico. Mas allá, la oxidación es a través de un ácido diol *cis*- carboxílico y catecol. El catecol es degradado por enzimas de una vía de enlace meta a acetaldehído y piruvato.
2. Vía TOD, (*Pseudomonas putida* F1), la cual es caracterizada por un ataque inicial del tolueno por un sistema de enzimas dioxigenasa a la forma (+)-*cis*-1(S),s(R)-dihidroxi-3-metilmetilciclohexa-3,5-dieno. Este compuesto es oxidado a 3-metilcatecol, el cual es después degradado por enzimas de vía de enlace meta.
3. Vía TOD, (*Bacterium* G-4), en esta vía el tolueno se metaboliza a través del 3-metil catecol y enlace meta, seguida de dos monooxigenaciones para formar primero el *o*-cresol y después 3-metil catecol.
4. Vía Ruta catabólica tolueno-4-monooxigenasa, (*Pseudomonas mendocina* KR1), en la que se sugiere que el metabolismo procede por una hidroxilación inicial del tolueno a la forma *p*-cresol, más aún, el metabolismo vía oxidación del grupo metilo a la forma *p*-hidroxibenzoato, hidroxilación a la forma protocatehuete, y luego la completa desasimilación por una vía de enlace *orto*.

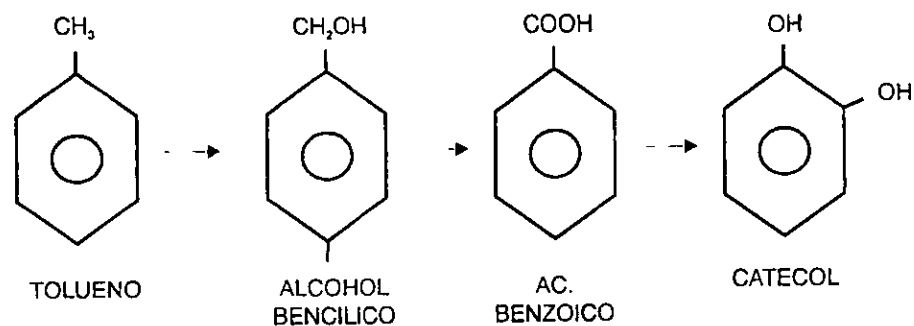


Figura 2. Vía metabólica TOL del tolueno

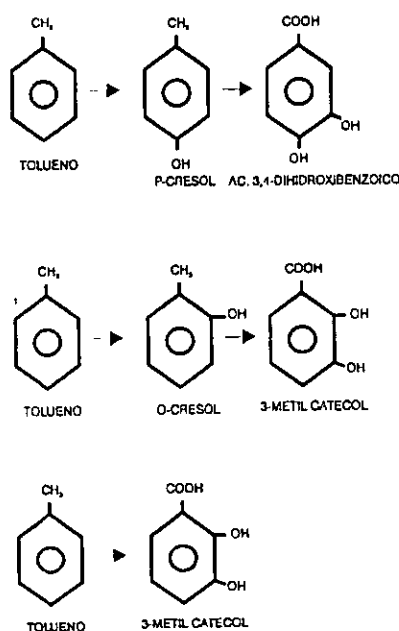


Figura 3. Vía metabólica TOD del tolueno

Poco se sabe acerca de la importancia relativa de estas diferentes vías en la conversión en medio ambiente. En suelos contaminados y agua, el crecimiento bacteriano está frecuentemente limitado por el oxígeno o por la biodisponibilidad de fuentes de carbono. El éxito con el cual diferentes cepas aerobias degradadoras del tolueno proliferan en el medio ambiente, depende de su habilidad para competir por el tolueno o el oxígeno.

Vecht et al (1988), describieron el crecimiento de *Pseudomonas putida* en cultivos batch y continuos, utilizando tolueno como única fuente de carbono y energía. El tolueno fue agregado continuamente al cultivo como vapor a través del flujo de aire. Aproximadamente el 70 % de tolueno consumido fue convertido a biomasa y el remanente fue convertido a CO<sub>2</sub> y productos secundarios no identificados.

Duetz et al (1994), trabajaron con tolueno con diferentes cepas degradadoras de tolueno forzándolas a competir en un cultivo quimiostático con tolueno como única fuente de carbono bajo condiciones limitadas de tolueno u oxígeno y demostró que las cepas en las cuales se hidroxila el núcleo aromático como primera etapa de biodegradación compiten con cepas que inician la oxidación del grupo metilo.

Por otra parte, Beller et al (1992), demostraron la habilidad de las bacterias de cultivos puros para degradar tolueno en condiciones anaerobias, en diferentes condiciones de aceptores de electrones: condiciones reductoras de nitratos, reductoras hierro-férricas, sulfato reductoras y fermentativas-metanogénicas, para varios tipos de inóculos. Sin embargo, los esfuerzos para dilucidar las vías metabólicas de degradación anaerobia de tolueno, han tenido poco éxito.

## 2. CRECIMIENTO BACTERIANO

### 2.1. Modelos de crecimiento bacteriano

El modelo general de crecimiento de bacterias en cultivo batch, se muestra en la figura 4.

Inicialmente se inocula un pequeño número de organismos en un volumen fijo de medio de cultivo y se registra el número de organismos viables en función del tiempo.

En los sistemas de tratamiento biológico existen complejas poblaciones biológicas mezcladas e interrelacionadas, en las que cada organismo tiene su propia curva de crecimiento. El modelo de crecimiento basado en el número de las células tiene cuatro fases diferenciadas (Metcalf y Eddy, 1991).

1. *Fase lag o de retardo.* Tras la adición de un inóculo a un medio de cultivo, la fase de retardo representa el tiempo requerido para que los microorganismos se adapten al nuevo medio ambiente y empiecen a dividirse.
2. *Fase de crecimiento logarítmico.* Durante este periodo, la célula se divide a una velocidad determinada por su tiempo de generación y su capacidad de procesar alimento.
3. *Fase estacionaria.* En este caso, la población permanece estacionaria. Las razones para este fenómeno son las siguientes:
  - Que las células hayan agotado el substrato o nutrientes necesarios para el crecimiento.
  - Que el crecimiento de nuevas células se nivele con la muerte de las células viejas
4. *Fase de muerte logarítmica.* Durante esta fase, la tasa de muerte de las bacterias excede la producción de células nuevas. La tasa de muerte generalmente es función de la población viable y de las características ambientales.

El modelo de crecimiento puede discutirse en términos de la variación de masa de microorganismos con el tiempo. También se divide en 4 fases (Metcalf y Eddy, 1991).

1. *Fase lag o de retardo.* Representa el tiempo requerido de adaptación de los microorganismos al nuevo medio ambiente. En términos de biomasa, la fase lag no es tan larga como la correspondiente fase lag en términos de número de bacterias debido a que la biomasa empieza a aumentar antes de la división celular.
2. *Fase de crecimiento logarítmico.* Siempre hay una cantidad excesiva de alimentos alrededor de los microorganismos, la tasa del metabolismo y crecimiento es solamente función de la capacidad de los microorganismos para procesar el substrato.
3. *Fase de crecimiento decreciente.* La tasa de crecimiento de la masa bacteriana, disminuye debido a la limitación en el abastecimiento de alimento.
4. *Fase endógena.* Los microorganismos se ven forzados a metabolizar su propio protoplasma sin reposición del mismo, ya que la concentración de alimento disponible

llega al mínimo. Durante esta fase puede presentarse el fenómeno llamado lisis, según el cual los nutrientes que quedan en las células muertas se difunden con objeto de proporcionar alimento a las células sobrevivientes.

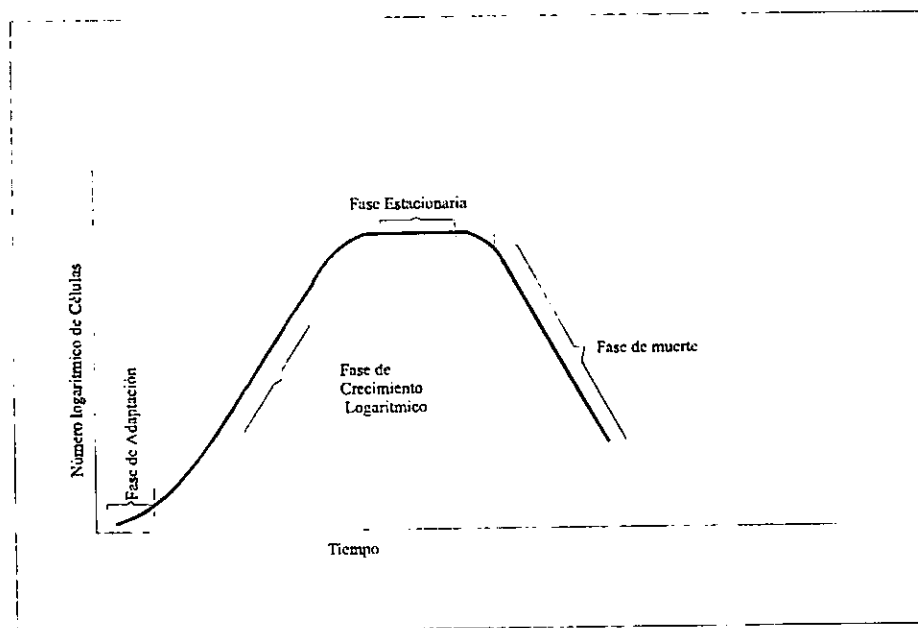


Figura 4. Curva de crecimiento bacteriano

## 2.2. Metabolismo celular

El proceso por el cual los microorganismos crecen y obtienen su energía es complejo y difícil. Existen muchas vías y ciclos. Las enzimas, catalizadores orgánicos producidos por la célula, son vitales para las reacciones implicadas en las vías y los ciclos. Son proteínas o proteínas combinadas con una molécula inorgánica o con una molécula orgánica de bajo peso molecular.

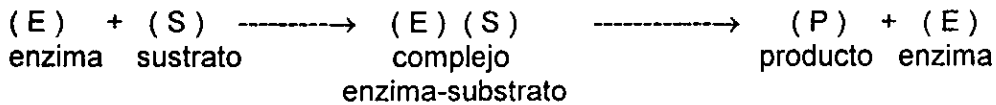
Existen dos tipos de enzimas: extracelulares e intracelulares. Cuando el sustrato o el nutriente requerido por la célula no es capaz de penetrar la pared de la célula, la enzima extracelular convierte al sustrato o nutriente en una forma tal que pueda penetrar a la célula. Las enzimas intracelulares contribuyen a la fotosíntesis y a las reacciones de obtención de energía dentro de la célula.

Las enzimas tienen un alto poder catalítico para convertir el sustrato en productos finales. Una molécula de enzima puede convertir muchas moléculas de sustrato por minuto en productos finales.



Las enzimas tienen un alto grado de especificidad respecto al sustrato, lo que indica que la célula tiene que producir una enzima diferente por cada sustrato que utiliza.

Una reacción enzimática puede representarse por la siguiente ecuación:



La enzima funciona como catalizador formando un complejo con el sustrato, el cual es transformado en otro producto final con la liberación de la enzima original. En este punto el producto puede ser atacado por otra enzima. De hecho, puede formarse una secuencia de complejos y productos antes de que se produzca el producto final. En una célula, la transformación del sustrato original en el producto final se consigue por un sistema enzimático de este tipo.

La actividad de las enzimas se ve sustancialmente afectada por el pH y la temperatura, así como por la concentración del sustrato. Cada enzima tiene una temperatura y pH óptimos. Junto con las enzimas se requiere de energía para llevar a cabo las reacciones bioquímicas en las células.

En la célula se libera energía mediante la oxidación de la materia orgánica o inorgánica o por reacción fotosintética. La energía liberada es capturada y almacenada en las células por ciertos compuestos orgánicos, siendo el compuesto de almacenamiento más frecuente el adenosin trifosfato (ATP).

La energía capturada por este compuesto se utiliza para la síntesis, movilidad y mantenimiento de la célula. Cuando la molécula de ATP ha consumido su energía en las reacciones de la síntesis y mantenimiento de la célula, cambia a un estado descargado llamado adenosin difosfato (ADP). Esta molécula de ADP puede entonces capturar la energía liberada en la ruptura de la materia orgánica e inorgánica. Una vez conseguida la energía, el compuesto adopta de nuevo el estado energético, constituyendo la molécula de ATP.

Las reacciones bioquímicas que liberan energía para las bacterias autótrofas y heterótrofas son muy complejas. Puede decirse que el metabolismo total de las células bacterianas consiste en dos tipos de reacciones químicas: de energía y de síntesis (catabolismo y anabolismo).

El catabolismo libera energía de modo que pueda proseguir el anabolismo para la síntesis celular; ambos procesos son el resultado de numerosos sistemas dentro de la célula y cada proceso consiste en muchas reacciones catalizadas por enzimas. La energía liberada en el proceso catabólico es capturada por el sistema catalizado por las enzimas y transferida a través del ATP a la reacción deficitaria de energía que es el proceso anabólico o de síntesis.

Sólo una parte del residuo orgánico es convertido en productos finales. La energía obtenida en esta reacción bioquímica se utiliza en la síntesis de materia orgánica que queda en las nuevas células.

Como la materia orgánica del agua residual es limitada, habrá una disminución en la masa celular debido a la utilización de material celular sin sustitución. Si esta situación continuase, todo lo que quedaría de la célula sería un residuo orgánico relativamente estable. Este proceso está relacionado con una disminución neta de la materia celular en la respiración endógena.

### **2.3. Bioquímica de los procesos biológicos**

Las reacciones bioquímicas que tienen lugar en forma natural en los cuerpos de agua o bajo condiciones controladas en las plantas de tratamiento, se clasifican en tres grandes grupos con base en el metabolismo de los microorganismos que las realizan: aerobios, anaerobios y facultativos.

Las reacciones aerobias se producen en presencia de oxígeno y las anaerobias en ausencia del mismo. Los microorganismos facultativos actúan en uno u otro de los mecanismos anteriores de acuerdo con las condiciones del medio.

Es por esto que las condiciones de presencia o ausencia de oxígeno determinan sistemas muy diferentes entre sí, tanto en su microbiología, como en sus aplicaciones, su ingeniería y su control.

### **2.4. Características energéticas**

La materia orgánica contaminante utilizada por los microorganismos, es transformada en diversos productos dependiendo del metabolismo aerobio o anaerobio de la célula.

Una bacteria anaerobia utiliza alrededor del 10 % de la energía contenida en el sustrato para funciones de reproducción, lo que da origen a nuevas células y el 90 % restante lo dirige a la producción de gas metano.

La bacteria aerobia utiliza en presencia de oxígeno :

- 60 a 65 % de la energía del sustrato en la síntesis de nuevas células.
- La fracción restante es disipada en forma de calor.

### **2.5. Cinética del crecimiento bacteriano**

La cinética es la ciencia que relaciona la velocidad de crecimiento microbiano a las concentraciones de nutrientes de las que dependen. Se divide en dos procesos, la cinética de acumulación de nutrientes limitados por la concentración y la eficiencia que estos nutrientes proveen para el crecimiento. El consumo de nutrientes se observa por la velocidad de transferencia de nutrientes dentro de los organismos sobre el tiempo. El crecimiento se observa en sistemas cerrados por la velocidad de proliferación de una población, o en sistemas abiertos por la velocidad a la cual la población puede ser removida sin perturbar el estado de equilibrio del sistema ( Button, 1985 ).

En una población mixta, como la que tiene lugar en los sistemas de biodigestión, cada microorganismo constituyente tiene su propia curva de crecimiento.

La posición y la forma de las curvas de crecimiento en el sistema dependen de la naturaleza y la disponibilidad del alimento y de los factores ambientales, como el pH, temperatura, mezclado, etc. El control de los factores ambientales, el suministro adecuado de alimentos, la adición de nutrientes o elementos trazas, asegura que los microorganismos tengan un ambiente apropiado para desarrollarse.

Para asegurar el crecimiento en un sistema continuo se necesita también que los microorganismos permanezcan en el sistema durante un tiempo suficiente para su reproducción. Si todas las condiciones ambientales están controladas en forma adecuada, la descomposición de la materia orgánica se puede controlar mediante la tasa de crecimiento de los microorganismos.

## 2.6. Crecimiento celular

La velocidad de crecimiento expresa el cambio en la población con el tiempo; este cambio depende de la población y del tiempo, por lo que

$$T_{CR} = dX/dt = \mu X \quad (1)$$

Donde:

$T_{CR}$  = Tasa de crecimiento de microorganismos, masa/(unidad de volumen.tiempo)

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento, unidad de masa, tiempo<sup>-1</sup>

$X$  = Concentración de los microorganismos (biomasa), masa/unidad de volumen

Integrando entre la población inicial y final

$$\int_{X_0}^X dX/X = \mu \int_0^t dt \quad (2)$$

De la gráfica de log X vs t

$$\mu t = 2.303 (\log X - \log X_0) \quad (3)$$

La ec. 3 es conocida como la gráfica de log X vs t para evaluar la fase lag a la velocidad característica. La forma exponencial de la ec. 3 es

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (4)$$

El tiempo para que la población se duplique es

$$t_d = \ln 2/\mu = 0.693/\mu \quad (5)$$

Tanto  $\mu$  como  $t_d$ , dependen del tipo de microorganismos y las condiciones fisiológicas (clase y concentración de la energía y substrato, pH, temperatura, etc.) bajo ciertas condiciones fisiológicas estos parámetros son propiedades características de un microorganismo.

## 2.7. Crecimiento limitado por el sustrato

En el sistema batch, con el agotamiento del alimento el crecimiento cesa. En un sistema continuo debido a las limitaciones del sustrato, el crecimiento de los microorganismos es también limitado.

Se ha demostrado que el consumo del sustrato en los sistemas continuos se puede describir mediante la ecuación semiempírica desarrollada por Monod, la cual muestra que la tasa específica del crecimiento de la biomasa  $\mu$ , es función de la concentración final del sustrato  $S$  y de la facilidad de asimilación de sustrato por la biomasa:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (6)$$

Donde:

- $\mu$  = Velocidad específica de crecimiento, tiempo<sup>-1</sup>.
- $\mu_{\max}$  = Velocidad máxima específica de crecimiento, tiempo<sup>-1</sup>
- $S$  = Concentración del sustrato que limita el crecimiento, masa/unidad de volumen.
- $K_s$  = Constante de Monod, que se define como la concentración del sustrato que corresponde a un valor de  $\mu = 1/2 \mu_{\max}$ , masa/unidad de volumen.

En la figura 5 se presenta el efecto de la concentración del sustrato sobre la tasa específica de crecimiento se puede observar que a medida que aumenta la concentración la curva se hace paralela al eje X. Cuando la concentración del sustrato es menor que  $K_s$ , existe una relación lineal entre la velocidad de crecimiento y la concentración del sustrato. Cuando la  $S$  es mucho menor que  $K_s$ , se alcanza una tasa específica de crecimiento igual a la tasa máxima.

Si el valor de  $\mu$  de la ecuación (6) se sustituye en (1), la expresión resultante de la tasa de crecimiento será:

$$T_{cr} = \mu_{\max} \frac{XS}{K_s + S} \quad (7)$$

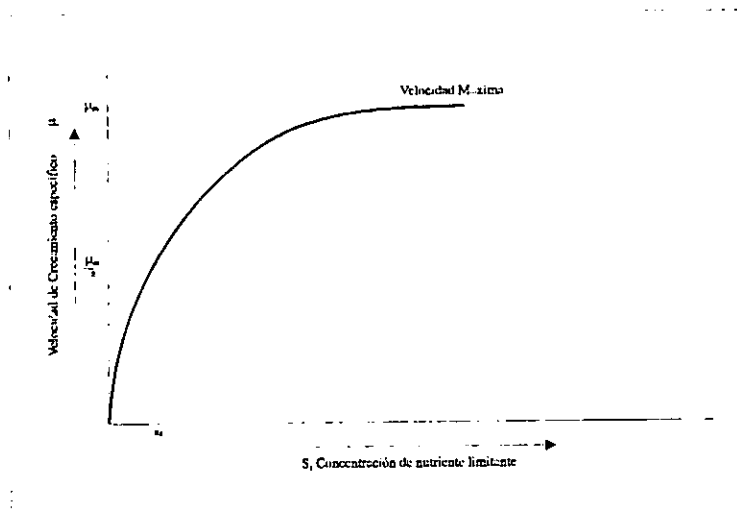


Figura 5. Curva de crecimiento máximo ( $\mu_{\max}$ )

## 2.8. Crecimiento celular y utilización de sustrato

Tanto en sistemas batch, como en continuos, una porción del sustrato se convierte en nuevas células y una porción es degradada a productos intermedios orgánicos y a productos finales inorgánicos.

Se ha observado que para un sustrato determinado la cantidad de nuevas células producidas es reproducible, por lo que entre la tasa de consumo del sustrato y la tasa del crecimiento se ha establecido la siguiente relación:

$$T_{cr} = - Y T_s \quad (8)$$

Donde:

- $T_{cr}$  = Tasa de crecimiento bacteriano, masa/(unidad de volumen. tiempo)
- $Y$  = Coeficiente de rendimiento másico, gr de biomasa formada/gr masa de sustrato removido.
- $T_s$  = Tasa de consumo del sustrato, masa/(unidad de volumen.tiempo)

El coeficiente del rendimiento másico o de producción de biomasa se define como la cantidad de biomasa formada por la cantidad del sustrato utilizado, medida durante cualquier período finito de la fase de crecimiento logarítmica.

Con base en estudios de laboratorio se ha concluido que  $Y$  depende de los siguientes factores:

- El estado de oxidación de la fuente de carbono y la presencia de los demás nutrientes y micronutrientes necesarios
- El grado de polimerización del sustrato
- Las fases metabólicas
- La velocidad del crecimiento
- Varios parámetros físicos del cultivo

El rendimiento másico es importante en la evaluación económica de los procesos de tratamiento. En los procesos anaerobios, un coeficiente de rendimiento bajo es ventajoso e indica que la mayoría del carbono en el influente es transformado a metano, pero también puede indicar que los sistemas son sensibles a los choques orgánicos y a la presencia de contaminantes tóxicos.

Si el valor de  $T_{cr}$  de la ecuación (7) se sustituye en la ecuación (8) la tasa de consumo del sustrato se puede definir de la siguiente forma:

$$T_s = \mu_m X S / Y (K_s + S) \quad (9)$$

En la ecuación (9), el término  $\mu_{max}/Y$  frecuentemente se sustituye por  $K$ , definida como la tasa máxima de consumo de sustrato por unidad de masa de microorganismos:

$$K = \mu_{max}/Y \quad (10)$$

Si se sustituye el término  $\mu_{\max}/Y$  en la ecuación (9), la expresión quedará:

$$T_s = -KXS/(k_s + S) \quad (11)$$

## 2.9. Efectos del metabolismo endógeno

En los sistemas bacterianos usados para el tratamiento de aguas residuales no todas las células están en la fase de crecimiento logarítmico. Por esto, la expresión para la tasa de crecimiento debe ser corregida tomando en cuenta la muerte de una parte de las células y el metabolismo endógeno.

Se considera que el crecimiento en la masa celular debida a estos factores es proporcional a la concentración de los microorganismos presentes. Este decrecimiento frecuentemente se denomina decaimiento endógeno.

El decaimiento endógeno se expresa:

$$r_d = -K_d X \quad (12)$$

Donde:

- $r_d$  = Decaimiento endógeno, masa/(unidad volumen.tiempo)
- $K_d$  = Coeficiente del decaimiento endógeno, tiempo<sup>-1</sup>
- $X$  = Concentración de los microorganismos, masa/unidad de volumen

Combinando la ecuación (12) con (7) y (8) se obtienen las siguientes expresiones para el crecimiento neto:

$$T'_{cr} = \mu_{\max} XS/(K_s + S) - K_d X \quad (13)$$

$$T'_{cr} = -YT_s - K_d X \quad (14)$$

Donde:

$T'_{cr}$  = Tasa neta del crecimiento bacteriano, masa/(unidad de volumen.tiempo).

La expresión correspondiente para la tasa específica neta de crecimiento es:

$$\mu' = \mu_{\max} S/(K_s + S) - K_d \quad (15)$$

Donde:

$\mu'$  = Tasa específica neta de crecimiento, tiempo<sup>-1</sup>.

El efecto de la respiración endógena sobre el coeficiente del rendimiento bacteriano neto se considera definiendo un rendimiento observado de la siguiente forma:

$$Y_{obs} = -T'_{cr}/T_s \quad (16)$$

Donde :

$Y_{obs}$  = Coeficiente del rendimiento bacteriano observado, g de biomasa formada/g de sustrato removido

Las ecuaciones para describir el crecimiento de los microorganismos y la remoción del sustrato son empíricas. Además de los modelos de Monod, se han propuesto muchos otros modelos, entre ellos las ecuaciones de Teissier, Contois, Moser, etc. (Metcalf y Eddy, 1991)

Otras expresiones utilizadas para describir la utilización del sustrato son:

$$T_s = -K$$

$$T_s = -K S$$

$$T_s = -KXS$$

$$T_s = -KXS / S_0$$

La aplicación de cada modelo en el análisis de balance de masa para un sistema de tratamiento biológico permite obtener correlaciones y ecuaciones prácticas para el diseño del sistema

### 2.10. Aplicación de la cinética del crecimiento bacteriano y consumo de sustrato en un reactor de mezcla completa sin reciclaje

En la figura 6 se muestra el proceso de tratamiento aerobio en un reactor de mezcla completa sin reciclaje.

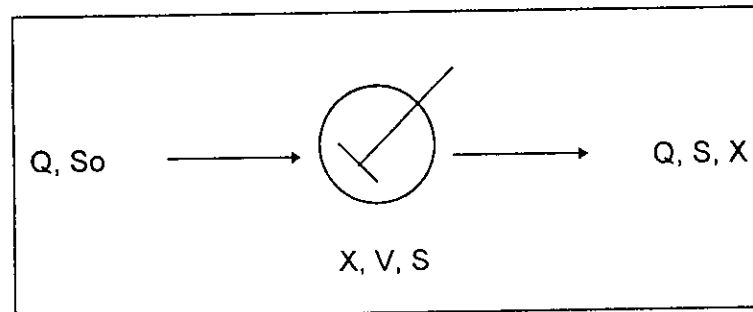


Figura 6. Esquema de un reactor de flujo completo sin reciclaje

La aplicación general de la cinética del crecimiento biológico y remoción de sustrato tiene los siguientes propósitos:

- El desarrollo de balances de masa de microorganismos y sustrato
- La predicción de las concentraciones de microorganismos y sustrato en el efluente.

**Balance de masa de los microorganismos**

Acumulación = Influyente - Efluente + Crecimiento neto

$$dX / dt V_r = QX_0 - QX + V_r T'_{cr} \quad (17)$$

Donde:

$dX / dt$  = Tasa del cambio de la concentración de microorganismos en el reactor, medida en términos de masa (SSV), masa.SSV / unidad de volumen . tiempo

$V_r$  = Volumen del reactor

$Q$  = Caudal, volumen/tiempo

$X_0$  = Concentración de los microorganismos en el influente, masa de SSV / unidad de volumen

$X$  = Concentración de los microorganismos en el reactor, masa de SSV / unidad de volumen

$T'_{cr}$  = Tasa neta del crecimiento bacteriano, masa SSV / unidad de volumen . tiempo

En esta y en las siguientes expresiones, la fracción volátil de los sólidos suspendidos es usada como una aproximación de la masa biológica activa, considerando que la fracción volátil de los sólidos suspendidos es proporcional a la actividad de la masa de los microorganismos.

Si sustituimos el valor de  $T'_{cr}$  de la ecuación (13) en la (17), obtenemos:

$$dX / dt V_r = QX_0 - QX + V_r [ \mu_{max} X S / (K_s + S) - K_d X ] \quad (18)$$

Donde:

$S$  = La concentración del sustrato en el efluente del reactor, mg/l

Considerando que la concentración de los microorganismos en el influente es sumamente pequeña en comparación con la biomasa dentro del reactor, la  $X_0 = 0$

Considerando también que en el reactor se tendrán condiciones estables en el tiempo,  $dX / dt = 0$ . Entonces la ecuación (18) se transformará en :

$$Q / V_r = 1/\theta = \mu_{max} S / (K_s + S) - K_d \quad (19)$$

En el campo de tratamiento de aguas residuales se puede definir también el tiempo promedio de retención celular ( $\theta_c$ ), como la relación de la masa de los organismos en el reactor dividida entre la masa de los organismos removidos del sistema cada día. Para el reactor de mezcla completa,  $\theta_c$  se expresará:

$$\theta_c = V_r X / QX = V_r / Q \quad (20)$$



**Balance de masa del substrato**

El balance del substrato para el reactor de mezcla completa corresponde al balance de masa de los microorganismos y será :

Acumulación = Influyente - Efluente - Substrato consumido por los microorganismos

$$dS/dt V_r = QS_0 - QS - V_r T_s \quad (21)$$

Sustituyendo el valor de  $T_s$  de la ecuación (11) en la (21), obtenemos:

$$dS/dt V_r = QS_0 - QS - V_r kXS/(K_s + S) \quad (22)$$

A un estado estacionario,  $dS/dt = 0$ , entonces la expresión será :

$$0 = Q(S_0 - S) - V_r kXS/(K_s + S) \quad (23)$$

$$S_0 - S = V_r kXS/Q(K_s + S) \quad (24)$$

Substituyendo  $V_r / Q$  por  $\emptyset$  obtenemos:

$$S_0 - S = \emptyset KXS/Q(K_s + S) \quad (25)$$

De esta expresión se puede deducir que la  $T_s$  para reactores de mezcla completa es :

$$T_s = -(S_0 - S) / \emptyset \quad (26)$$

La concentración de los microorganismos en el efluente puede ser obtenida de la ecuación (20), resolviéndola con respecto a  $S/(K_s + S)$  y substituyendo la expresión obtenida en la ecuación (22), obteniendo:

$$(1/\emptyset + K_d) / \mu_{max} = S / (K_s + S)$$

$$S_0 - S = \emptyset kX (1/\emptyset + K_d / \mu_{max})$$

$$X = (S_0 - S) / [\emptyset K (1/\emptyset + K_d / \mu_{max})] = \mu_{max} (S_0 - S) / [\emptyset K (1/\emptyset + K_d)]$$

$$X = \mu_{max} (S_0 - S) / [K(1 + K_d \emptyset)] \quad (27)$$

Substituyendo la  $K$  de la ecuación (10) la concentración de los microorganismos en el efluente se puede obtener de la expresión:

$$X = Y (S_0 - S) / (1 + K_d \emptyset) \quad (28)$$

La concentración del substrato en el efluente puede ser obtenida substituyendo la expresión de  $X$  de la ecuación (24) en la (22), obteniendo finalmente:

$$S_0 - S = \theta K [\mu_{\max} (S_0 - S) / K (1 + K_d \theta)] [S/K_s + S]$$

$$(1 + K_d \theta) / (\theta \mu_{\max}) = S / (K_s + S)$$

$$(1 + K_d \theta) / (\theta \mu_{\max}) = S / [S(K_s/S + 1)]$$

$$(1 + K_d \theta) / (\theta \mu_{\max}) = 1 / (K_s/S + 1)$$

$$K_s/S + 1 = \theta \mu_{\max} / (1 + K_s) \theta$$

$$K_s/S = [\theta \mu_{\max} / (1 + K_s) \theta] - 1 = [\theta \mu_{\max} - (1 + K_s) \theta] / (1 + K_d \theta)$$

$$S = K_s (1 + K_d \theta) / (\theta \mu_{\max} - 1 - K_d \theta)$$

$$S = K_s (1 + K_d \theta) / [(\theta \mu_{\max} - K_d) - 1] \quad (29)$$

Sustituyendo  $\mu_{\max}$  por  $kY$  de la ecuación (10) obtenemos :

$$S = K_s (1 + K_d \theta) / [(\theta (kY - K_d) - 1)] \quad (30)$$

De esta forma, si se conocen los coeficientes cinéticos, las ecuaciones 28 y 29 pueden ser utilizadas para predecir la concentración de los microorganismos y el sustrato en el efluente.

Para utilizar los modelos cinéticos son necesarios los valores de los coeficientes  $Y$ ,  $K$ ,  $K_s$  y  $K_d$ . Estos se obtienen utilizando reactores a escala laboratorio o piloto.

El procedimiento general consiste en la operación de los reactores en un rango de concentraciones del efluente, para lo cual varios diferentes  $\theta_c$  deben ser seleccionados en el rango de 1 a 10 días.

## 2.11. Cinética de degradación de compuestos tóxicos

Por algún tiempo, hubo desacuerdo entre los investigadores en relación a utilizar una función de inhibición, para relacionar la velocidad de crecimiento específico  $\mu$  y la concentración de sustrato  $S$  para compuestos tóxicos. Una escuela utilizaba la función de Monod para este propósito, mientras otra sugería el uso de la función de inhibición tal como la ecuación de Haldane.

Después de una investigación extensiva, para compuestos inhibitorios se recomendó el uso de la ecuación de Haldane, como la más aceptada expresión cinética para el crecimiento de microorganismos, (Pawlowsky y Howell, 1973; Chi y Howell, 1976; Beltrame et al., 1980; D'Adamo et al., 1984; Rozich and Gaudy, 1985; Rebhund y Galil, 1988; Hobson y Mills, 1990; Buswell, 1975; Sokol and Howell, 1981).

Los dos modelos, son similares en rangos bajos de concentración de sustrato, el de Monod (ec. 31) y el de Haldane (ec. 32), muestran predicciones similares como se ilustra por las curvas descritas en la figura 7.

Para altos valores de la constante de inhibición  $K_i$ , la ecuación de Haldane se reduce a la ecuación de Monod. Si la biodegradación de tóxicos es realizada en sistemas biológicos caracterizados por bajas velocidades de crecimiento, el modelo que mejor describe la cinética del crecimiento de microorganismos es el de Haldane. También debido a la cinética de inhibición exhibida por sustratos tóxicos orgánicos, es difícil observar velocidades de crecimiento en un sistema en continuo (Rozich y Gaudy, 1987).

#### *Ec. Monod*

$$\mu = \mu_{\max} \left[ \frac{S}{K_s + S} \right] \quad (31)$$

Donde :

- $\mu$  = Coeficiente de velocidad del crecimiento celular,  $\text{hr}^{-1}$
- $\mu_{\max}$  = Coeficiente de velocidad de crecimiento celular máximo,  $\text{hr}^{-1}$
- $S$  = Concentración de sustrato,  $\text{mg/l}$
- $K_s$  = Constante de saturación media,  $\text{mg/l}$

#### *Ec. Haldane*

$$\mu = \mu_{\max} \left[ \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \right] \quad (32)$$

Donde :

- $\mu$  = Coeficiente de velocidad del crecimiento celular,  $\text{hr}^{-1}$
- $\mu_{\max}$  = Coeficiente de velocidad de crecimiento celular máximo,  $\text{hr}^{-1}$
- $S$  = Concentración de sustrato,  $\text{mg/l}$
- $K_s$  = Constante de saturación media,  $\text{mg/l}$
- $K_i$  = Constante de inhibición,  $\text{mg/l}$

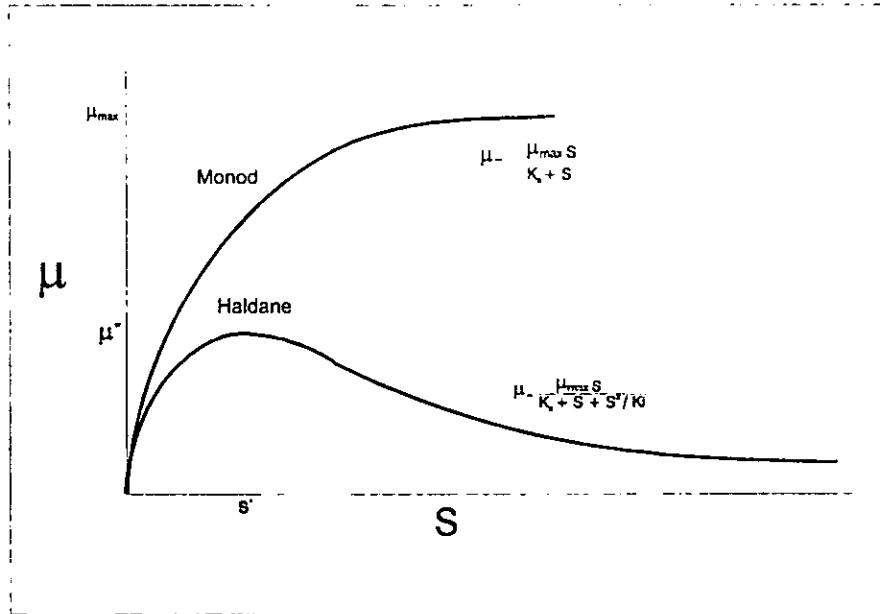


Figura.7 Comparación de las funciones de velocidad de crecimiento de Monod (no tóxico) y Haldane (tóxico)

### 2.11.1. Evaluación de las constantes biocinéticas.

Las constantes biocinéticas que deben ser evaluadas incluyen el rendimiento celular y la velocidad específica de decaimiento, que son utilizadas para estimar las cantidades de lodos de desechos y las constantes biocinéticas de crecimiento, las cuales son empleadas para relacionar  $\mu$  y  $S$ .

La ec. de Haldane utiliza tres constantes,  $\mu_{max}$ ,  $K_s$ , y  $K_i$ , y se requieren consideraciones adicionales cuando se obtienen y analizan datos para el propósito de evaluar estas constantes biocinéticas. La etapa inicial en la evaluación de constantes de crecimiento es obtener un grupo de datos de crecimiento ( $\mu$  vs  $S$ ) convenientes para el análisis. Se prefieren los métodos batch, por que permiten al analista asegurar los rangos y variabilidad de las constantes biocinéticas de crecimiento. Por lo que para sustratos inhibitorios los datos de crecimiento quimiostático son inadecuados por que este sistema no permite completar la curva de crecimiento debido a que la remoción ocurrirá una vez que la velocidad crítica de crecimiento  $\mu'$  es alcanzada. El sistema quimiostato es incapaz de generar datos de crecimiento aplicables a la función de inhibición  $\mu'$ . El crecimiento en batch puede ser generado usando los estudios en batch, la técnica de matraces agitados o los análisis de los datos de utilización de sustrato.

El método puede ser aplicado a compuestos inhibitorios cuyas características permiten utilizar el crecimiento celular para determinar la velocidad de crecimiento específico vía la medición del tiempo del incremento en la concentración de biomasa; este método ha sido exitosamente aplicado para determinar las constantes biocinéticas de crecimiento del fenol. En los métodos alternativos, los datos de utilización de sustrato en batch son usados para presentar gráficamente la velocidad específica de utilización de sustrato a concentraciones dadas de biomasa y sustrato. Estas velocidades específicas de utilización de sustrato son convertidas a las de velocidades específicas de crecimiento por estimación del rendimiento celular, utilizando la ec. 33.

$$\mu = - \frac{Y_t dS}{X dt} \quad (33)$$

Una vez que los datos de  $\mu$  vs  $S$  son obtenidos, deben ser ajustados a la ec. de Haldane para evaluar  $\mu_{max}$ ,  $K_s$ , y  $K_i$ . Debido a que esta ecuación contiene tres constantes, la mejor aproximación para el ajuste de los datos es la técnica de regresión no lineal de mínimos cuadrados.

En la aplicación de esta técnica los algoritmos buscados para los mínimos cuadrados no lineales, deben encontrar un valor mínimo de la suma de residuos al cuadrado, dentro de un rango de valores permitidos para las constantes biocinéticas (Rozich y Gaudy, 1986).

Varios estudios sólo se han enfocado a la presencia de un compuesto o sustrato, sin considerar que el agua residual tiene varias fuentes de carbono. Considerando la coexistencia de sustratos inhibitorios y no inhibitorios en aguas residuales, el efecto de sustratos múltiples sobre el crecimiento microbiano, no se caracteriza adecuadamente bajo las condiciones de un solo sustrato.

Un modelo cinético para el crecimiento de un microorganismo con sustratos múltiples asume una inhibición competitiva en el uso de un compuesto sobre otro. Bader (1978), sugirió que la presencia de dos sustratos podría afectar el crecimiento de los organismos si las concentraciones de los sustratos son menores en comparación con las concentraciones saturadas. Si la interacción es pequeña, el tipo de modelo no interactivo debe predecir la conducta de los microorganismos. Mc Creary (1990), desarrolló un modelo de sustrato múltiple interactivo basado en las ecuaciones de Monod y Haldane y en las ecuaciones de sustrato dual (Bailey y Ollis, 1986), las cuales asumen las interacciones de los sustratos en el crecimiento de los microorganismos.

Bae B. et al. (1995), llevaron a cabo un trabajo para la caracterización de la degradación de compuestos fenólicos múltiples con un cultivo mixto en un reactor de flujo continuo, adaptando el modelo interactivo de sustrato múltiple (McCreary, 1990). Este estudio mostró la eficiencia de este modelo para predecir el crecimiento de un cultivo mixto con varios compuestos fenólicos.

Para varios sustratos inhibitorios se aplica el modelo interactivo de múltiples sustratos (McCreary, 1990) el cual se extendió para el crecimiento en dos sustratos inhibitorios y para un sustrato altamente inhibitorio (ec. 34).

$$\mu = \mu_{\max} \left[ \frac{\frac{S_a}{KS_a} + \frac{S_b}{KS_b}}{1 + \frac{S_a}{KS_a} + \frac{S_b}{KS_b} + \frac{S_a^2}{Ki_a} + \frac{S_b^2}{Ki_b} + \frac{S_c^2}{Ki_c}} \right] \quad (34)$$

Donde :

$S_a, S_b, S_c$  = Concentraciones de compuestos a, b, y c, en mg/l  
 $KS_a, KS_b$  = Constante de saturación media para compuestos a y b, en mg/l  
 $Ki_a, Ki_b, Ki_c$  = Constantes de inhibición para los compuestos a, b, y c, en mg/l

Si se asume que la remoción de cada substrato contribuye al crecimiento del total de la masa microbiana con un rendimiento celular respectivo ( $Y_a$  y  $Y_b$ ) :

$$\frac{dS_a}{dt} = \frac{1}{Y_a} \mu X \quad (35)$$

$$\frac{dS_b}{dt} = \frac{1}{Y_b} \mu X \quad (36)$$

Donde:

$Y_a, Y_b$  = Rendimiento celular para el compuesto a y b, respectivamente.  
 $X$  = Concentración total de biomasa en mg/l

Este modelo cinético se reduce a la ecuación de Monod, si existe solo un compuesto no inhibitorio. Si existe un substrato inhibitorio se reduce a la ecuación de Haldane.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1. Ubicación del sitio experimental

La parte experimental de este trabajo, se realizó en el laboratorio de Calidad del Agua, en el área de Tratabilidad de Aguas Residuales Industriales, del Instituto Mexicano de Tecnología del agua.

#### 3.2. Materiales y métodos

##### 3.2.1. Cepa bacteriana

La cepa utilizada en este estudio fue aislada de un sistema piloto de lodos activados, que trataba un efluente de la industria farmacéutica de síntesis orgánica, como parte del proyecto **Reducción de toxicidad en efluentes de síntesis orgánica**, realizado por Ramírez et al., en 1994.

##### 3.2.2. Medios de cultivo

###### 3.2.2.1 Medio de conservación de la bacteria

La conservación de la bacteria se realizó en medio de cultivo YPG, que contiene los siguientes componentes:

Reactivo	( g/l )
Peptona de caseína	10.0
Glucosa	10.0
Extracto de levadura	10.0
Agar	10.0

Tabla 8. Preparación del medio de cultivo YPG

El medio se preparó disolviendo los constituyentes en agua destilada a excepción del agar. Cuando se obtuvo una mezcla homogénea se ajustó el pH a 7 con HCl o NaOH 0.1 N y se adicionó el agar lentamente disolviendo con agitación y calentamiento. Se distribuyeron en matraces Erlenmeyer con tapón y se esterilizaron a 121 °C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos. Posteriormente se vertieron volúmenes de 20 ml en cajas de Petri estériles, se enfriaron a temperatura ambiente y una vez solidificados se mantuvieron en refrigeración

###### 3.2.2.2. Medio para el crecimiento del inóculo

Para el desarrollo de la bacteria, se utilizó el medio de cultivo YPG líquido, el cual contiene los mismos componentes del YPG sólido, pero sin el soporte de agar.

El medio se preparó disolviendo los componentes en agua destilada. El pH se ajustó a 7 con HCl o NaOH 0.1 N . Se distribuyeron en matraces Erlenmeyer con tapón y se esterilizaron a 121 °C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos. Se enfriaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en refrigeración.

### 3.2.2.3. Medio de mantenimiento

Para los estudios de degradación del tolueno el medio de mantenimiento utilizado fue el medio mínimo (sales minerales), al cual se adicionó el tolueno que fue utilizado por la bacteria como única fuente de carbono y energía. La composición del medio mínimo se muestra en la tabla 9.

REACTIVOS	( g/l )
Fosfato monobásico de sodio	3.5
Fosfato dibásico de sodio	1.5
Nitrato de sodio	0.05
Nitrato ferroso amoniacal	0.01
Sulfato de amonio	1.0
Sulfato de magnesio	2.0
Cloruro de calcio	0.05

Tabla 9. Composición del medio mínimo

El medio se preparó disolviendo uno a uno los componentes en agua destilada, mediante agitación y calentamiento. El pH se ajustó a 7 con HCl o NaOH 0.1 N. Posteriormente se esterilizó en recipientes de 8 l, a 121°C y 1.5 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

### 3.2.3. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado reactivo analítico.

Tolueno grado HPLC  
 Metanol grado HPLC  
 Tolueno (estándar certificado)  
 Helio grado purificado  
 Hidróxido de bario 0.1 N  
 Ácido Oxálico 1N  
 Fenolftaleína  
 Dicromato de potasio 0.1 N  
 Ácido sulfúrico  
 Sulfato de plata  
 Sulfato mercurico  
 Bifalato de potasio  
 Ácido clorhídrico 0.1 N  
 Hidróxido de sodio 0.1 N  
 Fosfato monobásico de sodio  
 Fosfato dibásico de sodio  
 Nitrato de sodio  
 Sulfato de amonio  
 Sulfato de magnesio  
 Cloruro de calcio  
 Nitrato ferroso amoniacal  
 Cloruro de sodio  
 Peptona de caseína



Glucosa  
Extracto de levadura  
Agar  
Agua destilada  
Agua destilada grado HPLC

#### 3.2.4. Materiales

Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml con tapón  
Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml  
Pipetas volumétricas de 1, 2 y 3 ml  
Jeringas de inyección de 10, 25, 50, 100, y 250  $\mu$ l  
Vasos de precipitados de 100 y 250 ml  
Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml  
Matraces volumétricos de 10, 100, 1000 y 2000 ml  
Tubos de cultivo de 150 X 200 mm  
Cajas de Petri desechables y de vidrio  
Asa de platino  
Micropipeta de rango de 0 - 1000  $\mu$ l  
Reactores de acrílico de dos celdas con capacidad de 10 l cada una  
Reactores de vidrio de 3 l  
Tapones de hule  
Manguera  
Accesorios para mangueras  
Difusores de aire  
Rotámetro  
Tubo de vidrio  
Viales para DQO  
Viales de 2, 25 ml con tapón  
Membranas de celulosa de 0.2  $\mu$   
Embudo y base porosa para filtración  
Parafilm  
Masking tape  
Papel Kraft  
Algodón  
Papel aluminio

### 3.2.5. Equipo analítico

En la tabla 10 se enlista el equipo utilizado para la determinación de los parámetros analizados.

Nombre del equipo	Característica	Uso
Cromatógrafo de gases	Marca: Hewlett Packard. Modelo: 5890, series II.	Determinación tolueno.
Detector selectivo de masas	Serie: 5971.	Acoplado al cromatógrafo de gases.
Sistema de purga y trampa	OI-Analytical Serie 4460A	Desorción de muestras de volátiles, acoplado con el cromatógrafo de gases.
Columna capilar	Marca: Hewlett Packard Modelo: ULTRA II	Determinación de tolueno
Reactor de DQO	Marca Hach	Digestión de muestras.
Espectrofotómetro de lectura directa.	Marca: Hach Modelo: DR/2000	Determinación de DQO, densidad óptica y turbiedad.
Mezcladoras/agitadoras	Multi-mexer, Lab-line instruments, Inc. Modelo: R4600	Agitación de matraces.
Parrilla de agitación y calentamiento.	Marca: Thermolyne Modelo: Type 1000	Agitación y preparación de reactivos y medios.
Balanza analítica	Marca: Sartorius. Modelo: L2420S	Peso de membranas, reactivos y medios.
Equipo de filtración	Marca: Millipore.	Filtración de muestras para sólidos suspendidos totales.
Medidor de oxígeno disuelto	Marca : Orion	Determinación de oxígeno disuelto y temperatura
Potenciometro	Marca: Conductronic Modelo: PC 18 PC 20	Determinación de pH
Autoclave	Marca: Felisa	Esterilización de medios de cultivo y cristalería
Incubadora	Marca: Lab-Line	Crecimiento de microorganismos
Homogeneizador vortex	Marca: IKA Modelo: MS1	Homogeneización de muestras
Refrigerador	Marca: Felisa Modelo: FE 292	Conservación de muestras y cultivos
Campana de flujo laminar con luz UV	Marca: Veco Modelo: GHL-A12	Esterilización de reactores
Centrifuga	Marca: Clay Adam Brand Modelo Dinac MD-21152:	Separación y Lavado de células
Estufa	Marca: Felisa Modelo: 292	Para hacer la determinación de sólidos.

Tabla 10. Equipo analítico utilizado en el estudio de cinética de degradación del tolueno.

### 3.3. Metodología

El trabajo se desarrollo en las siguientes etapas de experimentación:

- a) Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en matraces agitados, en presencia de tolueno a temperatura de 35°C.
- b) Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en reactores batch de 10 l a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C).
- c) Determinación de la cinética de crecimiento de *Ps. fluorescens* y de degradación del tolueno.
- d) Biodegradación de tolueno en reactores de 3l en batch y semicontinuo
- e) Biodegradación de tolueno en reactores de 3 l en semicontinuo

A continuación se describen la metodología empleada y los parámetros de control utilizados en cada etapa de experimentación.

#### 3.3.1. Experimentos en matraces para el estudio del crecimiento bacteriano en presencia de tolueno

En esta etapa de experimentación, se determinó el crecimiento de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* en matraces agitados y temperatura de 35°C, utilizando un medio rico en nutrientes, para obtener buen rendimiento de células viables. Esta biomasa posteriormente se aclimató al medio mineral y al tolueno utilizado como sustrato, para determinar el efecto de inhibición en los rangos de concentración estudiados.

Se trabajó con cuatro concentraciones de tolueno: 20, 40, 90 y 180 mg/l. El parámetro de control indirecto del crecimiento de la biomasa fue la turbiedad.

##### 3.3.1.1. Conservación de la cepa

La cepa se preservó haciendo resiembras cada mes con el propósito de garantizar su estabilidad y viabilidad. Para ello se inocularon con la bacteria cajas de Petri con medio de agar YPG, sembrando por estría en condiciones estériles.

Las cajas se incubaron a 35°C por 24 horas y se almacenaron en refrigeración a 5°C para su posterior utilización.

##### 3.3.1.2. Propagación del inóculo de *Pseudomonas fluorescens*

El inóculo de la bacteria se preparó sirviendo 4 asadas de las colonias desarrolladas en medio sólido, bajo condiciones estériles, en matraces de 500 ml con 200 ml de medio YPG líquido. Los matraces provistos de tapón se incubaron a 35 °C con agitación continua de 200 r.p.m durante 24 horas. Posteriormente se midió la turbiedad del caldo de cultivo, haciendo una dilución 1: 100 con agua destilada.

##### 3.3.1.3. Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en matraces, en presencia de tolueno

Para la evaluación del crecimiento de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* en presencia de tolueno, se realizaron experimentos en matraces según el siguiente procedimiento:

1. Se sembraron 4 asadas de las células del microorganismo en 50 ml de caldo YPG en un matraz de 250 ml provisto de tapón, en condiciones estériles.
2. Se incubó el matraz a 35 ° C durante 24 horas, con agitación continua de 200 r.p.m.
3. Después se tomó una alícuota de un ml del cultivo, se aforó a 100 ml con agua destilada y se determinó la turbiedad .
4. Se tomaron cinco ml de la biomasa y se inocularon en 45 ml de medio mínimo estéril, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón.
5. Se incubaron a 35°C durante 24 horas con agitación continua a 200 r.p.m.
6. Después del período de incubación, se tomó un ml del cultivo, se aforó a 100 ml con agua destilada y se determinó la turbiedad.
7. Se agregó el tolueno en concentraciones de 20, 40, 80 y 160 mg/l, en condiciones asépticas.
8. Se incubaron a 35°C durante 24 horas con agitación continua de 200 r.p.m.
9. Después del período de incubación, se tomó un ml del cultivo, se aforó a 100 ml con agua destilada y se determinó la turbiedad.

### 3.3.2. Experimento para el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en reactores batch de 10 l a temperatura ambiente

En la segunda etapa de experimentación, se determinó el crecimiento de la bacteria a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y la duración de la fase de aclimatación de la bacteria a diferentes concentraciones de tolueno, el cuál fue utilizado como sustrato y se determinó el consumo de éste medido como DQO<sub>soluble</sub>. En el arreglo experimental (fotografía 2), se utilizaron reactores de 10 l en batch, utilizando módulos de dos celdas provistos de tapa, una utilizada como reactor biótico, con el cultivo de *Ps. fluorescens* en suspensión y la otra como control abiótico o blanco, con el fin de evaluar los efectos de la desorción. Ambos reactores tuvieron las mismas condiciones de medios de cultivo y concentración de sustrato.



Fotografía 2. Experimento del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en reactores batch de 10 l.

Las concentraciones de tolueno utilizadas fueron : 25, 50, 100 y 200 mg/l

Los parámetros de control fueron los siguientes :

- Control del experimento: pH, temperatura del biocultivo y ambiente, oxígeno disuelto.
- Control de crecimiento: Turbiedad, sólidos suspendidos totales y densidad óptica
- Control de biodegradación : DQO<sub>soluble</sub>

### 3.3.2.1. Crecimiento de biomasa

La propagación del inóculo y el crecimiento de la biomasa, se hizo como se describe en las secciones 3.3.1.2 y 3.3.1.3, considerando la preparación de un volumen de 1l de biomasa, para inocular 9 l de medio mínimo.

### 3.3.2.2. Acondicionamiento de reactores

El acondicionamiento de los reactores se hizo con el siguiente procedimiento:

1. Se lavaron los reactores y todos los accesorios requeridos con jabón; se enjuagaron con agua, se agregó hipoclorito de calcio y se enjuagaron con agua destilada.
2. Se esterilizaron con luz U.V. durante 15 minutos en campana de flujo laminar.
3. Se instalaron los reactores y se adaptaron las conexiones para la aereación .
4. Se llenaron los reactores con el medio mínimo estéril y se reguló el flujo de aire entre 8 y 10 ml/minuto para proveer oxígeno disuelto mínimo de 2 mg/l al cultivo bacteriano para mantener las condiciones aerobias que se requieren.
5. Se agregó la biomasa a los reactores y se dejaron 24 horas de tiempo de contacto con aereación continua. Se determinaron los parámetros de control del experimento y de crecimiento al medio mineral antes de la aplicación del tolueno.
6. Se agregaron las cantidades de tolueno determinadas previamente para obtener la concentración deseada en cada reactor. Se dejaron 10 minutos de tiempo de homogeneización. Se tomaron todos los parámetros de control iniciales.

### 3.3.2.3. Monitoreo de los reactores

El control de los reactores se llevó a cabo tomando muestras cada 24 horas, determinando los parámetros indicados en la sección 3.3.2. El experimento tuvo una duración de 20 días.

Los métodos de análisis utilizados se muestran en la tabla 11.

PARÁMETRO	MÉTODO
pH	NMX-AA-8
Temperatura	NMX-AA-7
Oxígeno disuelto	Medición directa con sensor
Turbiedad	HACH.Gaudy, 1981
Densidad óptica (540 nm)	HACH. Gaudy, 1981
Sólidos suspendidos totales	Norouzian, 1984
Cuenta bacteriana en placa	Cuenta directa en placa
Concentraciones residuales de tolueno	624, EPA
Demanda química de oxígeno soluble	HACH

TABLA 11. Parámetros y métodos de análisis en los reactores batch

### 3.3.3. Experimentos para la determinación de la cinética de crecimiento de *Ps. fluorescens* y de la degradación del tolueno

En la tercera etapa de experimentación, se obtuvieron datos para el desarrollo de las cinéticas de crecimiento y de consumo de sustrato, y se determinó la biodegradación de tolueno en reactores batch de 10 l. El tolueno fue utilizado como única fuente de carbono y energía, ya que se eliminaron los restos de medio rico ya que como se mostrará más adelante, aportó cantidades significativas de materia orgánica, interfiriendo en los resultados, por lo que se modificó la metodología para el manejo de la biomasa.

Se utilizaron los mismos reactores que en el experimento anterior, se utilizó una celda como control biótico y la otra como control abiótico o blanco. El arreglo experimental se muestra en la fotografía 3.

Las concentraciones de tolueno utilizadas fueron : 25, 50, 75 y 100 mg/l

Los parámetros de control determinados fueron :

- Control del experimento: pH, temperatura del biocultivo y ambiente, oxígeno disuelto y  $\text{CO}_2$ .
- Control de crecimiento: Densidad óptica a 540 nm.
- Control de biodegradación :  $\text{DQO}_{\text{soluble}}$  y determinación de concentraciones residuales de tolueno por cromatografía de gases.



Fotografía 3. Experimentos para la determinación de la cinética de crecimiento de *Ps. fluorescens* y de la degradación del tolueno

### 3.3.3.1. Crecimiento de biomasa

La propagación de las células se hizo como se describe en la sección 3.3.1.2 .

### 3.3.3.2. Cosecha de la biomasa

El procedimiento que se describe en ésta sección se llevó a cabo en condiciones estériles, y se hizo con el fin de eliminar los residuos del medio de cultivo YPG, y obtener las células de *Ps. fluorescens* sin ninguna otra sustancia que la bacteria pudiera utilizar como fuente de carbono.

- a) A las 24 horas de incubación del cultivo, se dividió en porciones de 250 ml y se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 10 minutos.
- b) Se decantó el medio de cultivo sobrenadante y con el propósito de eliminar la máxima cantidad de residuos del medio YPG, se hicieron tres lavados con solución salina estéril al 0.85 %.
- c) Se resuspendieron las células en 250 ml de medio mínimo.

### 3.3.3.3. Acondicionamiento de reactores

1. Se lavaron los reactores y todos los accesorios requeridos con jabón; se enjuagaron con agua, se agregó hipoclorito de calcio y se enjuagaron con agua destilada.
2. Se esterilizaron con luz U.V durante 15 minutos en campana de flujo laminar.
3. Se instalaron los reactores y se adaptaron las conexiones para la aereación.
4. Se adaptó la tubería de vidrio de los reactores a los matraces receptores (trampas) del CO<sub>2</sub> generado. Se agregaron 250 ml de Ba(OH)<sub>2</sub> y 3 gotas de indicador de fenolftaleína a los matraces Erlenmeyer.
5. Se llenaron los reactores con el medio mínimo estéril, el reactor biótico con 9.75 l y el reactor abiótico con 10 l y se reguló la aereación entre 8 -10 ml/minuto.
6. Se adicionaron 250 ml de medio mínimo que contenían la biomasa a los reactores bióticos y se aclimataron las células al medio mínimo durante 24 horas con aereación continua. Se determinaron los parámetros de control de crecimiento y del experimento al medio de cultivo antes de adicionar el tolueno.
7. Se agregó el tolueno determinando previamente las cantidades requeridas para obtener la concentración deseada en cada reactor. Se dejaron 10 minutos de tiempo de homogeneización. Se determinaron todos los parámetros de control iniciales.
8. Las trampas de CO<sub>2</sub> se cambiaron cada vez que la solución de hidróxido de bario cambiaba de color rosa a incoloro, lo que indicaba que el CO<sub>2</sub> generado en los reactores se había fijado en esta solución y se titulaba con solución de ácido oxálico 0.1 N.

### 3.3.3.4. Monitoreo de los reactores

El control de los reactores se llevó a cabo tomando muestras cada 4 horas durante 3 días, y después cada 24 horas, determinando los parámetros de control con los métodos de análisis que se muestran en la tabla 11.

El experimento tuvo una duración total de 172 horas.

### 3.3.4. Experimentos para la biodegradación de tolueno en reactores de 3 l

En la cuarta etapa de experimentación, se determinó la biodegradación de tolueno en reactores de 3 l. El experimento se hizo por duplicado para tener reproducibilidad de los resultados. Los reactores bióticos se identificaron como reactores 1 y 2, y el control abiótico o blanco como reactor abiótico. Con el propósito de tener mejor control del experimento se utilizaron reactores de 3 l, sellados herméticamente para evitar en lo posible la desorción del tolueno. El flujo de aereación fue entre 8 y 10 ml/minuto. El arreglo experimental se muestra en la fotografía 4.

La primera fase del experimento se llevó a cabo en batch y la concentración de tolueno alimentada fue de 500 mg/l en los tres reactores. El cambio de concentración del experimento anterior a éste, fue debido a la alta desorción en los reactores como se mostrará mas adelante y se pretendió que con la alimentación de 500 mg/l obtener una concentración residual de tolueno de aproximadamente el 15 al 20 % de la alimentación en los reactores. La segunda fase del experimento fue con alimentación en semicontinuo adicionando a los reactores 500 mg/l de tolueno cada 24 horas.

La metodología para el crecimiento de la bacteria, la cosecha de la biomasa, y el acondicionamiento de reactores se describe en las secciones 3.3.3.1. , 3.3.3.2. y 3.3.3.3.

A partir del cultivo obtenido después del lavado de células (sección 3.3.3.2), se elaboró una curva de peso seco con el fin de obtener la correlación entre los parámetros de crecimiento indirecto de turbiedad y densidad óptica con los parámetros de medición directa de sólidos suspendidos y cuenta bacteriana en placa. El parámetro que mejor describe el crecimiento bacteriano fue la densidad óptica, que fue la medición que se hizo para esta etapa de experimentación.

El procedimiento para la elaboración de la curva de peso seco fue el siguiente:

- a) Se tomaron volúmenes de 2, 4, 6, 8, y 10 ml del cultivo de medio mínimo y se aforó a 10 ml con medio mínimo estéril.
- b) De éstas resuspensiones se tomó un ml y se aforó a 50 ml para determinar la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm, usando como blanco una dilución 1/50 de medio mínimo.
- c) De las resuspensiones de 10 ml, se tomaron 6 ml y se filtraron en membranas de celulosa con tamaño de poro de 0.2  $\mu$ , previamente taradas.
- d) Se secaron a 103 °C por 3 horas hasta peso constante.
- e) Por diferencia de peso se determinó la concentración celular.
- f) De la resuspensión de 10 ml, se tomó 1 ml y se determinó la cuenta bacteriana en placa.
- g) Se graficaron los datos de concentración celular contra densidad óptica a 540 nm, la turbiedad y cuenta bacteriana en placa.





Fotografía 4. Experimento de la biodegradación de tolueno en reactores de 3l

#### 3.3.4.1 Monitoreo de los reactores

La primera fase del experimento se llevó a cabo en batch y el monitoreo se hizo cada 3 horas durante 2 días y después cada 24 horas durante 3 días. Después de éste periodo se inició la segunda fase del experimento en semicontinuo alimentando los reactores con 500 mg/l de tolueno cada 24 horas, con tiempo de retención hidráulica de 24 horas. El monitoreo se hizo cada 24 horas.

Los parámetros de control determinados fueron :

- Control del experimento: pH, temperatura del biocultivo y ambiente, oxígeno disuelto y  $\text{CO}_2$ .
- Control de crecimiento: Densidad óptica a 540 nm
- Control de biodegradación :  $\text{DQO}_{\text{soluble}}$  y determinación de concentraciones residuales de tolueno por cromatografía de gases.

### 3.3.5. Experimentos para la biodegradación de tolueno en reactores de 3 l en semicontinuo

En la quinta etapa de experimentación se determinó la biodegradación de tolueno en reactores de 3 l alimentados en semicontinuo, para determinar el comportamiento de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* y la estabilidad del sistema en la remoción del tolueno. El experimento se hizo por duplicado para tener reproducibilidad de los resultados. Los reactores bióticos se identificaron como reactor 1 y 2 y el control abiótico o blanco como reactor abiótico. Se utilizaron los reactores descritos en la sección 3.3.4. La modificación que se hizo fue minimizar la aereación a 5 ml/minuto de manera que se mantuviera el oxígeno disuelto como mínimo en 2 mg/l. El tiempo de retención hidráulica fue de 24 horas.

Se utilizaron los reactores en las mismas condiciones que en la sección 3.3.4.

#### 3.3.5.1. Monitoreo de los reactores

El control de los reactores se llevó a cabo tomando muestras cada 24 horas hasta finalizar el experimento. La alimentación se hizo cada 24 horas adicionando a los reactores el volumen de medio mínimo estéril que se haya tomando para el muestreo con el fin de mantener el mismo volumen de medio en los reactores. El experimento tuvo una duración de 21 días.

Los parámetros de control determinados fueron :

- Control del experimento: pH, temperatura del biocultivo y ambiente, oxígeno disuelto y CO<sub>2</sub>.
- Control de crecimiento: Densidad óptica a 540 nm
- Control de biodegradación: Concentraciones residuales de tolueno por cromatografía de gases.

### 3.3.6. Cuantificación de la biodegradación.

La biodegradación fue cuantificada por las concentraciones residuales de tolueno medidas por Cromatografía de Gases con Detector Selectivo de Masas, de acuerdo al Método 624 EPA para la determinación de compuestos orgánicos volátiles por purga y trampa, acoplado al detector selectivo de Espectroscopia de Masas.

Las muestras se tomaron por duplicado en viales de 25 ml con tapón de rosca con orificio en el centro y septa de teflón. Los viales se llenaron hasta el borde evitando la formación de burbujas de aire a través de la muestra y se mantuvieron en refrigeración a -2 °C hasta el momento del análisis.

Para la determinación de las concentraciones de tolueno, se colocaron 5 ml de la muestra en una jeringa y se inyectaron al sistema de purga y trampa. El tolueno fue arrastrado por el gas acarreador (que en este caso fue Helio), y detectado por el detector selectivo de masas.

#### 3.3.6.1. Condiciones cromatográficas CG-EM

Flujo de aire: 20-24 l/minutos  
Flujo de He : 4-6 l/minuto  
Presión de aire: 500-2000 psig  
Presión de He: 500-2000 psig  
Temperatura del horno: inicial, 32 °C ; final, 240 °C  
Temperatura del inyector: 225 °C  
Temperatura del detector: 270 °C  
Tiempo total de la corrida: 20.36 minutos

#### 3.3.6.2. Condiciones del sistema de purga y trampa

Tiempo de purga : 11 minutos  
Tiempo de desorción: 45 segundos  
Tiempo de cocinado o limpiado: 20 minutos  
Flujo : 2-4 ml/minuto

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan los resultados de los experimentos realizados para determinar el comportamiento de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* en diferentes condiciones experimentales, así como la cinética de la degradación del tolueno.

### 4.1 Experimentos en matraces para el estudio del crecimiento bacteriano en presencia de tolueno

En la gráfica 1 se observan las curvas de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en presencia de diferentes concentraciones de tolueno. La curva de crecimiento en medio mínimo con 20 mg/l de tolueno presentó un rápido crecimiento y en un día alcanzó una concentración de 600 UTN (unidades de turbiedad nefelométrica), que se mantuvo durante cuatro días, iniciando un decaimiento lento a partir del sexto día.

Para la concentración de 40 mg/l de tolueno se observó un comportamiento similar a la curva de 20 mg/l, que se indicó con una concentración de biomasa similar, alcanzando un crecimiento máximo de 650 UTN durante tres días, para iniciar el decaimiento de la biomasa a partir del cuarto día.

En la curva de crecimiento para 90 mg/l de tolueno se observó un comportamiento diferente. En el primer día hubo decaimiento de la biomasa seguido de una fase lag de tres días. Al cuarto día se observó poco crecimiento de la biomasa, sólo de 100 UTN que se mantuvo hasta el séptimo día, a partir del cual empezó la etapa de decaimiento.

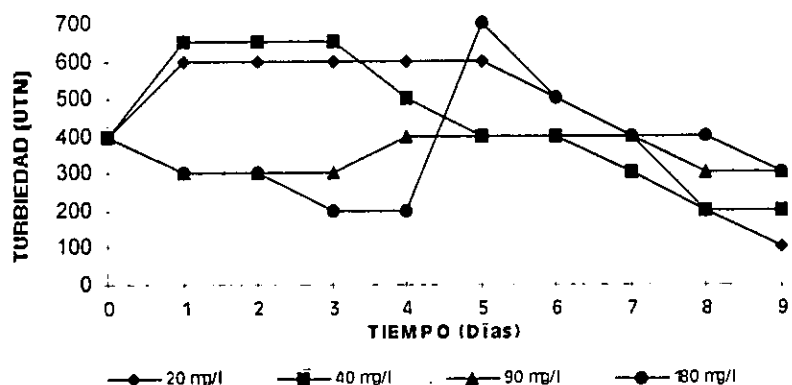
En la concentración de 180 mg/l de tolueno se observó una fase de decaimiento de biomasa durante los primeros cuatro días, seguido de un rápido crecimiento de un día para iniciar la etapa de decaimiento. Este último comportamiento no siguió el mismo patrón de las curvas anteriores.

Los resultados de los experimentos con concentraciones de tolueno de 20 y 40 mg/l, mostraron curvas de crecimiento típicas, observándose mayor duración de la etapa de crecimiento máximo de cinco días, para la menor concentración de tolueno y de sólo tres días para 40 mg/l de tolueno.

En la curva de crecimiento con 90 mg/l de tolueno se observó una ligera inhibición del crecimiento, seguida por una etapa lag de tres días, después una etapa de crecimiento máximo de 400 UTN que aunque fue inferior a las obtenidas con las anteriores concentraciones, se mantuvo durante cuatro días, lo que indicó buena aclimatación o adaptación de la bacteria esta dosis de tolueno.

Con dosis de 180 mg/l de tolueno se observó claramente la inhibición y el decaimiento de la biomasa, sin embargo el rápido crecimiento observado posteriormente, hace suponer que la bacteria puede soportar esta concentración con una etapa de aclimatación previa.

GRÁFICA 1. CRECIMIENTO DE *Ps. fluorescens* A  
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TOLUENO



#### 4.2. Experimentos de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en reactores batch de 10 l a temperatura ambiente

El crecimiento de la biomasa fue medido por diferentes parámetros para determinar cuál representaría mejor el crecimiento de la bacteria, por lo que se determinó como turbiedad (gráfica 2); sólidos suspendidos totales (gráfica 3), densidad óptica a 540 nm (gráfica 4), cuenta bacteriana en placa (gráfica 5). La remoción de tolueno fue medida como  $DQO_{soluble}$  (gráfica 6).

Para la concentración de 25 mg/l de tolueno se observó crecimiento máximo de la biomasa de 1000 UTN al primer día, seguido de una etapa de crecimiento entre 800 y 600 UTN hasta los 12 días y posteriormente una etapa lenta de decaimiento. Los sólidos suspendidos totales no siguen la misma tendencia, al segundo día se observó el crecimiento máximo y a partir del sexto día empezó una disminución paulatina de la biomasa. En el crecimiento medido como densidad óptica, se observó crecimiento máximo de 1.364 unidades de absorbancia (u.a.) al segundo día, seguido de una etapa de crecimiento hasta el quinto día y después una etapa lenta de decaimiento. La cuenta bacteriana en placa mostró crecimiento máximo de  $3 \times 10^8$  ufc/ml al segundo día, seguida de una etapa lenta de decaimiento. Respecto a la remoción de tolueno medida como  $DQO_{soluble}$  se observó una reducción del 72% durante los primeros 12 días y después continuó con una concentración constante de alrededor de 300 mg/l durante los otros ocho días que duró el experimento.

En la concentración de 50 mg/l de tolueno se observó una fase lag de un día, seguida de una fase de crecimiento que alcanzó el máximo de 1000 UTN al sexto día, posteriormente una etapa lenta de decaimiento. Los sólidos suspendidos totales alcanzaron el máximo crecimiento al segundo día y después una disminución paulatina de la biomasa. En el crecimiento medido como densidad óptica, se observó crecimiento máximo de 1.398 u.a. al segundo día, seguido de una etapa de crecimiento. La cuenta bacteriana en placa mostró crecimiento máximo de  $2.5 \times 10^8$  ufc/ml al segundo día, seguida de una etapa lenta de decaimiento. La remoción de tolueno como  $DQO_{soluble}$  se observó en

los primeros 10 días y continuó con una concentración constante alrededor de 250 mg/l hasta el final del experimento.

A **concentración de 100 mg/l de tolueno** se observó inicialmente una fase de decaimiento de un día, después se inició el crecimiento hasta 600 UTN al sexto día que se mantuvo durante cuatro días, seguido de una etapa de decaimiento. La concentración de SST guardó correlación con la densidad óptica, en la cual se observó la máxima cantidad de biomasa al quinto día, seguido de una etapa de decaimiento. En el crecimiento medido como densidad óptica, se observó una fase lag de dos días y crecimiento máximo de 1.164 u.a. al quinto día, seguido de una etapa lenta de decaimiento. La cuenta bacteriana en placa mostró crecimiento máximo de  $5.7 \times 10^7$  ufc/ml al quinto día, seguida de una etapa de decaimiento. La remoción de tolueno como  $DQO_{\text{soluble}}$  se realizó en los primeros 12 días, manteniéndose una concentración promedio de 250 mg/l hasta el final del experimento.

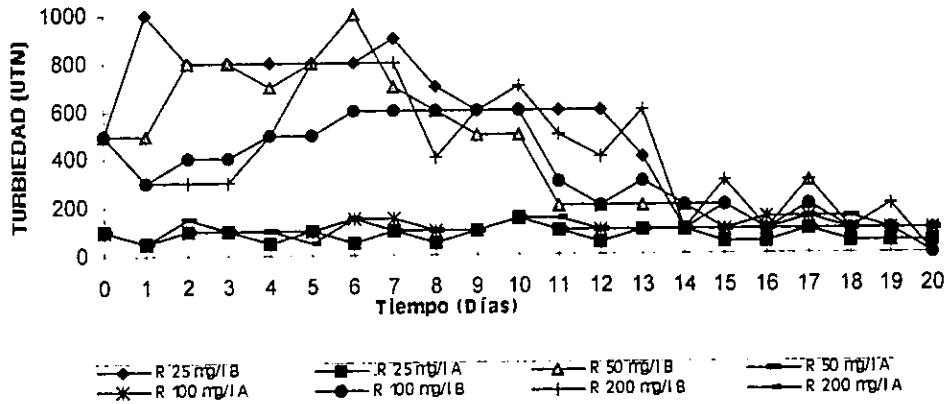
En el comportamiento del experimento para la **concentración de 200 mg/l de tolueno** se observó inicialmente un decaimiento de la biomasa en los primeros tres días, seguido de una rápida recuperación y crecimiento entre el cuarto y séptimo día de 800 UTN y posteriormente una etapa lenta de decaimiento. Los sólidos suspendidos presentaron un comportamiento similar alcanzando el máximo crecimiento al cuarto día. En el crecimiento medido como densidad óptica, se observó una fase lag de 4 días, con crecimiento máximo de 1.324 u.a. al quinto día, seguido de la fase de decaimiento. La cuenta bacteriana en placa mostró crecimiento máximo de  $4.2 \times 10^7$  ufc/ml al quinto día, seguida de la etapa de decaimiento. La degradación de la DQO fue de aproximadamente el 70% en los primeros días, continuando con un valor promedio 300 mg/l hasta el final del experimento.

El crecimiento bacteriano fue medido como turbiedad y densidad óptica a 540 nm (métodos indirectos de medición de la biomasa) y sólidos suspendidos totales y cuenta bacteriana en placa (métodos directos de medición de la biomasa), observándose la misma tendencia de crecimiento en los parámetros de densidad óptica, sólidos suspendidos totales y cuenta bacteriana en placa, (ésta determinada durante los primeros 8 días que hubo crecimiento de la bacteria); la turbiedad no mostró la misma tendencia que los otros parámetros, lo que nos indicó que la densidad óptica es el método indirecto confiable de medición de la biomasa en nuestro experimento.

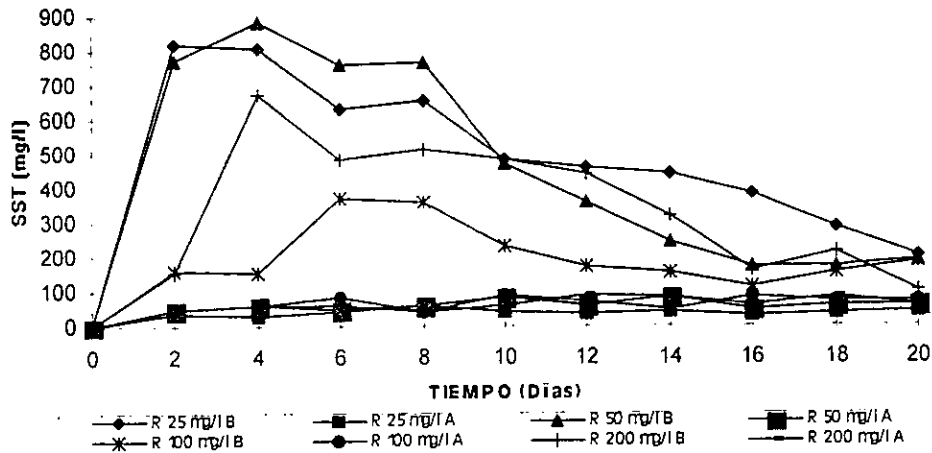
La degradación de la materia orgánica medida como  $DQO_{\text{soluble}}$  fue de 70% en todos los experimentos. Esta degradación se debe principalmente al consumo de substratos aportado por el medio rico (YPG) que contribuye con una DQO de 1000 mg/l. La DQO aportada por el tolueno sólo corresponde a un 10%, por lo tanto no se puede confirmar en esta fase del experimento que la  $DQO_{\text{soluble}}$  que se determinó corresponde solo a la degradación del tolueno por *Ps. fluorescens*, necesiéndose hacer la cuantificación del tolueno por la técnica de cromatografía de gases debido a que es un método de análisis muy confiable para cuantificar concentraciones residuales trazas de tolueno. La DQO es una medida indirecta de la cantidad de materia orgánica susceptible de ser oxidada por medios químicos.

La pérdida de tolueno por desorción en los testigos fue de aproximadamente un 50 % en los primeros seis días, después de los cuales continuaron con una concentración constante de tolueno entre 50-30 mg/l.

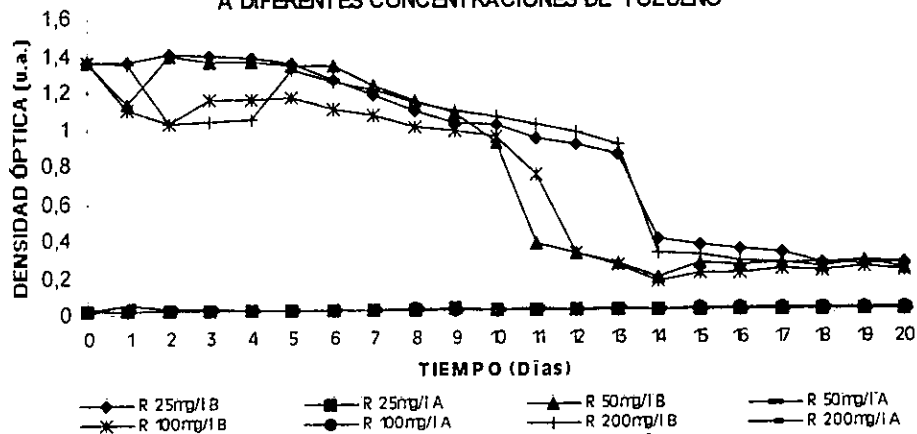
GRÁFICA 2. CRECIMIENTO DE *Ps fluorescens* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TOLUENO



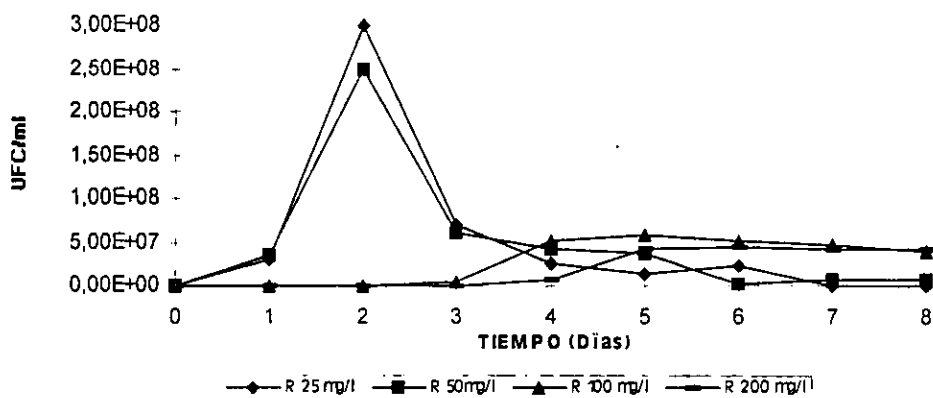
GRÁFICA 3. CRECIMIENTO DE *Ps fluorescens* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TOLUENO



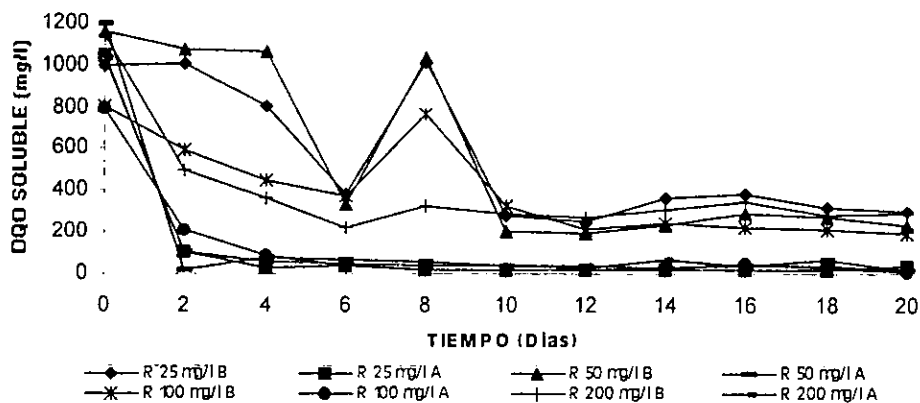
GRÁFICA 4. CRECIMIENTO DE *Ps fluorescens* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TOLUENO



GRÁFICA 5. CRECIMIENTO DE *Ps. fluorescens* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TOLUENO



GRÁFICA 6. EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE TOLUENO MEDIANTE DQO SOLUBLE



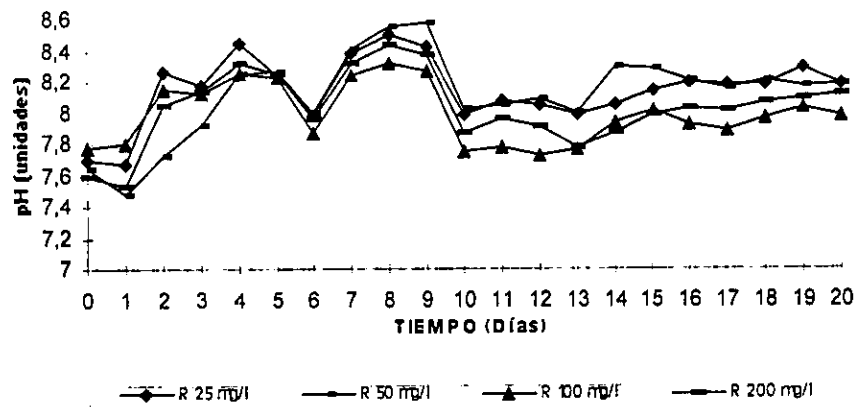
La gráfica 7 muestra que el pH se mantuvo entre los rangos de 7.6 y 8.42 unidades en los cuatro reactores durante el experimento.

La temperatura permaneció entre 18°C y 22.1°C en todos los reactores como se observa en la gráfica 8.

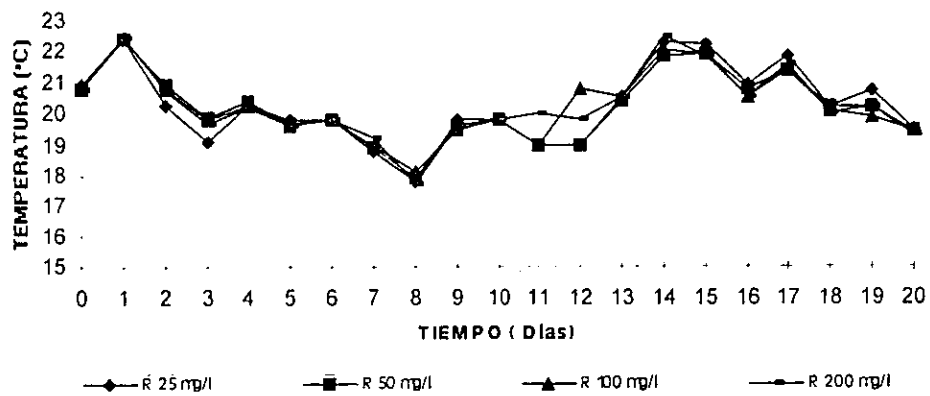
El oxígeno disuelto en promedio fue de 6.75 mg/l durante el experimento, como se muestra en la gráfica 9.



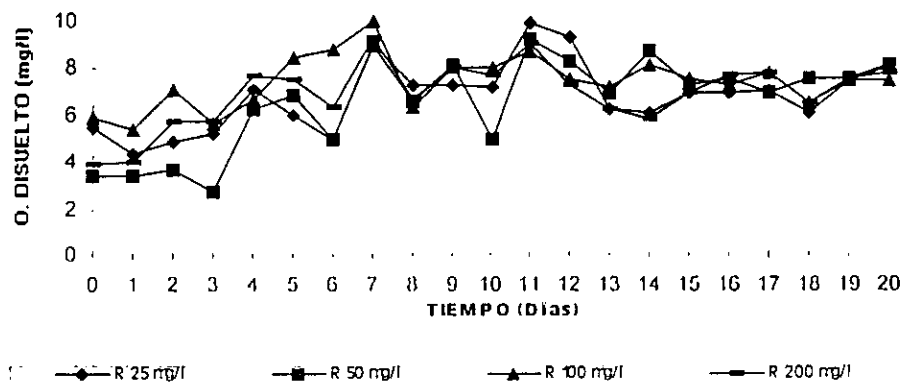
GRÁFICA 7. CONTROL DEL pH EN EL CRECIMIENTO DE *Ps. fluorescens*



GRÁFICA 8. CONTROL DE LA TEMPERATURA DURANTE EL CRECIMIENTO DE *Ps. fluorescens*



GRÁFICA 9. CONTROL DE OXÍGENO DISUELTO EN EL CRECIMIENTO DE *Ps. fluorescens*



#### 4.3. Experimentos para la determinación de la cinética de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* y de la degradación del tolueno

En esta sección se muestran los resultados del experimento para obtener los datos para la determinación de la cinética de crecimiento bacteriano y de consumo del sustrato. El experimento tuvo una duración total de 172 horas, pero sólo se muestran los resultados obtenidos en la fase crecimiento de la bacteria y del consumo del tolueno, debido a que son los datos significativos del experimento con los que se determinaron las constantes cinéticas de la degradación del tolueno.

En el reactor con **concentración de tolueno de 25 mg/l** después de 30 minutos de la aplicación de tolueno a los reactores, se observó en el reactor biótico desorción del 79.16% y la concentración de tolueno fue de 5.21 mg/l, en el reactor abiótico la desorción fue del 76.84% y la concentración de tolueno fue de 5.79 mg/l. A partir de éste momento, después de 4 horas se tiene un rápido consumo de tolueno por la bacteria de 5.21 mg/l a 0.56 mg/l, alcanzándose la remoción del 100 % a las 32 horas. En el control abiótico la desorción es del 90.59% y se mantuvo una concentración residual de tolueno de 0.21 mg/l (gráfica 10), hasta el final del experimento.

En la gráfica 11, se observa que la  $DQO_{\text{soluble}}$  inicial fue de 2 300 mg/l en ambos reactores. A las 24 horas, el biocultivo tuvo una remoción de  $DQO_{\text{soluble}}$  del 99.78 % y en el reactor abiótico la remoción por desorción fue del 98.04 %. A las 48 horas se observó la remoción total del tolueno medido como  $DQO_{\text{soluble}}$  en ambos reactores.

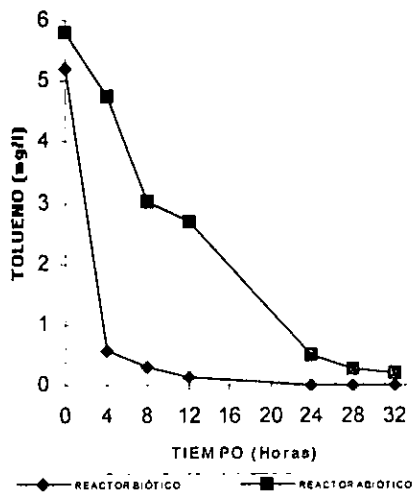
El crecimiento de la biomasa medido como densidad óptica, presentó una fase lag de 8 horas, de 0.029 a 0.034 u.a., seguida de una fase de crecimiento de las 12 hasta las 32 horas de 0.038 - 0.048 u.a., después inició la fase estacionaria como se observa en la gráfica 12. En el control abiótico, la densidad óptica se mantuvo entre 0.023 y 0.025 u.a.

La gráfica 13 muestra que el oxígeno disuelto se mantuvo entre 5.5 y 6.5 mg/l en el biocultivo.

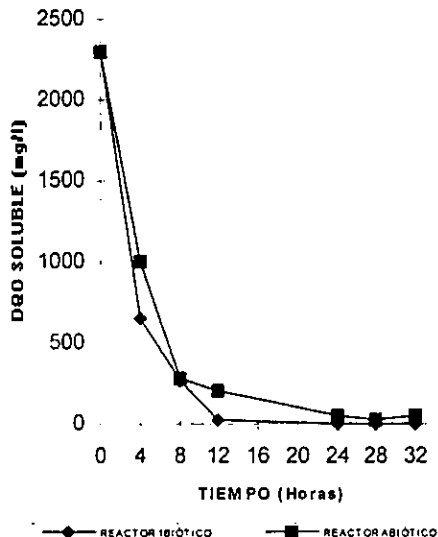
El pH permaneció entre 7.08 y 6.66 unidades, como se aprecia en la gráfica 14.

En la gráfica 15 se observa que la temperatura se mantuvo entre 16.1 y 20.9 °C.

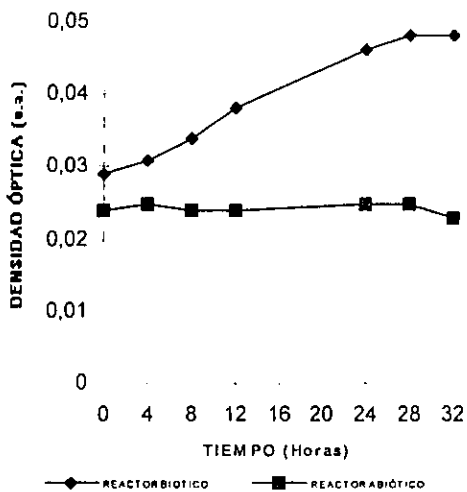
GRÁFICA 10. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE C.G.-E.M.



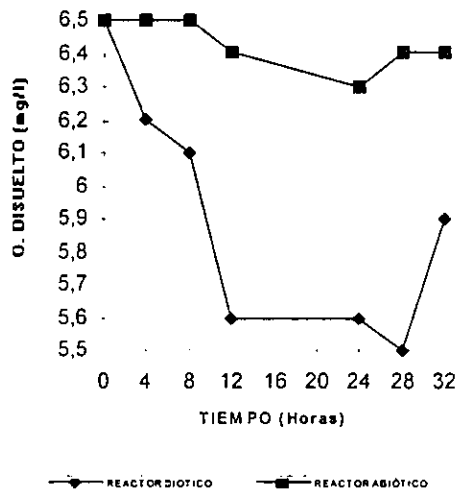
GRÁFICA 11. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE DQO SOLUBLE



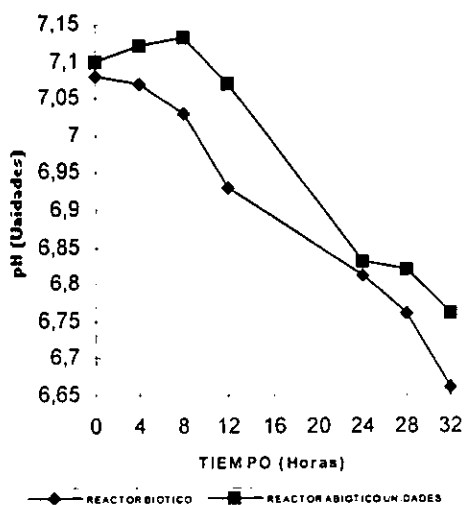
GRÁFICA 12. CRECIMIENTO DE Ps. fluorescens EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



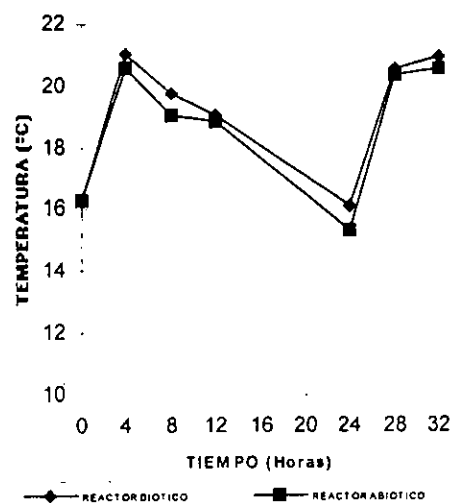
GRÁFICA 13. CONTROL DE OXÍGENO DISUELTO EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



GRÁFICA 14. CONTROL DEL pH EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE TOLUENO



GRÁFICA 15. CONTROL DE TEMPERATURA EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



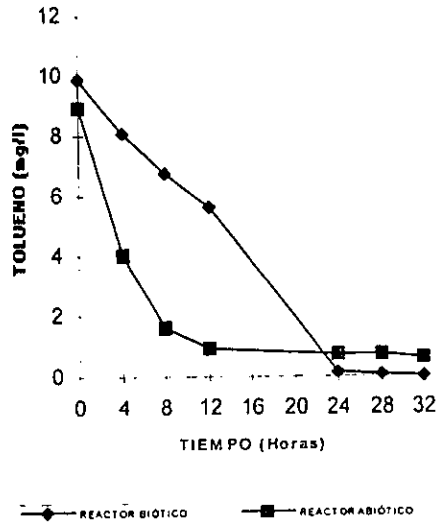
En la concentración de 50 mg/l de tolueno, después de 30 minutos de la alimentación, en el reactor biótico se tuvo una desorción del 80.28% y la concentración del tolueno fue de 9.86 mg/l, el consumo total del tolueno se dio a las 32 horas. En el reactor abiótico la desorción fue del 82.14% y la concentración de tolueno de 8.93 mg/l, a las 24 horas la desorción fue del 93.17 %, quedando un residual de 0.61 mg/l de tolueno hasta el final del experimento, como se muestra en la gráfica 16.

La demanda química de oxígeno (gráfica 17), presentó valores de 2 150 mg/l en ambos reactores. A las 32 horas el biocultivo tuvo una remoción de  $DQO_{\text{soluble}}$  del 99.77% por biodegradación y en el reactor abiótico la remoción por desorción fue del 98.60%, manteniéndose un residual de 42.50 mg/l de  $DQO_{\text{soluble}}$ .

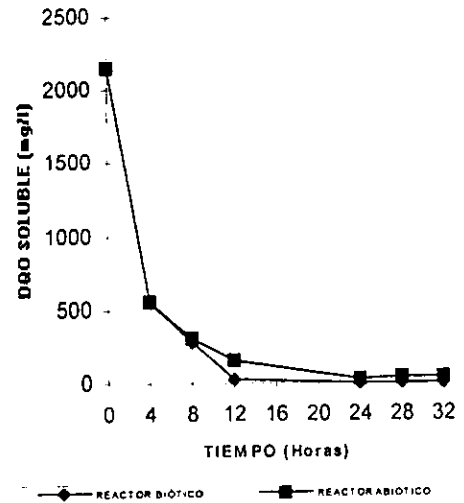
En el reactor biótico, el crecimiento de la biomasa medido como densidad óptica (gráfica 18), se presentó una fase lag de 12 horas, de 0.026 u.a., seguida de una fase de crecimiento de las 24 a las 32 horas, desde 0.026 a 0.046 u.a., para después iniciar una fase estacionaria. En el reactor abiótico, la densidad óptica se mantuvo entre 0.011 y 0.014 u.a.

El oxígeno disuelto se mantuvo entre 5.1 y 6.5 mg/l, el pH entre 7.02 y 6.59 unidades y la temperatura entre 16.1 y 21.1 °C como se observa en las gráficas 19, 20 y 21 respectivamente.

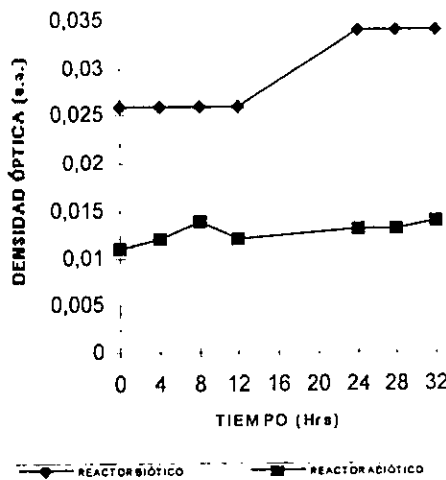
GRÁFICA 16. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE C.G.-E.M.



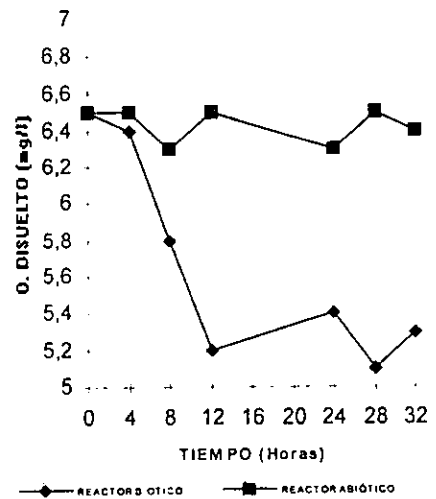
GRÁFICA 17. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE DDO



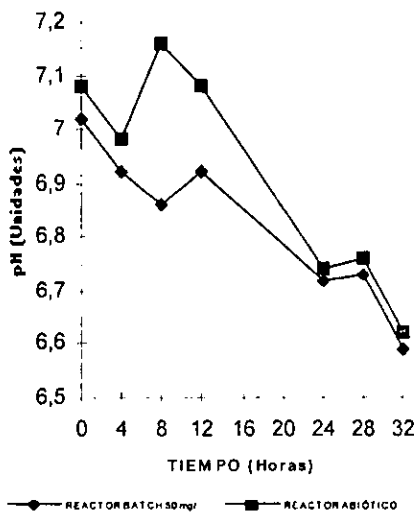
GRÁFICA 18. CRECIMIENTO DE *Ps. fluorescens* EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



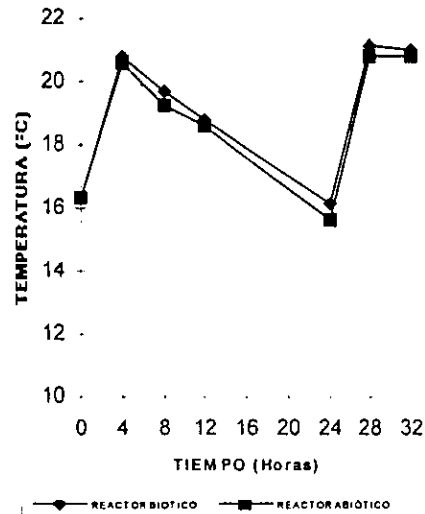
GRÁFICA 19. CONTROL DE OXÍGENO DISUELTO EN LA CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO



GRÁFICA 20. CONTROL DEL pH EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



GRÁFICA 21. CONTROL DE TEMPERATURA EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



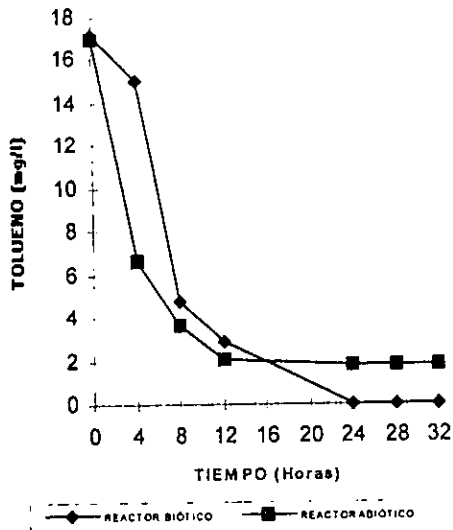
En el reactor a **concentración de 75 mg/l de tolueno**, después de 30 min. de alimentar tolueno como sustrato, se observó en el reactor biótico desorción del 77.07 y concentración de tolueno de 17.20 mg/l, mientras que en el reactor abiótico la desorción fue del 77.36% y la concentración de tolueno de 16.98 mg/l. En el reactor biótico, a las 4 horas tuvo una concentración de tolueno de 15 mg/l debido a que las bacterias fijan el tolueno en su pared celular y a las 24 horas, se tuvo el consumo total del sustrato. En el reactor abiótico a las 4 horas se tuvo una rápida desorción hasta 6.64 mg/l y se mantuvo un residual de tolueno de 1.81 mg/l hasta el final del experimento. La DQO<sub>soluble</sub> inicial en ambos reactores fue de 2 025.0 mg/l, a las 32 horas la remoción en el reactor biótico fue del 98.76 % y en el reactor abiótico fue de 96.54 %. La remoción al 100% en ambos reactores se tuvo a las 48 horas, como se aprecia en la gráfica 22.

En la gráfica 24, se observa que en el reactor biótico, el crecimiento de la biomasa fue medido como densidad óptica y presentó una fase lag de 12 horas, de 0.023 u.a., seguida de una fase de crecimiento de las 24 a las 32 horas, desde 0.026 - 0.036 u.a., después se presentó una fase estacionaria. En el reactor abiótico, la densidad óptica se mantuvo entre 0.012 y 0.015 u.a.

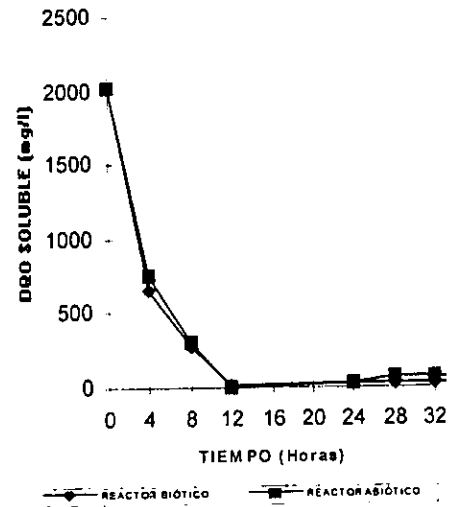
El oxígeno disuelto se mantuvo entre 4.9 y 6.5 mg/l como se observa en la gráfica 25.

El pH se mantuvo entre 7.11 y 6.66 unidades y la temperatura entre 16 y 21 °C, como se muestra en las gráficas 26 y 27 respectivamente.

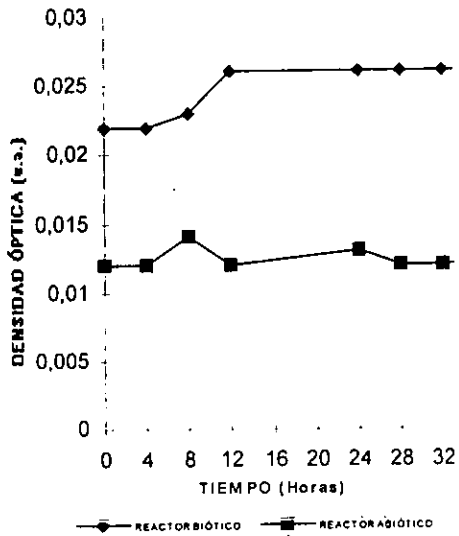
GRÁFICA 22. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE C.G.-E.M.



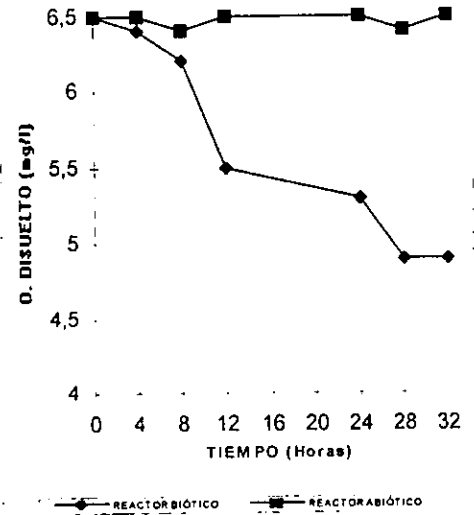
GRÁFICA 23. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE DQO SOLUBLE



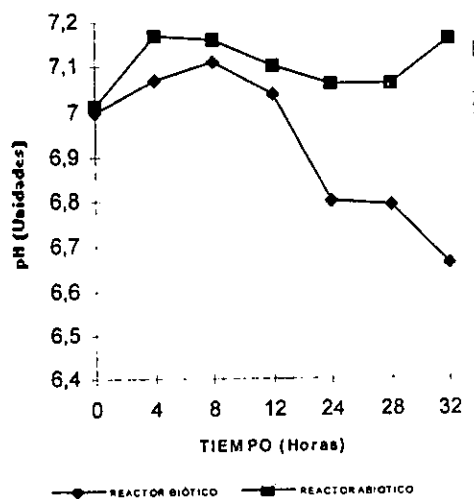
GRÁFICA 24. CRECIMIENTO DE *Ps. fluorescens* EN LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO



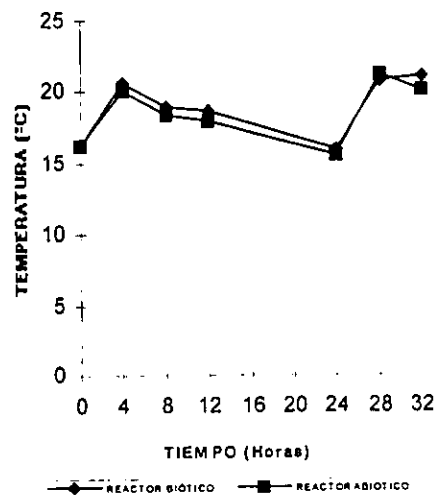
GRÁFICA 25. CONTROL DE OXÍGENO DISUELTO EN LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO



GRÁFICA 26. CONTROL DEL pH EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



GRÁFICA 27. CONTROL DE TEMPERATURA EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



En la concentración de 100 mg/l de tolueno, después de 30 minutos de la aplicación, el reactor biótico presentó desorción del 80.75% quedando la concentración de tolueno en 19.25 mg/l, mientras que en el reactor abiótico la desorción fue del 81.99% y la concentración de tolueno del 18.01 mg/l. En el reactor biótico se observó el consumo total del tolueno a las 32 horas y en el abiótico se mantuvo una concentración residual de 1.90 mg/l hasta el final del experimento, como se observa en la gráfica 28.

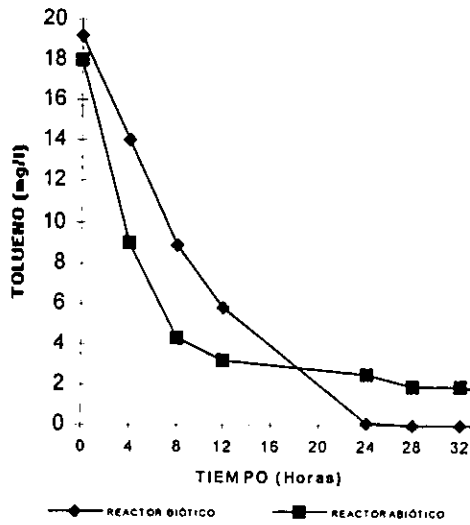
En la gráfica 29 se muestra que ambos reactores tuvieron una  $DQO_{\text{soluble}}$  inicial de 2500 mg/l. La remoción del 100% del tolueno medido como  $DQO_{\text{soluble}}$  se presentó a las 32 horas en el reactor biótico y en el reactor abiótico se mantuvo una concentración de  $DQO_{\text{soluble}}$  de 10 mg/l que fue removido a las 48 horas.

En el reactor biótico, el crecimiento de la biomasa medido como densidad óptica, presentó una fase lag de 24 horas, de 0.027 u.a., seguida de una fase de crecimiento de las 28 a las 32 horas, desde 0.029 - 0.031 u.a., a partir de la cuál se presentó la fase estacionaria. En el reactor abiótico, la densidad óptica se mantuvo entre 0.011 y 0.019 u.a. como se aprecia en la gráfica 30.

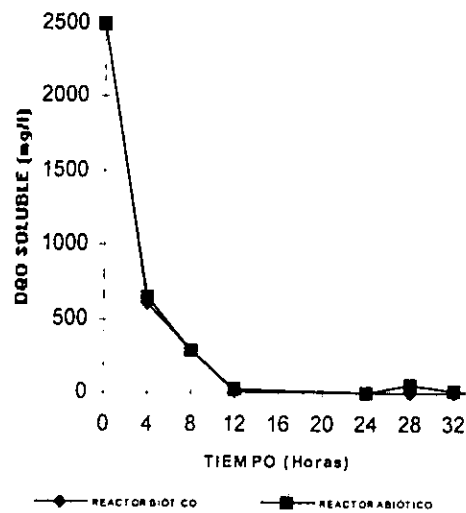
En las gráficas 31, 32 y 33 se observa que el oxígeno disuelto se mantuvo entre 5.1 y 6.5 mg/l, el pH entre 6.74 y 7.27 unidades y la temperatura entre 16.3 y 20.8 °C respectivamente.



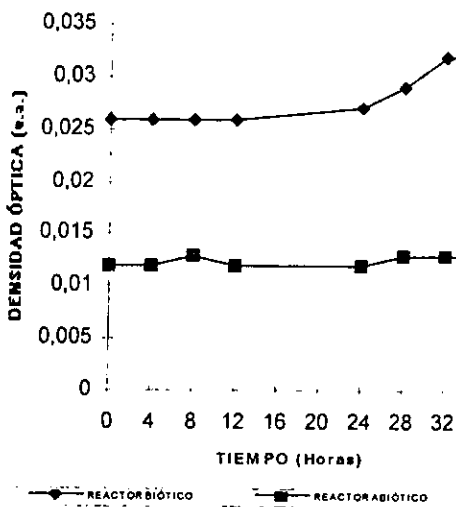
GRÁFICA 28. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE C.G.-E.M.



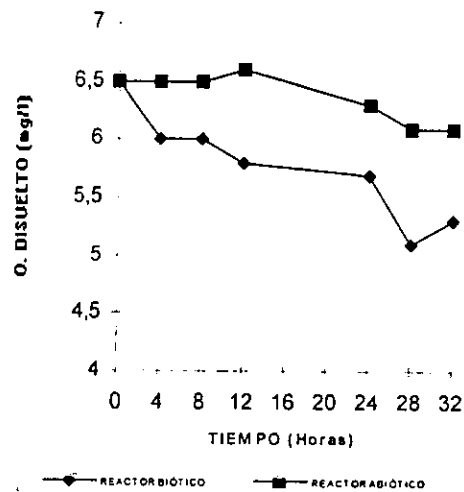
GRÁFICA 29. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE DQO SOLUBLE



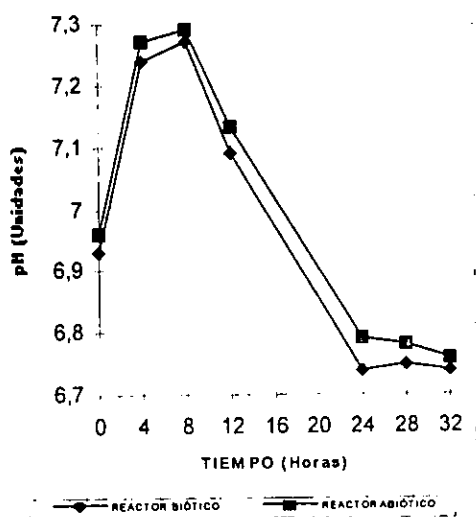
GRÁFICA 30. CRECIMIENTO DE Ps. fluorescens EN LA CINÉTICA DE EGRADACIÓN DEL TOLUENO



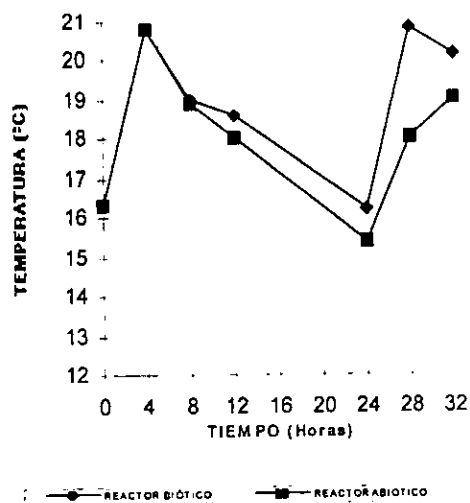
GRÁFICA 31. CONTROL DE OXÍGENO DISUELTO EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE TOLUENO



GRÁFICA 32. CONTROL DEL pH EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



GRÁFICA 33. CONTROL DE TEMPERATURA EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



En la tabla 12 se muestra un resumen de los resultados obtenidos por biodegradación y desorción en cada concentración evaluada.

CONCENTRACIÓN INICIAL DE TOLUENO (mg/l)	% DE DESORCIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN DE TOLUENO DESPUÉS DE LA DESORCIÓN (mg/l)	% DE REMOCIÓN POR BIODEGRADACIÓN
25	79.16	5.21	100
50	80.28	9.86	100
75	77.07	17.20	100
100	80.75	19.25	100

Tabla 12. Resultados comparativos de la remoción de tolueno en batch en el experimento 3

#### 4.4. Experimentos para la biodegradación de tolueno en reactores de 3 l

El experimento se llevo a cabo por duplicado utilizando 3 reactores de 3 l identificados como reactores bióticos 1 y 2, siendo el reactor 2 la repetición del reactor 1. El reactor 3 fue el control abiótico.

El sistema se alimentó primero en batch, adicionando la concentración de tolueno de 500 mg/l en los tres reactores y después siguió alimentándose en semicontinuo, con adiciones de 500 mg/l de tolueno cada 24 horas y tiempo de retención hidráulica de 24 horas.

##### 4.4.1. Sistema alimentado en batch

La desorción después de 30 minutos de la adición de tolueno fue del 96.56% en el reactor 1, 96.95% en el reactor 2 y en el reactor abiótico del 96.68%. Las concentraciones de tolueno fueron de 17.20 mg/l en el reactor 1; 15.26 mg/L en el reactor 2 y de 16.62 mg/l en el reactor abiótico.

En promedio la desorción del tolueno fue del 96.73 % lo que nos indicó por una parte, gran volatilidad que tiene el compuesto y las grandes concentraciones que se transfirieron al aire y por otra parte, que las concentraciones de tolueno que se fijaron en el agua alcanzaron concentraciones de 16.36 mg/l en promedio, que se encuentra arriba del limite permisible para protección a la vida acuática de agua salada que es de 6.30 mg/l para toxicidad aguda, y de 5.00 mg/l para toxicidad crónica y también arriba del límite de protección a la salud humana que es de 14.30 mg/l.

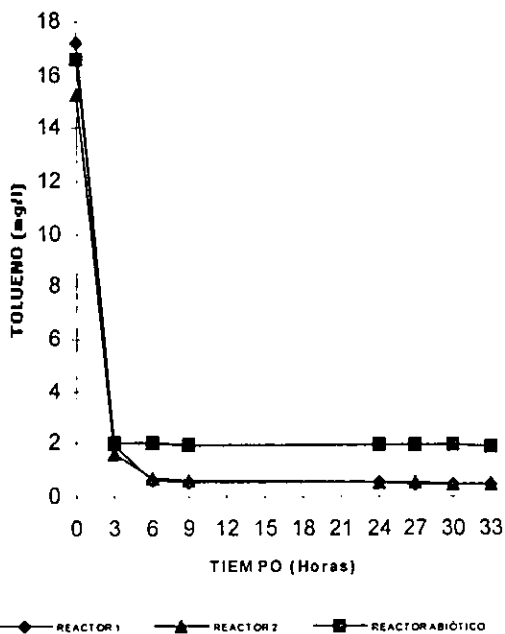
En las primeras 3 horas se observó remoción del tolueno de 17.20 a 1.0 mg/l en el reactor 1, mientras que en el reactor 2 la remoción fue de 15.26 a 1,64 mg/l y de 16.62 a 2 mg/l en el control abiótico. En el reactor 1 a las 32 horas se observó remoción del 97.44%, quedando una concentración residual de tolueno de 0.40 hasta el final del experimento en batch, que tuvo una duración de 127 horas. En el reactor 2, a las 32 horas la remoción fue del 97.18% quedando la concentración residual de tolueno de 0.43 mg/l hasta el fin del experimento en batch, como se observa en la gráfica 34. En el control abiótico, se observó un residual de tolueno de 1.85 mg/l hasta el final del experimento en batch. En forma global la remoción de tolueno por biodegradación fue del 97.31%, el comportamiento en ambos reactores fue semejante, alcanzándose casi los mismos porcentajes de remoción. La remoción por desorción en el reactor abiótico fue del 88.63%. La remoción de tolueno medida como  $DQO_{soluble}$  en los tres reactores, fue del 100 % a las 27 horas, siendo el comportamiento similar tanto por desorción, como por biodegradación, como se aprecia en la gráfica 35.

En relación al crecimiento de la biomasa, para el reactor 1 se observa una fase de inhibición en las primeras 3 horas, con un descenso en la densidad óptica de 0.008 a 0.007 u.a., seguida de una fase de crecimiento hasta las 24 horas, con aumento en densidad óptica de 0.006 a 0.012 u.a., para continuar con la fase estacionaria. En el reactor 2 se presenta una fase lag de 3 horas, seguida de una fase de crecimiento hasta las 24 horas con densidad óptica de 0.008 a 0.011 u.a. , seguida de la fase estacionaria. Como se observa en la gráfica 36, el reactor 1 presento una fase de inhibición debido a que la concentración de tolueno en este reactor fue ligeramente mayor (17.20 mg/l), que en el reactor 2 (16.62 mg/l) dónde se presentó una fase lag de adaptación de la misma

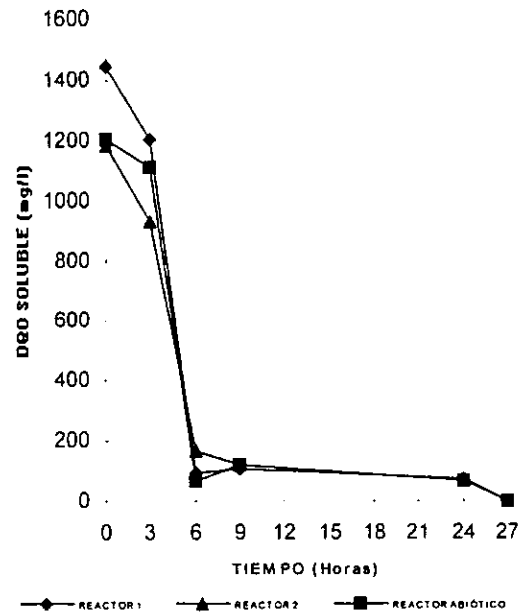
duración. Ambos reactores se adaptaron al tolueno y tuvieron un buen crecimiento de biomasa, siendo mayor en el reactor 1.

El oxígeno disuelto en los reactores 1 y 2, se mantuvo en una concentración entre 6.1 y 7.1 mg/l, como se observa en la gráfica 37. El pH se mantuvo en un rango de 7.03 a 6.91 unidades y la temperatura de 19.4 a 24.2°C en ambos reactores, como se muestra en las gráficas 38 y 39 respectivamente.

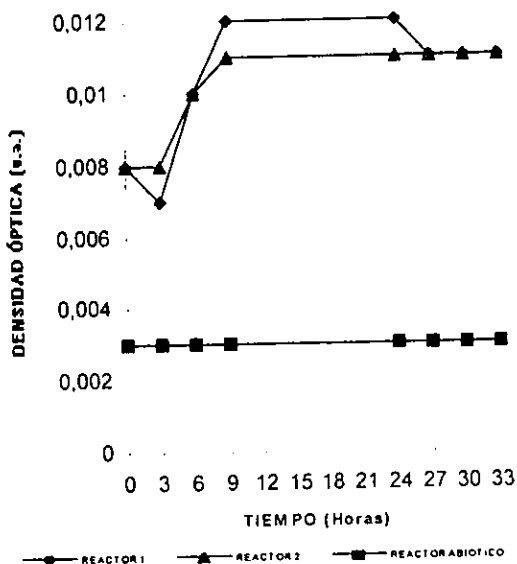
GRÁFICA 34. DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE C.G.-E.M



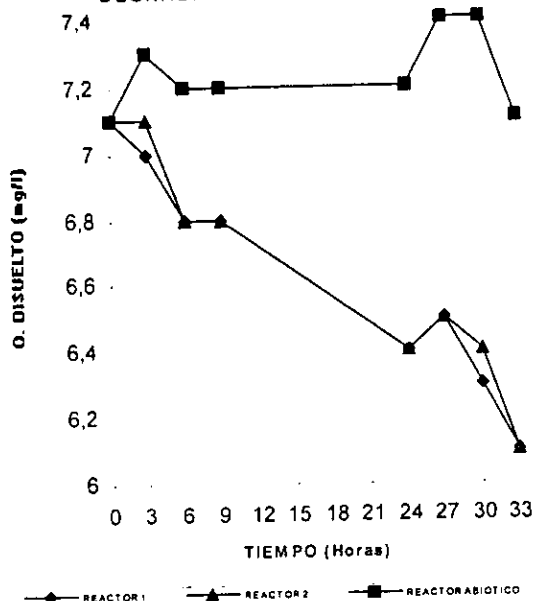
GRÁFICA 35. DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE DQO<sub>SOLUBLE</sub>



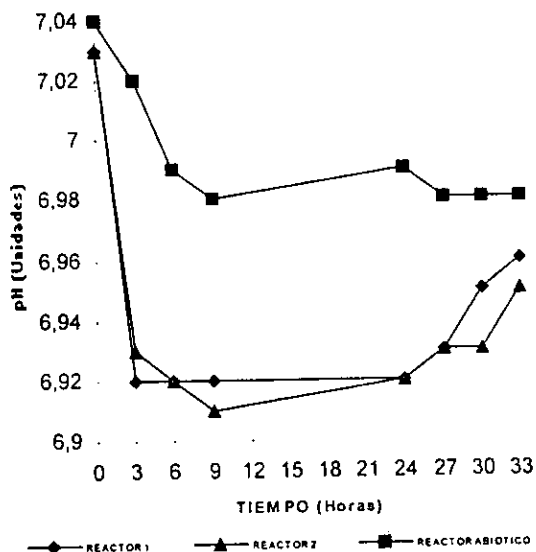
GRÁFICA 36. CRECIMIENTO DE *Ps. fluorescens* EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE TOLUENO



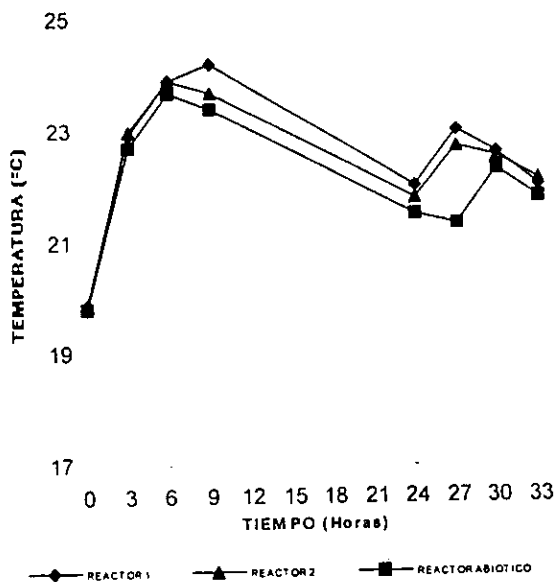
GRÁFICA 37. CONTROL DE OXÍGENO DISUELTO EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



GRÁFICA 38. CONTROL DEL pH EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE TOLUENO



GRÁFICA 39. CONTROL DE TEMPERATURA EN LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL TOLUENO



#### 4.4.2. Sistema alimentado en semicontinuo

En la segunda etapa del experimento, el mismo sistema que fue alimentado en batch continuo alimentándose en semicontinuo cada 24 horas, aplicando 500 mg/l de tolueno y flujo de aire de 10 ml/minuto. El monitoreo de los parámetros de crecimiento, biodegradación y de control, se hizo cada 24 horas por 10 días.

Después de 30 minutos de la alimentación, en el reactor 1 se observó desorción del 96.89% y concentración de tolueno de 15.54 mg/l; en el reactor 2 la desorción fue del 95.30% y la concentración de tolueno de 23.46 mg/l. A las 24 horas se tuvo remoción de tolueno al 100 % en los 2 reactores. En el control abiótico la desorción fue del 96.89% y la concentración del tolueno de 23.53 mg/l, a las 24 horas se mantuvo un residual de tolueno de 0.8 mg/l. Los 3 reactores siguieron alimentándose cada 24 horas con 500 mg/l de tolueno y el comportamiento después de cada adición de tolueno fue semejante al descrito antes. En promedio la remoción por biodegradación de las concentraciones residuales del tolueno después de cada alimentación fue 92.14 % en los reactores 1 y 2 en tanto que en el reactor abiótico la remoción por desorción fue del 74.46 %, como se observa en la gráfica 40.

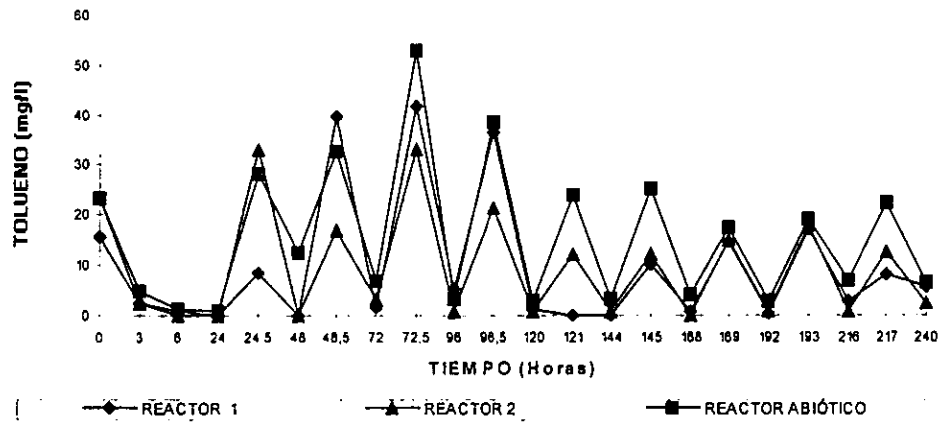
En relación a la DQO el promedio de remoción en los reactores bióticos hasta las 120 horas fue del 59.77% para el reactor 1, 74.46% para el reactor 2 y del 57 % para el reactor abiótico; después de este tiempo no fue posible cuantificar la remoción por  $DQO_{soluble}$  ya que las mediciones fueron casi las mismas antes y después de la aplicación del tolueno lo cual no nos indicó la tendencia del sistema en cuanto a remoción por  $DQO_{soluble}$ . Mediante cromatografía de gases se comprobó que la concentración residual de tolueno fue mayor después de cada aplicación y esta concentración no fue detectada por medio de la DQO, por lo que concluimos la DQO no es un parámetro que nos indique la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes, ya que solo una fracción de tolueno es oxidable por éste método y no indica el comportamiento del biocultivo respecto al consumo del tolueno (Gráfica 41).

El crecimiento de la biomasa se muestra en la gráfica 42 y fue medido por medio de la densidad óptica en los reactores, se observó una fase de crecimiento de 0.0015 u.a. en promedio para los reactores 1 y 2 después de cada alimentación durante el experimento. En el reactor abiótico, el valor de la densidad óptica se mantuvo en promedio en 0.005 u.a.

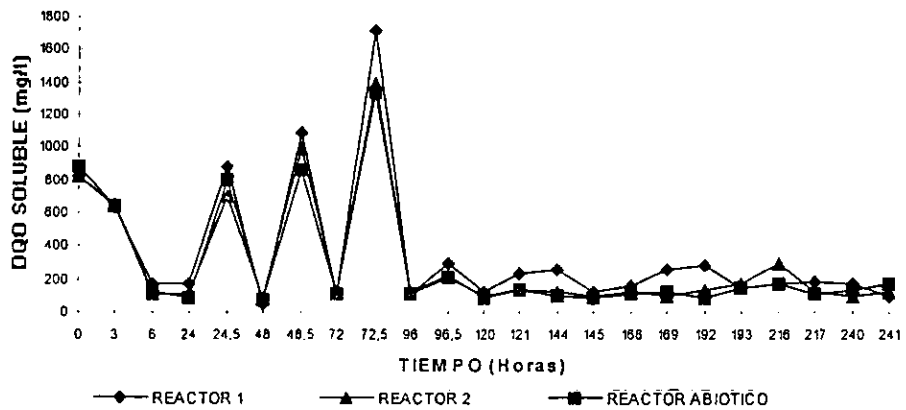
El oxígeno disuelto (gráfica 43), se mantuvo entre 3 y 6.9 mg/l en los reactores 1 y 2 durante el experimento, manteniéndose el cultivo en buenas condiciones aerobias.

El pH en los reactores 1 y 2 permaneció entre de 7.09 y 6.85 unidades y la temperatura en un rango de 18.4 a 24.4 °C en ambos reactores, como se aprecia en las gráficas 44 y 45 respectivamente.

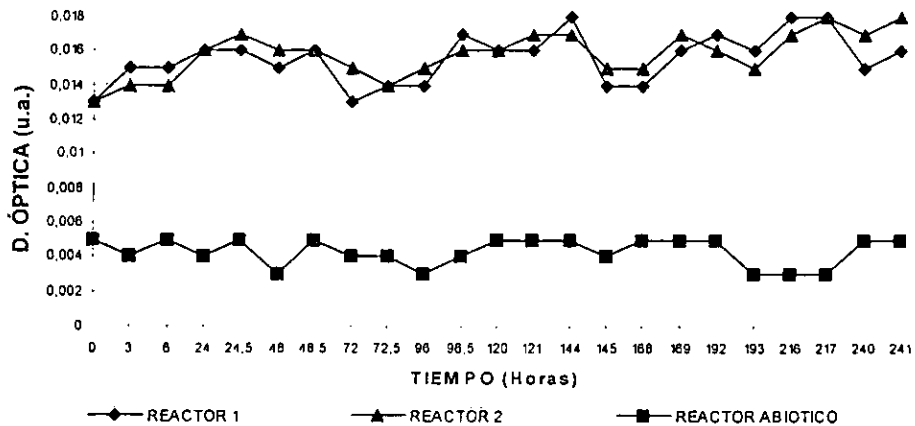
GRÁFICA 40. DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE C.G.- E.M. EN SEMICONTINUO

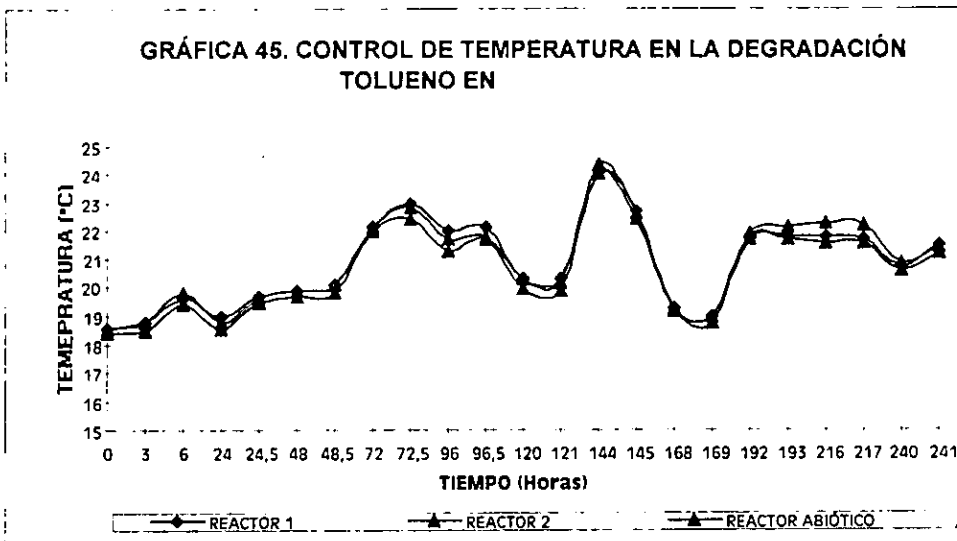
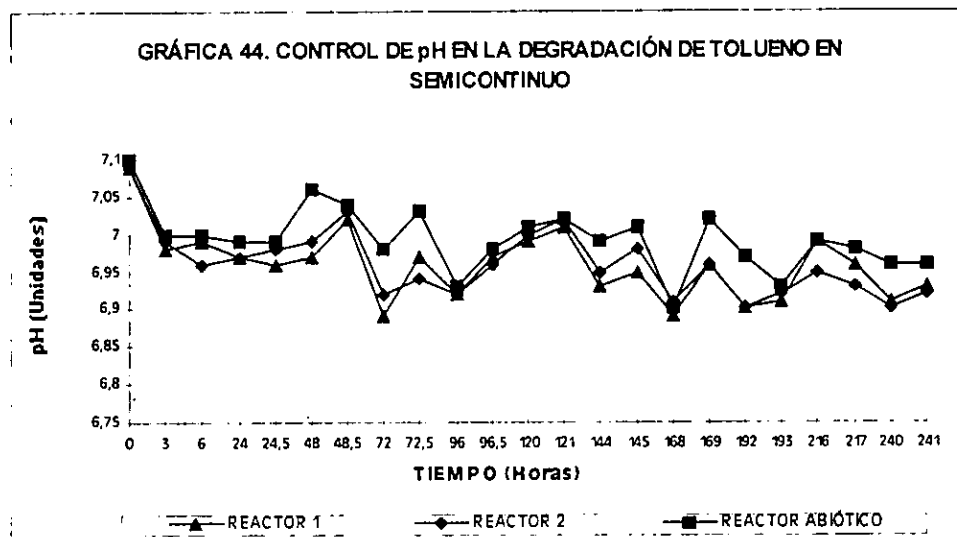
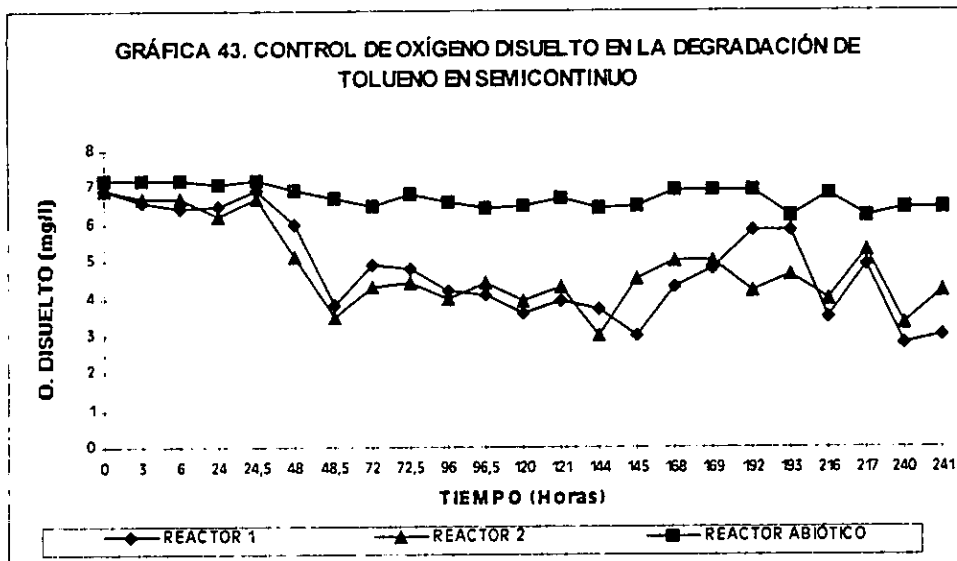


GRÁFICA 41. DEGRADACIÓN DE TOLUENO MEDIANTE DQO SOLUBLE EN SEMICONTINUO



GRÁFICA 42. CRECIMIENTO DE Ps. fluorescens EN LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO EN SEMICONTINUO







En la tabla 13 se muestra un resumen de los resultados obtenidos por biodegradación y desorción en los reactores en batch y semicontinuo del experimento.

REACTOR	CONCENTRACIÓN INICIAL DE TOLUENO (mg/l)	% DE DESORCIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN DE TOLUENO DESPUÉS DE LA DESORCIÓN (mg/l)	% DE REMOCIÓN POR BIODEGRADACIÓN
R-1 BATCH	500	96.56	17.20	97.44
R-2 BATCH	500	96.95	15.26	97.18
R-1SMCNT	500	96.89	15.54	92.14
R-2 SMCTN	500	95.30	23.46	92.14

Tabla 13. Resultados comparativos de la remoción de tolueno en batch y en semicontinuo en el experimento 4.

#### 4.5. Experimentos para la biodegradación de tolueno en reactores de 3 l en semicontinuo

El experimento se llevo a cabo por duplicado utilizando 3 reactores de 3 l identificados como reactores bióticos 1 y 2, siendo el reactor 2 la repetición del reactor 1. El reactor 3 fue el control abiótico. El sistema se alimentó adicionando de 500 mg/l de tolueno a cada reactor y tiempo de retención hidráulica de 24 horas. La aereación fue de 5 ml/minuto para evitar en lo posible la desorción en los reactores, pero que se mantuviera la concentración de oxígeno disuelto como mínimo en 2 mg/l, para mantener las condiciones aerobias en los cultivos.

En el reactor 1 en forma global la desorción después de cada alimentación fue del 94.34%, quedando la concentración de tolueno de 28.32 mg/l en el reactor; de ésta concentración de tolueno se observó remoción por biodegradación del 87.53 %, dejando un residual de tolueno en 3.53 mg/l. En el reactor 2, en general la desorción después de cada alimentación fue del 92.50%, la concentración de tolueno en el reactor fue de 37.50 mg/l, de esta concentración, la remoción por biodegradación fue del 88.19 % quedando un residual tolueno en 4.43 mg/l. Los resultados para ambos reactores se muestran en la gráficas 46.

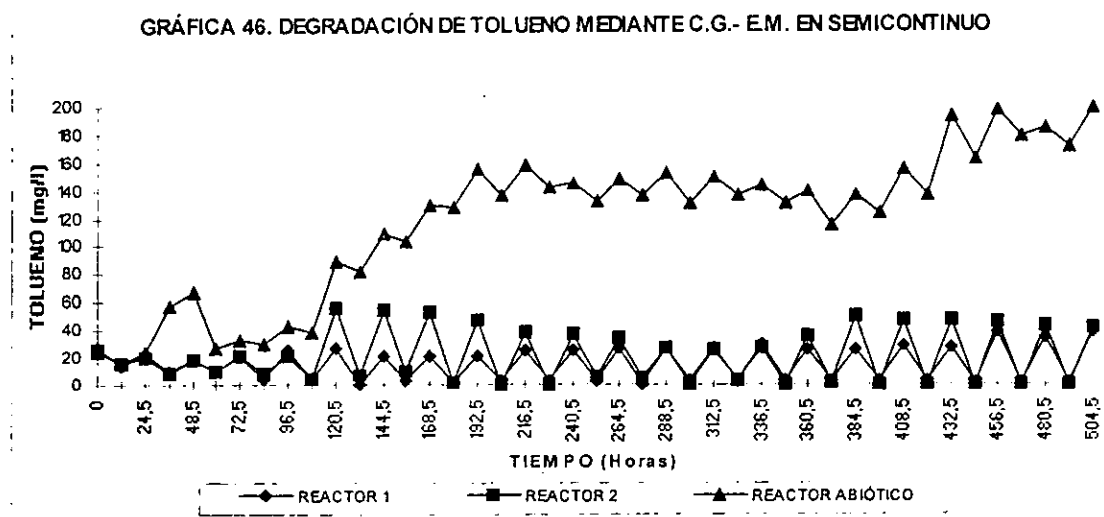
En el reactor de control abiótico se observó en promedio desorción del 75.67 %. Se presentó acumulación de la concentración residual de tolueno en el reactor, ya que en forma global, la concentración residual de tolueno en el reactor fue de 121.67 mg/l, alcanzando valores hasta de 197.73 mg/l, durante el experimento. La acumulación de tolueno en el reactor se vio reflejada por los siguientes cambios observados en el reactor: al inicio del experimento después de la primera alimentación la coloración fue amarillo pálido, a las 48 horas cambió a amarillo oro; a las 240 horas se presentó la formación de natas, espuma y coloración café, que se mantuvo hasta las 336 horas, cuando se presentó la formación de una capa grasosa con natas y olor muy penetrante, que se mantuvo hasta el final del experimento. Se hicieron pruebas de crecimiento de bacterias en placas de agar YPG para verificar la ausencia de bacterias en el reactor, que confirmaron la ausencia de bacterias.

En los reactores 1 y 2 el comportamiento fue diferente, ya que sí hubo remoción del tolueno debido a biodegradación por las bacterias presentes; la coloración del reactor durante el experimento fue de amarillo pálido a amarillo oro con formación de biomasa acumulada en el fondo del reactor a medida que avanzaba el experimento. Se hicieron determinaciones de población bacteriana mediante cuenta en placa y se verificó la pureza de la cepa para descartar cualquier contaminación en los reactores.

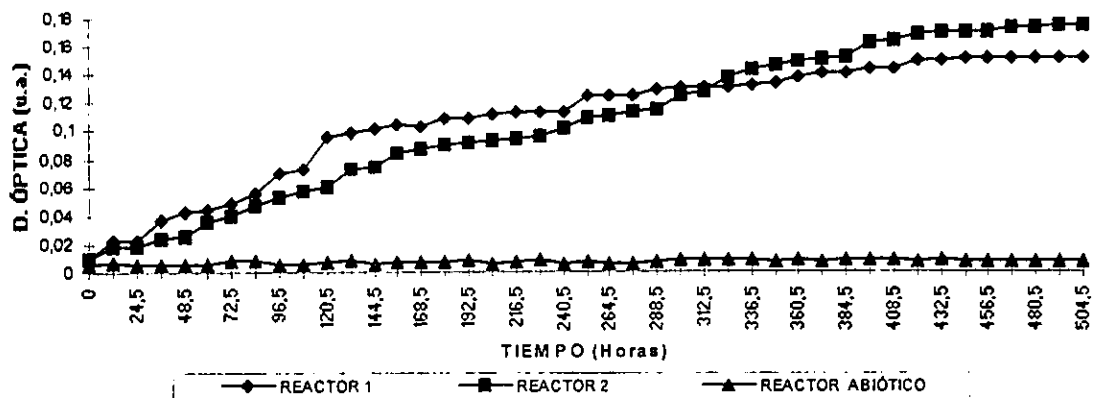
El crecimiento se midió con el parámetro de densidad óptica a 540 nm. En ambos reactores la biomasa fue aumentando paulatinamente después de cada alimentación; en el reactor 1, los incrementos fueron de 0.001 a 0.014 u.a., manteniéndose estable en 0.149 u.a. después de las 456 horas del experimento. En el reactor 2, el aumento de biomasa fue de 0.001 a 0.01 u.a., manteniéndose entre 0.160 y 0.172 u.a. después de las 408 horas del experimento. El control abiótico se mantuvo entre 0.005 y 0.008 u.a., sin presentar crecimiento o contaminación por bacterias (gráfica 47).

En los reactores 1 y 2, el oxígeno disuelto se mantuvo en promedio en 6.67 mg/l (gráfica 48); el pH fue en promedio de 6.95 unidades (gráfica 49); la temperatura promedio fue de 21.59°C (gráfica 50).

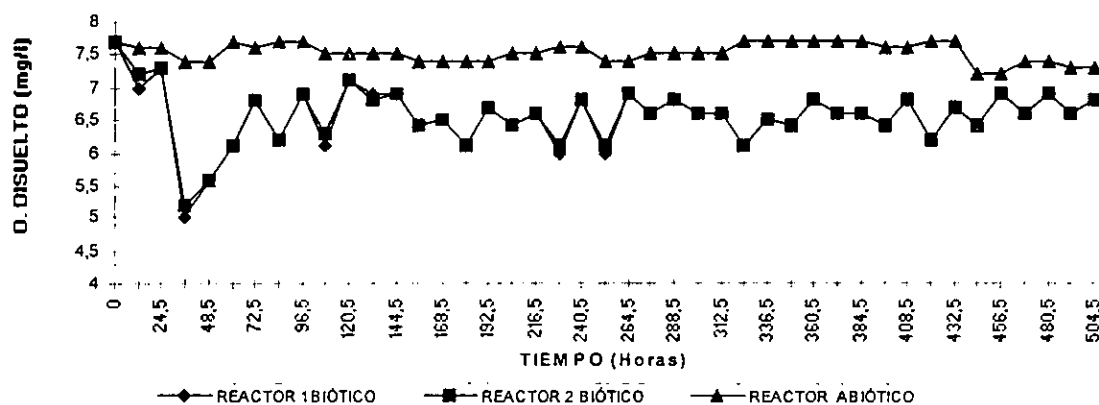
Después del análisis de los resultados obtenidos, se observa que el sistema se estabilizó a los 17 días, tanto en crecimiento como en la remoción del tolueno por *Ps. fluorescens*. En promedio la remoción por biodegradación fue del 87.86% y no se presentaron efectos tóxicos o de inhibición en los biocultivos, después de la aclimatación de la bacteria al tolueno.



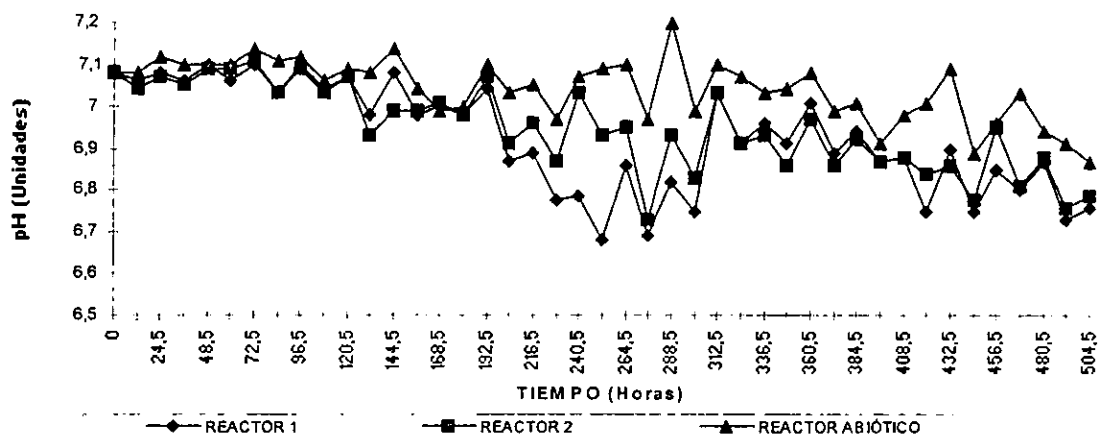
GRÁFICA 47. CRECIMIENTO DE *Ps. fluorescens* EN LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO EN SEMICONTINUO

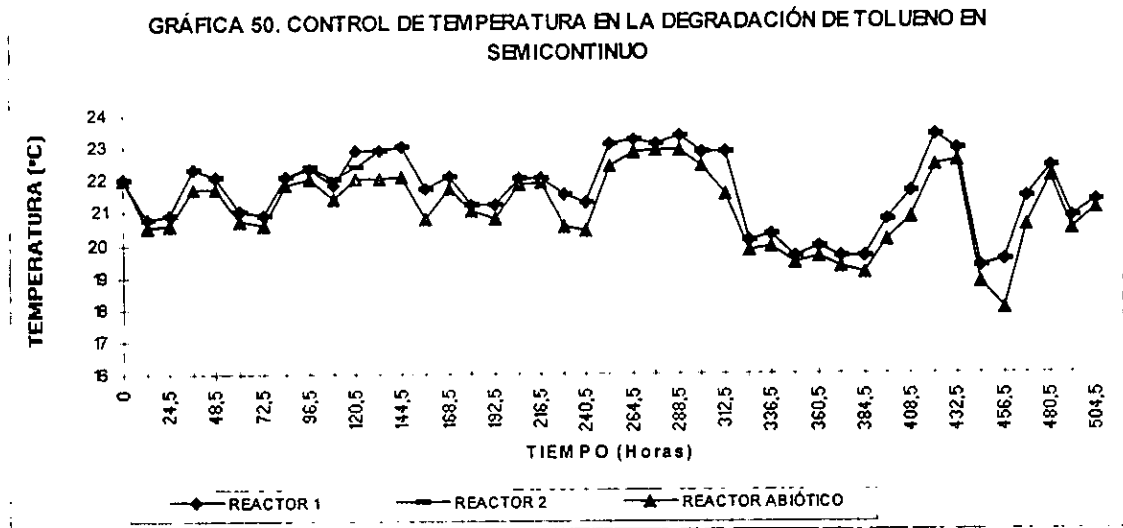


GRÁFICA 48. CONTROL DE OXÍGENO DISUELTTO EN LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO EN SEMICONTINUO



GRÁFICA 49. CONTROL DEL pH EN LA DEGRADACIÓN DE TOLUENO EN SEMICONTINUO





En la tabla 14 se muestra un resumen de los resultados obtenidos por biodegradación y desorción del experimento.

REACTOR	CONCENTRACIÓN INICIAL DE TOLUENO (mg/l)	%DE DESORCIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN DE TOLUENO DESPUÉS DE LA DESORCIÓN (mg/l)	% DE REMOCIÓN POR BIODEGRADACIÓN
R-1SMCNT	500	94.34	28.32	87.53
R-2 SMCTN	500	92.50	37.50	88.19

Tabla 14. Resultados comparativos de la remoción de tolueno en semicontinuo en el experimento 5.

## 4.6 Cinética del crecimiento bacteriano y de degradación del tolueno por *Pseudomonas fluorescens*

### 4.6.1. Consideraciones matemáticas en la cinética de degradación del tolueno

Experimentalmente se ha demostrado que la cinética de degradación del tolueno sigue el modelo de Monod para compuestos no inhibitorios (Button, 1985; Chang, 1992; Shevre, 1992), representado por la siguiente ecuación:

*Ec. Monod*

$$\mu = \mu_{\max} \left[ \frac{S}{K_s + S} \right] \quad (1)$$

Donde :

$\mu$	=	Coefficiente de velocidad del crecimiento celular, hr <sup>-1</sup>
$\mu_{\max}$	=	Coefficiente de velocidad de crecimiento celular máximo, hr <sup>-1</sup>
S	=	Concentración de substrato, mg/l
K <sub>s</sub>	=	Constante de afinidad o saturación, mg/l

En nuestro estudio los datos obtenidos en la fase de experimentación, se analizaron y se observó que el crecimiento correspondía a un comportamiento de tipo inhibitorio, sugiriendo utilizar una función de inhibición. En estudios previos Chang et al. (1992), encontraron que la degradación de tolueno por cepas de *Pseudomonas* B1 y X1 exhibía un comportamiento de inhibición y aplicaron un modelo en el que agregaron un término de inhibición competitiva a la ecuación de Monod para la determinación de las constantes cinéticas. La más aceptada expresión cinética para compuestos inhibitorios en el crecimiento de microorganismos es la ecuación de Haldane (Pawlawsky y Howell, 1973; Chi y Howell, 1976; Beltrame et al., 1980; D'Adamo et al., 1984; Rozich y Gaudy, 1985). Esta ecuación fue utilizada en nuestro experimento para la obtención de las constantes cinéticas en la degradación del tolueno.

*Ec. Haldane*

$$\mu = \mu_{\max} \left[ \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \right] \quad (2)$$

Donde :

$\mu$	=	Coefficiente de velocidad del crecimiento celular, hr <sup>-1</sup>
$\mu_{\max}$	=	Coefficiente de velocidad de crecimiento celular máximo en ausencia de inhibidores, hr <sup>-1</sup>
S	=	Concentración de substrato, mg/l
K <sub>s</sub>	=	Constante de afinidad o de saturación, mg/l
K <sub>i</sub>	=	Constante de inhibición de Haldane, mg/l

Las variaciones en la velocidad de consumo del sustrato durante el crecimiento bacteriano en batch están dados por la ecuación

$$-dS/dt = (\mu / Y_{obs}) X \quad (3)$$

Donde:

$X$  = Concentración de biomasa, mg/l.

$Y_{obs}$  = Coeficiente de rendimiento, mg de biomasa/mg de sustrato

Considerando  $Y_{obs}$  constante en cada ciclo de biodegradación, se obtiene:

$$Y_{obs} = (X - X_0) / (S_0 - S) \quad (4)$$

Entonces :

$$X = Y_{obs} (S_0 - S) + X_0 \quad (5)$$

Combinando las ecuaciones 3 y 4, se obtienen las siguientes ecuaciones que indican la velocidad de consumo del sustrato en el reactor:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dx}{dt} = Y = - \frac{dx/dt}{ds/dt} \quad (6)$$

$$-\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \left( \frac{S}{S + K_s + S^2 / K_i} \right) X \quad (7)$$

$$-\frac{ds}{dt} = q_{max} = \frac{S}{S + K_s + S^2 / K_i} \quad (8)$$

#### 4.6.2. Modelo de Haldane

Para evaluar los constantes cinéticas de  $\mu_{max}$ ,  $K_s$  y  $K_i$ , se utilizó un método de optimización no lineal que se resuelve por medio del algoritmo de Investigación Directa de Hooke y Jeeves (Johnson, 1994), el programa se hizo en lenguaje C.

El software requiere de tres cosas: una subrutina que computa  $f(X)$ , un valor inicial mínimo  $X$ , y valores para los parámetros de convergencia del algoritmo. Se encuentra un punto  $X$  donde la función no lineal  $f(X)$  tiene un mínimo local,  $X$  es un vector y  $f(X)$  es una escalar. No se requiere que la función a evaluar  $f(x)$  sea continua.

Después de que se han obtenido las constantes cinéticas por la minimización de la suma de residuos al cuadrado, se realiza la integración numérica de la ecuación de Haldane por el método numérico de Runge - Kutta de cuarto orden.

En el anexo 2 se muestra el programa utilizado.

#### 4.6.3. Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento bacteriano se estudió en la fase de crecimiento exponencial del experimento 3.

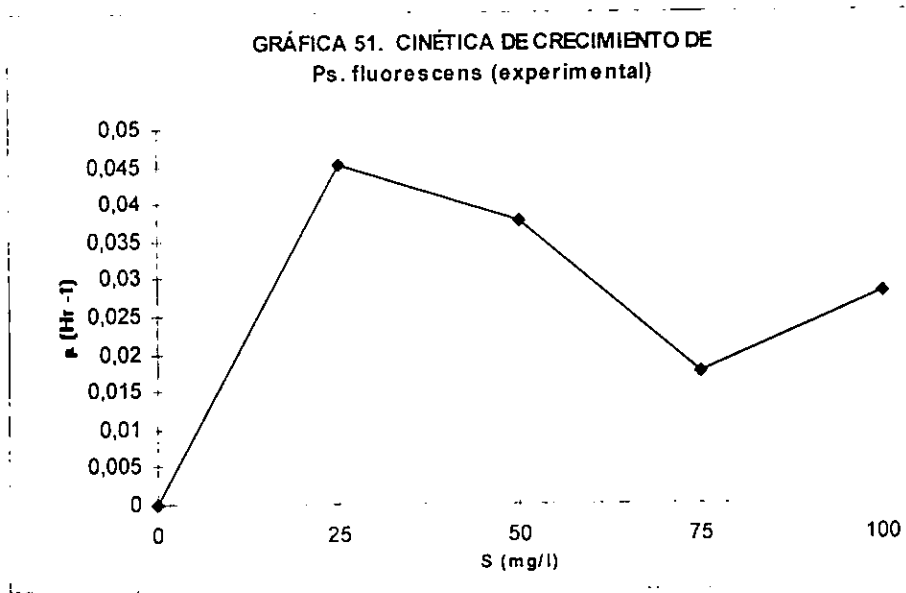
En los experimentos en batch, el crecimiento de la biomasa se determinó por medio de la densidad óptica a 540 nm, durante la fase de crecimiento exponencial de cada concentración de tolueno que se evaluó. La pendiente de la recta obtenida al graficar el logaritmo de la densidad óptica vs tiempo, es la velocidad específica de crecimiento  $\mu$ , que después es graficada vs la concentración de sustrato para encontrar  $\mu_{\max}$ .

Los resultados para los experimentos realizados se muestran en la tabla 15.

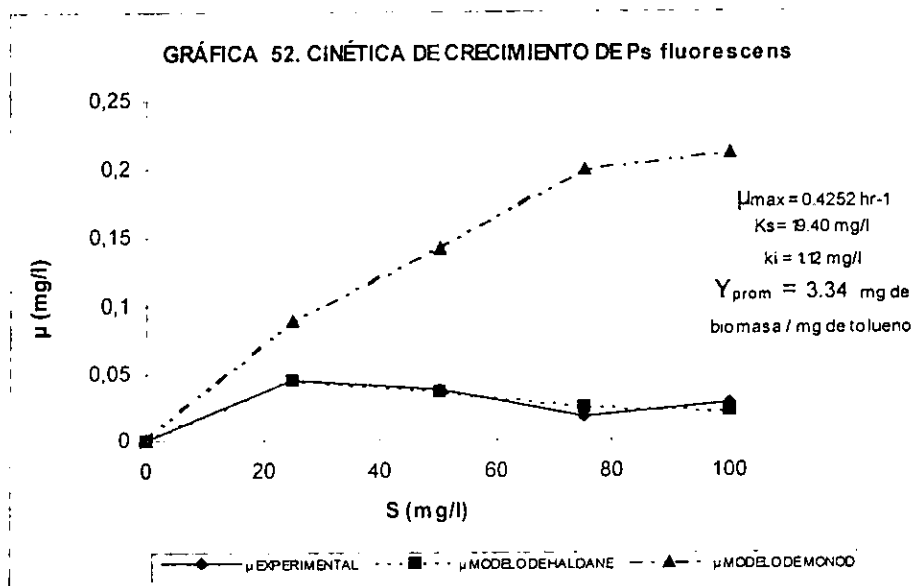
CONCENTRACIÓN INICIAL DE SUBSTRATO (mg/l DE TOLUENO)	CONCENTRACIÓN SE SUBSTRATO DESPUES DE LA DESORCIÓN (mg/l DE TOLUENO)	VALORES EXPERIMENTALES DE $\mu$ (hr <sup>-1</sup> )
25	5.21	0.0451
50	9.86	0.0376
75	17.20	0.0175
100	19.25	0.0280

Tabla 15. Valores experimentales de  $\mu$  en la cinética de crecimiento de *Ps. fluorescens*

Los resultados para el experimento de la cinética se muestran en la gráfica 51. Se observa un comportamiento inhibitorio del sustrato sobre el cultivo ya que a concentración de 50 mg/l se tiene la inhibición del sistema, disminuyendo la velocidad de crecimiento de la biomasa, como se observa con la disminución de los valores de la velocidad de crecimiento  $\mu$ , que van de 0.0452 a 0.0175 hr<sup>-1</sup>, decreciendo la velocidad de formación de biomasa observándose grandes fases lag, debido a la lenta adaptación de las bacterias al sustrato.



Los datos de la velocidades de crecimiento experimentales se aplicaron al modelo de Haldane para estimar las constantes cinéticas del cultivo. Las curvas de la cinética de crecimiento experimental y las obtenidas mediante el modelo de Haldane se muestran en la gráfica 52. También se presenta la curva correspondiente al modelo de Monod, que representa un sistema sin inhibición y nos muestra como se comportaría el crecimiento de la bacteria de manera no inhibitoria.





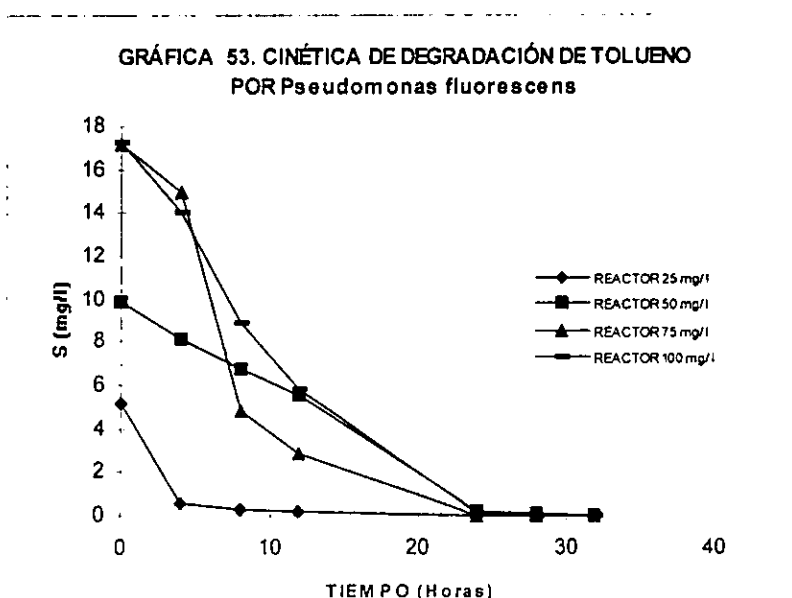
#### 4.6.4. Cinética de degradación del tolueno

La cinética del consumo de sustrato, se estudió en el experimento 3. Las determinaciones de las concentraciones residuales de tolueno se realizaron por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas.

Las concentraciones que se evaluaron fueron de 25, 50, 75 y 100 mg/l de tolueno. La desorción promedio que se determinó al inicio del experimento para los 4 reactores fue de 79 %.

El tiempo en que fueron removidas por biodegradación las concentraciones residuales de tolueno en los reactores, fueron para el reactor de 25 mg/l, 12 horas; en el reactor de 50 mg/l, 25 horas y en los reactores de 100 y 200 mg/l, 32 horas.

Los resultados se muestran en la gráfica 53.



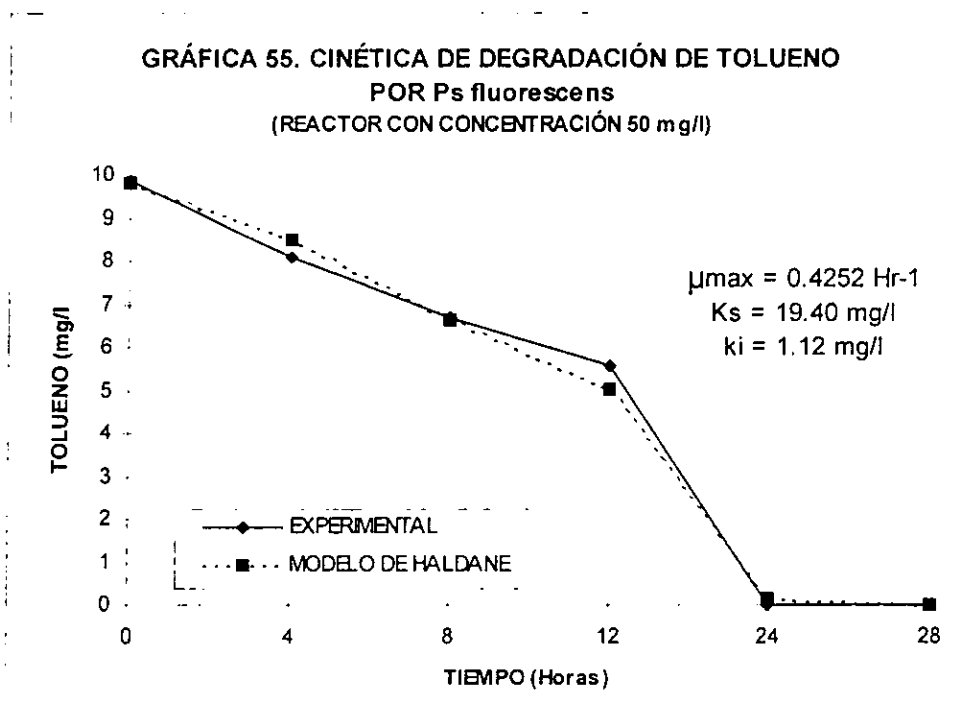
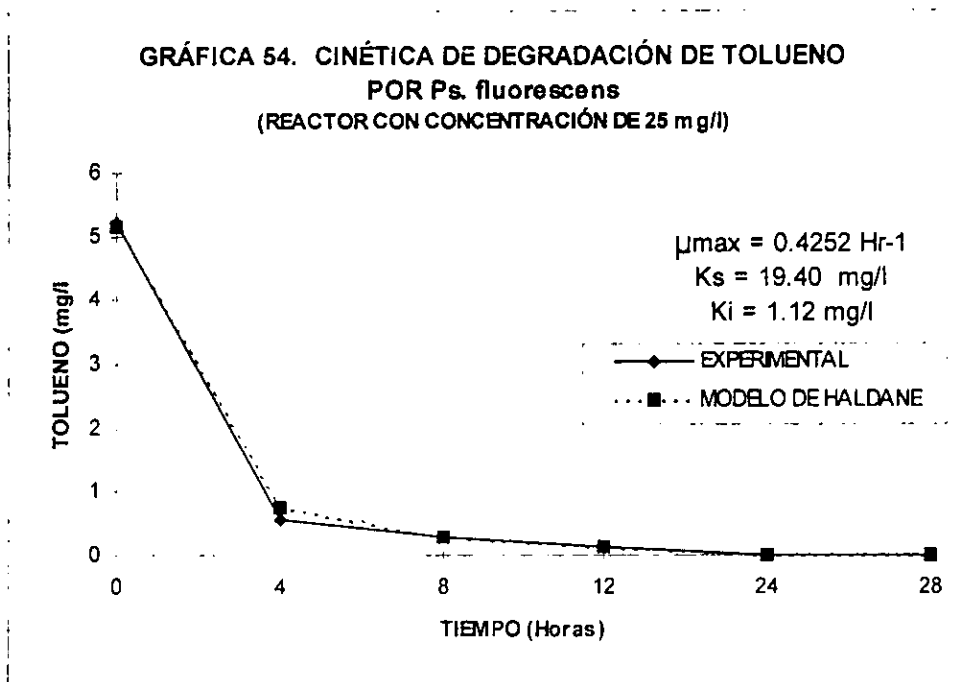
El modelo de Haldane se aplicó en cada concentración de tolueno estudiada.

Los coeficientes cinéticos de la degradación de tolueno por *Pseudomonas fluorescens*, determinados en este estudio se muestran en la tabla 16.

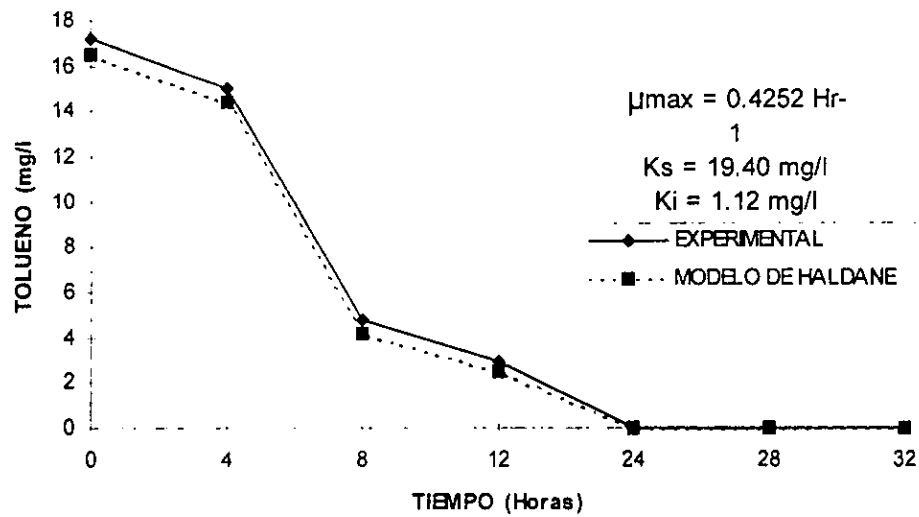
$\mu_{max}$ ( $hr^{-1}$ )	$K_s$ (mg/l)	$K_i$ (mg/l)	$Y$ (mg biomasa / mg tolueno)
0.4252	19.40	1.12	3.34

Tabla 16. Coeficientes cinéticos para la degradación de tolueno en este estudio

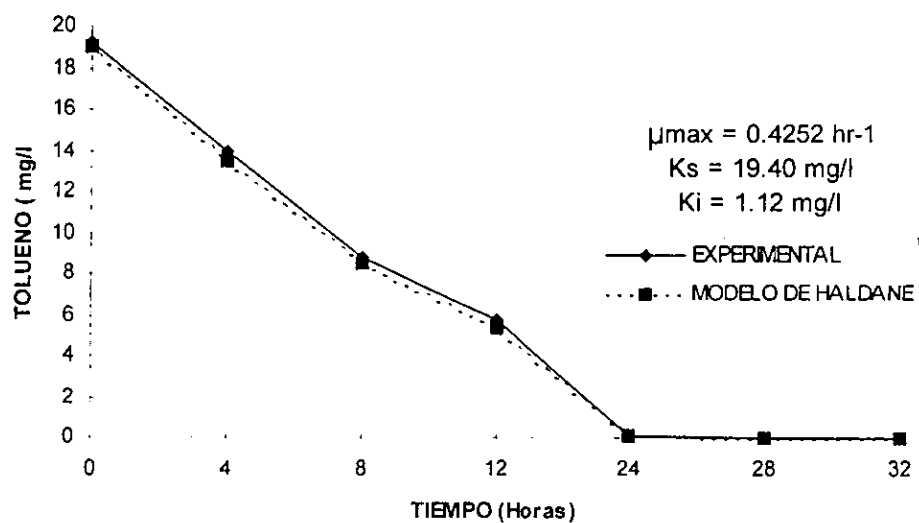
Las gráficas 54, 55, 56 y 57 muestran las curvas experimentales y las curvas ajustadas por el modelo; los resultados obtenidos por el modelo muestran una buena correlación con los datos experimentales, cuyos resultados se encuentran en el anexo II.



GRÁFICA 56. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE TOLUENO  
POR *Ps. fluorescens*  
(REACTOR CON CONCENTRACIÓN DE 75 mg/l)



GRÁFICA 57. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE TOLUENO  
POR *Ps. fluorescens*  
(REACTOR CON CONCENTRACIÓN DE 100 mg/l)



Los resultados de las cinéticas de crecimiento y de consumo de sustrato, muestran que el valor de  $K_i = 1.21$  mg/l y el de  $K_s = 19.40$  mg/l. El valor del coeficiente de inhibición ( $K_i$ ) es bajo indicando inhibición grande, a pesar de que los cultivos puros muestran la característica de tener mayor afinidad por el sustrato, lo que haría suponer que el valor de la constante de saturación ( $K_s$ ) fuera mayor que el determinado en este estudio que fue de 19.40 mg/l, lo que confirma las características inhibitorias del sustrato sobre el crecimiento de la bacteria, por lo que sugerimos que los cultivos puros capaces de utilizar tolueno como única fuente de carbono y energía, pueden ser caracterizados como un sistema con alta inhibición, baja afinidad por el sustrato y lento crecimiento. Los pequeños valores de  $K_i$  indican una inhibición grande debido a que  $K_i$  es el denominador de la ecuación de Haldane

En estudios previos realizados por Robertson y Button (1987), utilizaron una cepa de *Pseudomonas sp* utilizando tolueno como fuente de carbono y energía, determinando la velocidad máxima de crecimiento de  $0.06$  hr<sup>-1</sup>.

Chang et al. (1992), utilizaron las cepas de *Pseudomonas B1* y *X1* para degradar tolueno, los valores que obtuvieron para  $K_s$  y de  $K_i$  estuvieron muy relacionados, sugiriendo que el coeficiente de inhibición puede ser aproximadamente el mismo que el coeficiente de saturación  $K_s$ . En su estudio para *Pseudomonas B1*,  $K_s=1.96$  mg/l y  $K_i=1.71$  mg/l, mientras que para *Pseudomonas X1* fueron  $K_s = 1.88$  y  $K_i = 1.71$ .

Shreve (1993), estudió la cinética de consumo de tolueno por *Pseudomonas k3-2*, sin considerar el sistema inhibitorio, obteniendo los coeficientes cinéticos de  $\mu_{max} = 0.284$  hr<sup>-1</sup> y  $Y = 1.44$  células/mmol tolueno.

Duetz et al, (1994), realizó estudios con cepas de *Ps. cepacia G4*, *Ps. mendocina KR1*, *Ps putida F1* y *Ps. putida mt-2*, que degradan tolueno a través de diferentes vías metabólicas. Los coeficientes cinéticos de  $\mu_{max}$  estuvieron entre  $0.19$  y  $0.45$  hr<sup>-1</sup> y  $Y$  entre  $0.16$  y  $0.44$  g de biomasa/g de tolueno.

En nuestro estudio los valores de los coeficientes cinéticos fueron:  $\mu_{max} = 0.4252$ ,  $K_s = 19.40$  mg/l,  $K_i = 1.12$  mg/l y el rendimiento  $Y_{promedio} = 3.34$  mg de biomasa/mg de tolueno, lo que nos indica mayor afinidad de *Ps fluorescens* por el tolueno. respecto a otras cepas de *Pseudomonas*, sugerido por la mayor  $K_s$  reportada y consecuentemente mejor rendimiento de biomasa por mg de tolueno.

La cepa de *Pseudomonas fluorescens*, muestra una velocidad de crecimiento mas alta (tiempo de generación  $t_d = 1.52$  hr) que otras especies de *Pseudomonas* (excepto *Pseudomonas B1*, *X1* y *mendocina KR1*), como se observa en la tabla 14.

El coeficiente de inhibición  $K_i$ , se encuentra dentro de los rangos reportados para sistemas inhibitorios y el consumo de sustrato en la degradación del tolueno sigue un modelo de primer orden.

Los coeficientes cinéticos para el tolueno reportados por otros autores se resumen en la tabla 17.

AUTOR	$\mu_{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	Ks (mg/l)	Ki (mg/l)	Microorganismo	Y (mg biomasa / mg tolueno)
Robertson et al, (1985)	0.06	-	-	<i>Pseudomonas sp</i>	-
Chang et al, (1992)	13.03 ± 1.83	1.96 ± 0.1	1.71	<i>Pseudomonas B1</i>	1.96 ± 0.91
	10.84 ± 2.77	1.88 ± 1.26	1.71	<i>Pseudomonas X1</i>	0.99 ± .25
Shreve, (1992)	0.284	0.181	-	<i>Pseudomonas</i>	1.44
Duetz et al, (1994)	0.19	-	-	<i>Ps. cepacia G4</i>	0.16
	0.45	-	-	<i>Ps. mendocina KR1</i>	0.35
	0.38	-	-	<i>Ps. putida F1</i>	0.44
	0.40	-	-	<i>Ps. putida mt-2</i>	0.33
Este estudio	0.4252	19.40	1.12	<i>Ps. fluorescens</i>	3.34

Tabla 17. Coeficientes cinéticos reportados para el tolueno

#### 4.6.5. Vía de degradación del tolueno por *Pseudomonas fluorescens*

Para la degradación del tolueno se han estudiado diferentes especies de *Pseudomonas* para evidenciar las vías de degradación de alquilbencenos, sugiriendo que las rutas empleadas son 2:

- Vía TOL, en la cual el grupo metilo es oxidado por una oxigenasa al alcohol correspondiente
- Vía TOD, en la que el núcleo aromático es atacado directamente por una oxigenasa

De acuerdo a Duetz (1994), varias cepas de *Pseudomonas* (*putida*, *cepacia*, *mendocina* y *fluorescens*) tienen idénticos genes para la forma TOL encontrados en el plásmido TOL PWW0. La comparación de las diferentes vías de degradación de tolueno en términos termodinámicos, es energéticamente favorable a la conversión del tolueno a los isómeros del cresol, más que a la forma de alcohol bencílico.

Los espectros de masas de los experimentos realizados se representan por el cromatograma de la figura 9 mostrando sólo uno, debido a que siguió el mismo espectro para todas las muestras analizadas que indican que la fragmentación inicial de la molécula de tolueno ocurre en el anillo aromático, seguido de una transposición del hidrógeno correspondiente, dando los productos de fragmentación intermedia que se muestran en la figura 8.

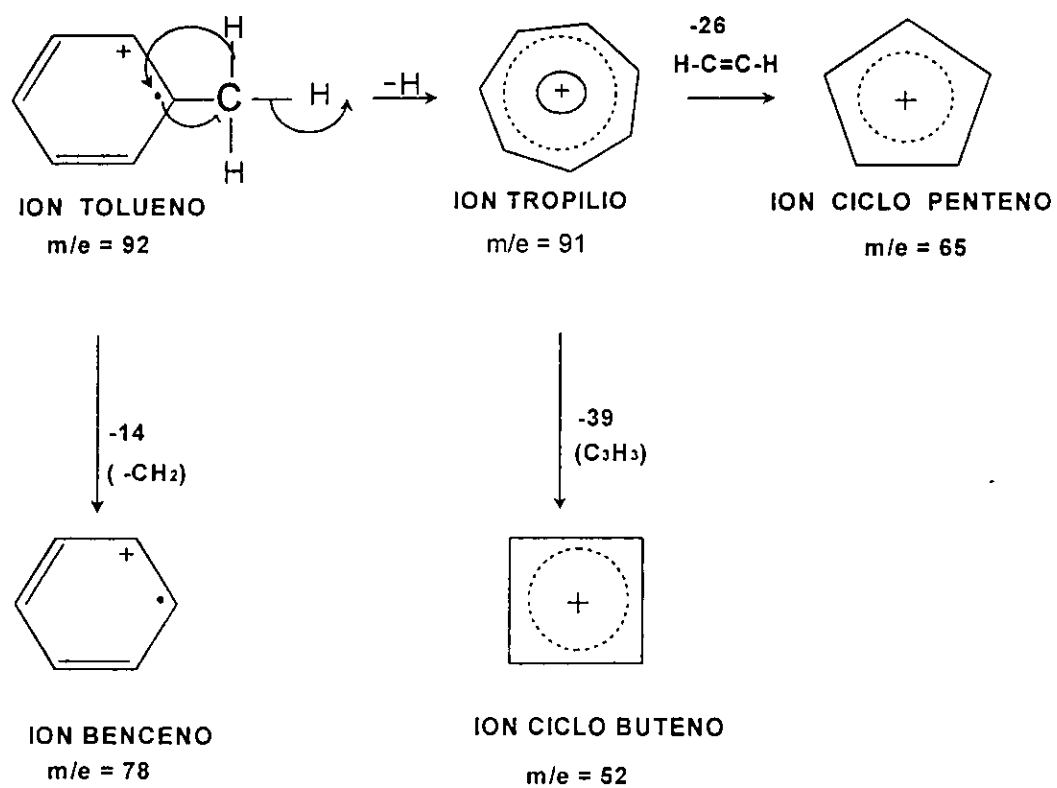


Figura 8. Diagrama de Fragmentación del tolueno

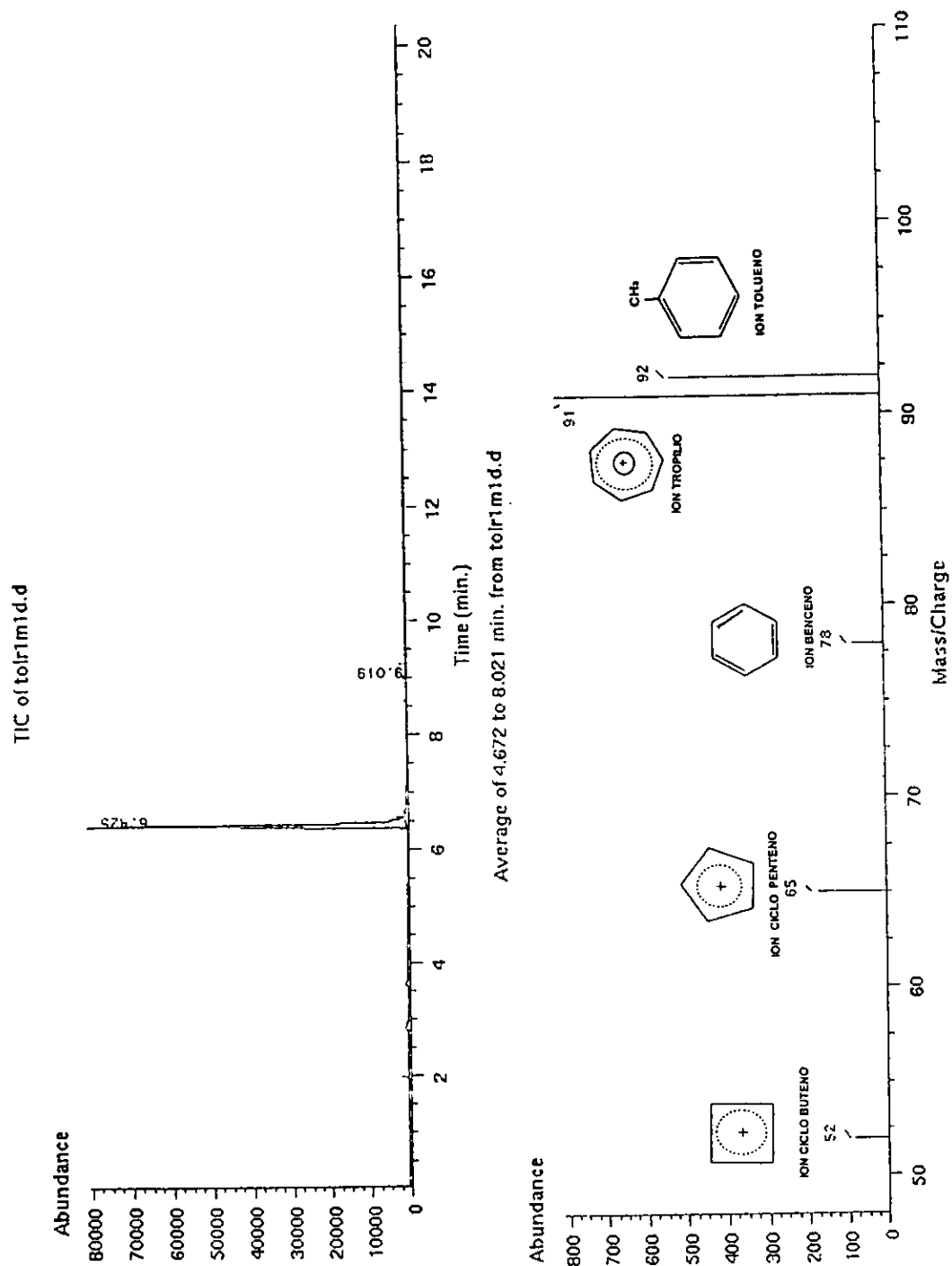


Figura 9. Cromatograma y espectro de masas para la degradación del tolueno por *Pseudomonas fluorescens*

Apoyados en estas referencias y de acuerdo a la fragmentación que sufrió la molécula de tolueno por la transposición del H del anillo bencílico, consideremos que la vía de degradación para el tolueno por *Pseudomonas fluorescens*, sigue la ruta TOD, sugiriendo que los posibles productos secundarios y sus mecanismos sean los mostrados en la figura 10. El o-Cresol y el 3 metilcatecol no son contaminantes prioritarios de acuerdo a la EPA y no existen datos disponibles de su toxicidad en sistemas acuosos (RREL U.S. EPA, 1994).

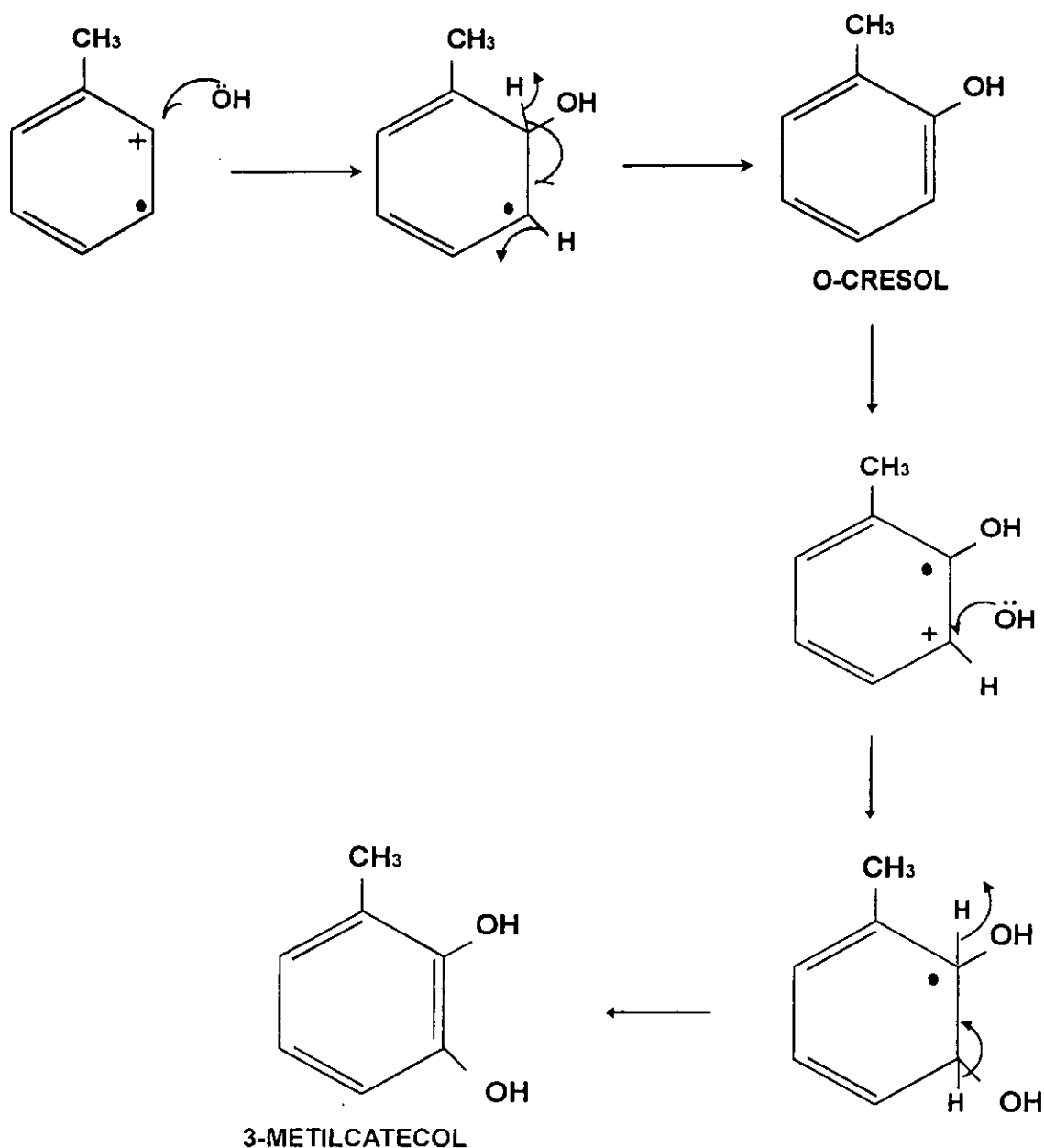
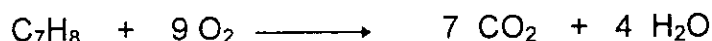


Fig. 10 Probables productos secundarios derivados de la oxidación del tolueno por *Pseudomonas fluorescens*



#### 4.6.6. Balance de la reacción de oxidación del tolueno

La oxidación aerobia del tolueno sigue la reacción:



Si la mineralización es completa, el tolueno se oxida completamente a  $\text{CO}_2$ . Para medir que porcentaje de la reacción se mineralizó es necesario cuantificar la cantidad de  $\text{CO}_2$  producida en los reactores y así cuantificar que cantidad de tolueno se mineralizó.

En nuestro experimento el  $\text{CO}_2$  se fijó en soluciones de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  y posteriormente se tituló con solución de ácido oxálico, de acuerdo a la reacción::



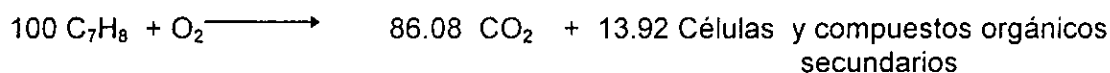
Los resultados de la producción de  $\text{CO}_2$  se muestran en la tabla 15.

Concentración de inicial de tolueno (mg/l)	Concentración real de tolueno después de la desorción (mg/l)	$\text{CO}_2$ Teórico (g)	$\text{CO}_2$ Experimental (g)	Tolueno mineralizado (%)
25	5.21	0.79	0.68	86.08
50	9.86	1.57	0.45	28.66
75	17.20	3.14	0.73	23.25
100	19.25	6.29	1.26	20.03

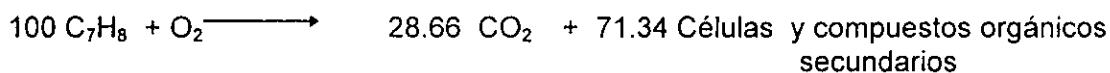
Tabla 15. Producción de  $\text{CO}_2$  en la degradación de tolueno por *Pseudomonas fluorescens*

La mineralización del tolueno fue mayor a la menor concentración y disminuye a medida que aumenta la concentración. Considerando una base del 100 %, las reacciones y los porcentajes de productos formados en cada concentración son los siguientes:

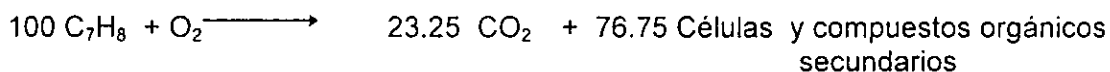
a) Concentración de 25 mg/l



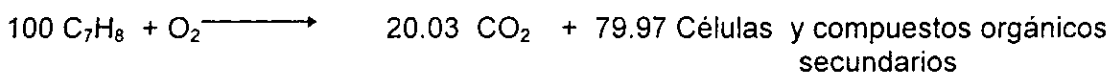
b) Concentración de 50 mg/l



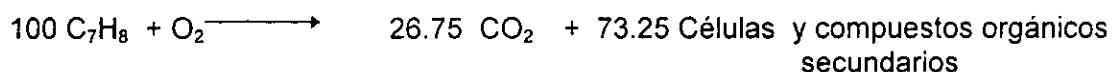
c) Concentración de 100 mg/l



d) Concentración de 200 mg/l



En los experimentos en semicontinuo la concentración de alimentación fue de 500 mg/l, en promedio se efectuó la siguiente reacción:



Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos del crecimiento, ya que en la concentración mas baja no se presentó inhibición a la dosis de 25 mg/l. En las concentraciones de 50, 75 y 100 mg/l, se presentó la inhibición de los cultivos disminuyendo la velocidad de crecimiento de la bacteria debido a que éstas concentraciones de tolueno en los biocultivo fueron inhibitorias del crecimiento de la bacteria y también a la formación de productos orgánicos secundarios.

No fue posible identificar los productos orgánicos secundarios, ya que se requiere de experimentos con marcaje de átomos, complementado con métodos de espectroscopia de Infrarrojo, Ultravioleta y resonancia magnética nuclear (Seibl, 1993).

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En relación a los objetivos planteados al inicio del estudio, se determinó la capacidad de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* para degradar tolueno utilizándolo como única fuente de carbono y energía y se determinó la cinética de crecimiento bacteriano y de consumo de sustrato. Las conclusiones a que se llegó son las siguientes:

1. En los experimentos en matraces para determinar el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en presencia de concentraciones de tolueno de 20 y 40 mg/l se presentaron curvas típicas de crecimiento, con máximo crecimiento entre 1 y 3 días.

Para concentraciones de 90 mg/l, se presenta una fase lag seguida de una etapa de crecimiento máximo que indica una buena aclimatación o adaptación de la bacteria a esta concentración de tolueno. Con dosis de 180 mg/l, se presenta una fase de decaimiento, seguida de una fase lag y crecimiento inestable, lo que sugiere inhibición del crecimiento a este rango de concentración.

2. En los experimentos en reactores de 10 l en batch, con concentraciones de tolueno de 25, 50, 100 y 200 mg/l. En las dos primeras concentraciones el crecimiento de los microorganismos siguió un comportamiento característico y en las concentraciones de 100 y 200 mg/l de tolueno se observó decaimiento e inhibición de la biomasa al inicio del experimento, seguido de una recuperación rápida de los cultivos y posteriormente una etapa lenta de decaimiento. Se observó una buena aclimatación de la bacteria al sustrato en las concentraciones evaluadas.

3. En los experimentos para la biodegradación de tolueno en reactores de 10 l en batch, el tolueno fue la única fuente de carbono y energía de los cultivos. Las concentraciones de tolueno evaluadas fueron 25, 50, 75 y 100 mg/l.

En promedio la desorción en los reactores fue del 79 % dejando un residual de la concentración de tolueno del 21 %, el cual fue removido al 100 % por biodegradación, en promedio en 28 horas.

La duración de la fase lag es proporcional a la concentración de sustrato, a mayor concentración de tolueno se observaron fases lag de mayor duración, lo que indicó mayor tiempo para la aclimatación de la bacteria al sustrato.

4. En los experimentos para la biodegradación de tolueno en reactores de 3l, en la fase de alimentación en batch, se evaluó la concentración de 500 mg/l. La desorción inicial en promedio fue del 96.75 %. La concentración residual de tolueno en los cultivos fue en promedio de 16.23 mg/l, la cual fue removida por biodegradación en un 98.98 %.

Las fases lag fueron de 3 horas, indicando una rápida adaptación de la bacteria a esta concentración de tolueno.

5. En la fase de alimentación de los reactores en semicontinuo, la alimentación de tolueno fue de 500 mg/l cada 24 horas. En términos generales, después de cada alimentación la desorción del tolueno fue del 93.42 %, con concentraciones residuales de tolueno en promedio de 32.90 mg/l, la cual fue removida por biodegradación en un 87.86 %. En los

reactores abióticos se observó acumulación del tolueno llegando a concentraciones de 200 mg/l.

Los reactores se mantuvieron estables en estos rangos de remoción del tolueno y el crecimiento de biomasa se estabilizó en promedio en 0.160 u.a. equivalentes a 576.68 mg/l, indicándonos una buena adaptación de la bacteria al sustrato, en este rango de concentración.

Los valores de pH, oxígeno disuelto y temperatura en los reactores, se mantuvieron en promedio en 6.95 unidades, 6.67 mg/l y 21.59 °C respectivamente, los cuales son valores adecuados para el buen funcionamiento de la dinámica de la población bacteriana en cultivos aerobios en suspensión.

La técnica de la DQO<sub>soluble</sub> no es recomendable para cuantificar la remoción de compuestos orgánicos recalcitrantes medidos como materia orgánica susceptible de ser degradada por medios químicos, ya que el agente oxidante que se utiliza en la determinación oxida parcialmente los compuestos aromáticos.

6. En relación a la cinética de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*, se determinó una cinética de primer orden, donde el sustrato es el reactivo limitante de la reacción.

7. La cinética siguió el modelo de Haldane ya que se presentó inhibición del crecimiento a medida que aumentó la concentración del sustrato.

8. La cinética de consumo de tolueno resultó ser de primer orden

9. Los coeficientes cinéticos determinados por el modelo de Haldane fueron :

- $\mu_{max} = 0.4252 \text{ hr}^{-1}$
- $K_s = 19.40 \text{ mg/l}$
- $K_i = 1.12 \text{ mg/l}$
- $Y = 3.34 \text{ mg de biomasa/mg de tolueno}$

El tiempo de generación o duplicación para la población bacteriana en promedio fue de 1.52 horas.

10. Los resultados de las cinéticas de crecimiento y de consumo de sustrato, mostraron inhibición grande, a pesar de que los cultivos puros se caracterizan por mostrar mayor afinidad por el sustrato.

Los cultivos puros de *Pseudomonas fluorescens* así como otras especies del género *Pseudomonas*, capaces de utilizar tolueno como única fuente de carbono y energía, pueden ser caracterizados como sistemas con alta inhibición, baja afinidad por el sustrato y lento crecimiento.

11. La cepa de *Pseudomonas fluorescens*, presentó mayor  $\mu_{max} = 0.4252 \text{ hr}^{-1}$  que otras cepas de *Pseudomonas* que degradan tolueno, indicándonos mayor afinidad y mejor adaptación al sustrato, que se caracteriza por ser inhibidor del crecimiento.

12. Los coeficientes cinéticos fueron estimados usando el método de estimación paramétrica no lineal del algoritmo de Investigación Directa de Hooke & Jeeves y la integración numérica de la ecuación de Haldane, se hizo por el método numérico de Runge-Kutta de cuarto orden.

13. La vía de degradación que se sugiere es la Tod, ya que se efectúa un ataque al anillo aromático del tolueno.

14. En relación al balance de la reacción, la mineralización del tolueno fue del 86.08 % para la menor concentración de tolueno, disminuyendo ésta a concentraciones mayores, a 28.66, 23.25 y 20.03 % para las concentraciones de 50, 75 y 100 mg/l respectivamente. El resto en cada reacción se transforma a biomasa y productos orgánicos secundarios que no fueron posibles de identificar y cuantificar.

En el experimento en semicontinuo, en términos generales, la mineralización del tolueno fue del 26.75 % y el 73.25 % se convirtió a biomasa y productos orgánicos secundarios.

#### RECOMENDACIONES:

- Se sugiere continuar con esta línea de trabajo ya que es importante determinar la capacidad de cepas puras de microorganismos para la degradación de compuestos orgánicos, debido a que han demostrado ser potencialmente eficientes en la remoción de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos.
- Investigar la capacidad de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* con otros compuestos orgánicos contaminantes prioritarios, de forma individual y en combinaciones, así como en condiciones de cultivos en suspensión e inmovilizados.
- Enriquecer los tratamientos de lodos activados que muestran inhibición y toxicidad de microorganismos por tolueno y que en la caracterización de su población bacteriana no presenten bacterias del género *Pseudomonas fluorescens*.
- Implementar la metodología para la identificación y cuantificación de productos intermediarios y secundarios.
- Realizar los experimentos en biorreactores equipados al menos con monitores en línea de los parámetros de control del experimento como son pH, temperatura, oxígeno disuelto y CO<sub>2</sub>.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson S. (1970). **Experimental Microbial Ecology**. Academic Press, New York. 236 pp.
- Ainsworth S. (1977). **Steady-State Enzyme Kinetics**. University Park Press. pp. 29 - 73
- APHA. AWWA.WPC.F. (1992). **Standard Methods For Examination Of Water And Wastewater**. Ed.18 Washington, D.C.
- Arvin E., Jencen B.K. y Gunderstone A.T. (1989). Substrate Interactions During The Aerobic Degradation Of Bencene. **Applied And Environmental Microbiology**. (55) 3221 - 3225
- Bae B., Autenrieth R.L y Bonner J.S. (1995). Kinetics Of Multiple Phenolic Compounds Degradation With A Mixed Culture In A Contnuous-Flow Reactor. **Water Environment Research**. (67) (2) : 215- 223.
- Balba M. T. y Evans W.C. (1980). The Anaerobic Disimilation of Desulfovibrio vulgaris Wt Sulfate AS A Terminal Electron Acceptor. **Biochemical Society Trans**. (8) 624 - 625
- Baltzis B. C., Lewandowski G.A., Chang S., Ko Y. Fill -and-draw Reactor Dynamics in Biological Treatment o Hazardous Wastes. **Biotechnology Application in Hazardous Waste Treatment**. pp. 111 - 128
- Bauer J.E. Y Capone D.G. (1988). Effects Of Co-occurring Aromatic Hydrocarbons On The Degradation Of Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Marine Sediment Slurries. **Applied And Environmental Microbiology**. (54) 1649 - 1655
- Beller H.R., Reinhard M. Y Grbic-Galic D. (1992). Metabolic By-Products Of Anaerobic Toluene Degradation By Sulfate-Reducing Enrichment Cultures. **Applied And Environmental Microbiology**. (58) (9) 3192 - 3195
- Beltrame P., Beltame P.L., Carniti P.Y. Pitea D. (1980). Kinectics Of Phenol Degradation By Activated Sludge In A Continuous-Stirred Reactor. **Journal WPCF**. (52) (1) : 127 - 133.
- Beltrán N.A. (1994) **Biodegradación aerobia de tóxicos por medio de microorganismos inmovilizados**. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Bhatnagar L.Y Fathepure B. **Mixed Cultures in Detoxification of Hazardous Waste**. Chapter 11. p. 293 - 328
- Braha A., Hafner F. (1987). Use Of Lab Batch Reactors To Model Biokinetics. **Water Research**. (21) (1): 73 -81.

- Brock T.D. Y Madigan M.T. "Microbiología" Ed. Prentice Hall. 1991. México.  
pp. 14-20 : 814-815
- Buitron G. Y Capdeville B. (1993). Uptake Rate And Mineralization Of Hexadecane And Naphthalene By A Mixed Aerobic Culture. **Water Research. (27) (5)** 847 - 853
- BumHan B., Robin I., Autenrieth. Y Bonner J.S. (1995). Kinetics Of Multiple Phenolic Compounds Degradation With A Mixed Culture In A Continuous-Flow Reactor. **Water Environment Research. 1995. 215 . 223**
- Button D.K. (1985). Kinetics Of Nutrient-Limited Transport And Microbial Growth. **Microbiological Reviews. (49) (3):** 270 - 297.
- Carberry J. Y Benzing M. (1991). Peroxide Pre-oxidation Of Recalcitrant Toxic Waste To Enhance Biodegradation. **Water Science Technology. (23)** 367- 376
- Cardinal L.J. Y Stenstrom M.K. (1991). Enhanced biodegradation of polyaromatic hydrocarbons in the activated sludge process. **Research Journal WPCF. (63) (7):** 950 - 957.
- CEPIS. (1988). **Manual De Evaluación De Manejo De Sustancias Tóxicas En Aguas Superficiales.** Sección 1. 1.6 - 1.13
- Chang M-K., Voice T.C. Y Criddle C.S. (1993). Kinetics of Competitive Inhibition and Cometabolism in the Biodegradation of Benzene, Toluene, and p-Xylene by Two *Pseudomonas Isolates*. **Biotechnology and Bioengineering. (41) :** 1057 -1065.
- Chapra S.C.Y Canale R.P. **Métodos Numéricos para Ingenieros.** p.p 550 - 564
- Cheremisinoff P.N. (1994). **Biomangement Of Wastewater And Wastes.** PTR Prentice Hall, New Jersey.
- Chow S., Del Río R. Y Castillo R. (1992). Biorremediación. Tecnología para degradar contaminantes. **Revista IMIQ. 33 Vol. 2º** 37-50
- Collins C.H., Lyne P.M. Y Grange J.M. **Microbiological Methods.** 6th.ed.. Butterworth Heinemann. pp. 240- 245
- Corsi R.L. Y Birkett S. (1995). A Multi-Parameter Analysis Of Volatile Organic Compound Emissions From Sewers. **Water Environment Research. (67) (5):**807 - 815
- D'Adamo P.D., Rozich A.F. Y Gaudy Jr. A.F. Analysis of Growth Data with Inhibitory Carbon Sources. **Biotechnology and Bioengineering. (26) :** 397 - 402
- Daubaras D. Y Chakrabarty A.M. (1992). The Environment, Microbes And Bioremediation:Microbial Activities Modulated By The Environment. **Biodegradation.(3)** 125-135

- De Flaun M., Marshall B.M. Y Kulle E., Levy S.B. (1994). Tn5 Insertion Mutants of *Pseudomonas fluorescens* Defective in Adhesion to Soil and Seeds. **Applied And Environmental Microbiology.** (60) (7) 2637 - 2642
- Der Yi Mu Y Scow K.M. (1994). Effect Of Trichloroethylene (TCE) And Toluene Concentrations On TCE And Toluene Biodegradation And The Population Density Of TCE And Toluene Degraders In Soil. **Applied And Environmental Microbiology.** (60) (7) 2661 - 2665
- Deshpande S.D.Y Chakrabarty. (1988). Biodegradation Of Xenobioticss From Binary Substrate System Using Acclimated Activated Sludge. **Indian Journal Environmental.** (30) 215 - 221
- DSTI/STP/ BE. Directorate for Science, Technology and Industry. (1993). **Biotechnology for a clean environment: Prevention, Detection and Remediation, Report drafted by the "Ad Hoc Group of Government Experts on Biotechnology for a Clean Environment"**, Paris, p. 32 , 141.
- Duetz W.A., Winson M.K., Van Andel J.G. Y Williams P.A. (1991). Mathematical Analysis Of Catabolic Function Loss In A Population Of *Pseudomonas Putida* Mt-2 During Non-Limited Growth On Benzoate. **Journal Of General Microbiology.** (137) : 1363 - 1368
- Duetz W.A. Y Van Andel J.G., (1991). Stability Of TOL Plasmid Pwwo In *Pseudomonas Putida* Mt-2 Under Non-Selective Conditions In Continuous Culture. **Journal Of General Microbiology.** (137) : 1369 - 1374
- Duetz W.A., De Jon C. Y Williams P.A., Van Andel J.G., (1994). Competition In Chemostat Culture Between *Pseudomonas* Strains That Use Different Pathways For The Degrafation Of Toluene. **Applied Environmental Microbiology.** (60) (8):2858 - 2863.
- Eckenfelder W.W. (1991). Strategies For Toxicity Reduction In Industrial Wastewater. **Water Science Tech.**(24) (7):185 - 193.
- Eckenfelder Jr W.W. Y Lankford P.W. (1992). Protocol For Source Toxicity Evaluation. **Water Science Tech.** (25) (3): 45 - 54.
- Edwards E.A. Y Grbic-Galic D. (1994). Anaerobic Degradation Of Toluene And O-Xilene By A Methanogenic Consortium. **Applied And Environmental Microbiology.** (60) (1) 313 - 322.
- Edwards E.A., Edwards A.M., Y Grbic-Galic D. (1994). A method for detection of aromatic metabolites at very low concentrations: aplicattion to detection of metabolites of anaerobic toluene degradation. **Applied And Environmental Microbiology.** (60) (1) 323-327
- Evans W.C. (1969). **Microbial Transformation Of Aromatic Compounds.** In **Fermentation Advanced.** Academic Press, New York. 649 - 687



Enciclopedia De Tecnologia Química. Vol. 15. Pp.P. 540 - 551

Environmental Canada. (1984). **Enviro Technical Information For Problems Spills. TOLUENE.** Environment Protection Service Of Canada. 363.738, E56 19701 77- 90

Fan S. Y Scow K.M. (1993). Biodegradation Of Trichloroethylene And Toluene By Indigenous Microbial Populations In Soil. **Applied And Environmental Microbiology.** (59) (6) 469-476

Field J.A., Stams A.J.M., Kato M.Y Schraa G. (1995). Enhanced Biodegradation Of Aromatic Pollutants In Cocultures Of Anaerobic And Aerobic Bacterial Consortia. **Antonie Van Leeuwenhoek.** (67): 47 - 77

Ford D. L. (1992). **Toxicity Reduction, Evaluation And Control.** Vol. 3 Technomic, Publishing, CO. Inc. p 89

Fewson C.A. (1981). **Biodegradation Of Aromatics With Industrial Relevance. In Microbiological Degradation Of Xenobiotics And Recalcitrant Compounds.** (FEMS Simp. Ser. 12) Academic Press, London. 141-179

García M.R.L. (1992). Contaminantes Tóxicos Prioritarios En Agua. Universidad Autónoma de Chapingo. pp 294

Gaudy Jr. A.F. Y Gaudy E.T. (1988). **Elements Of Bioenvironmental Engineering.** Engineering Press, Inc. Chapter Six p. 207 - 341.

Gibson D.T. Y Subramanian. (1984). **Microbial Degradation Of Aromatics Hydrocarbons.** In Microbial Degradation Of Organic Compounds . Dekker, New York. 181- 251.

Grady Jr. Y C.P.L. The Enhancement Of Microbial Activity Through Bioreactor Design. **Biotechnology Application in Hazardous Waste Treatment.** p. 81 - 93

Grady L.Jr. Y Lim H.C. **Biological Wastewater Treatment. Theory And Applications.** Marcel Dekker, Inc. 1980. P.P. 305-350

Grady Jr., C.P.L., Dang J.S., Harvey D.M., Jobbagy A.Y Wang X.L. (1989). Determination of Biodegradation Kinetics through use of electrolytic Respirometry . **Water Science Technology.** (21): 957 - 968.

Goma G.Y Ribot D., (1978). Hydrocarbon fermentation: kinetics of microbial cell growth. **Biotechnology and bioengineering.** (20) : 1723 - 1734

Grifoll. (1992). Isolation And Characterization Of A Fluorene - Degrading Bacterium **Applied Environmental Microbiology.** 2910 - 2915.

Gu Y.Y Korus R.A. (1995) Effects of p-Cresol and Chlorophenols on Pentachlorophenol Biodegradation. **Biotechnology and bioengineering.** (47) : 470 - 475

- Haller H.D. Y Finn R.K. (1978). Kinetics Of Biodegradation Of p-nitobenzene And Inhibition By Benzoate In A Pseudomonas. **Applied Environmental Microbiology.** (35) 890 - 896
- Hannah S., Austern B., Eralp A. Y Wise R. (1986). Comparative Removal Of Toxic Pollutans By Six Wastewater Treatment Proceses. **Journal WPCF.** (68) (1) 27-34
- Haigler B.E.Y Spain J.C. (1993). Biodegradation Of 4-Nitrotoluene By Pseudomonas Sp. Strain 4NT. **Applied Environmental Microbiology.** (59) (7) 2239 - 2243.
- Hayaishi O. (1964). **Plenary Sessions Sixth Internatinal Congress Biochemistry.** New York City 1.U.B. 33 - 31
- Healy J.B., Young L.Y. Y Reinhard M. (1980). Biodegradation of The Aromatic Compound Ferulic Acid To Methane. 4NT. **Applied Environmental Microbiology.** (39) 436 - 444
- Hooke R. Y Jeeves T.A. (1961). "Direct Search" Solution of Numerical and Statistical Problems. **Journal Association for Computing Machinery.** (8) 212-229.
- Hützingler o. Y Veerkamp W. (1981). **Xenobiotics Chemicals With Pollution Potencial . In Microbial Degradation Of Xenobiotics And Recalcitrants Compounds.** Academic Press Inc. London · 3.
- Johnson. M.G. (1994). **Nonlinear Optimization using the Algorithm of Hooke and Jeeves.**
- Klécka G.M. Y Maier W. J. (1988) Kinetics of Microbial Growth on Mixtures of Pentachlorophenol and Chorinated Aromatic Compounds. **Biotechnol. Bioeg.** (31) : 32 -335
- Lankford P.W. Y Eckenfelder W. Jr. **Toxicity Reduction In Industrial Effluents.** Van Nostrand Reinhold. 1990. P.P. 125 -145
- Law A.T. Y Button D.K. (1986). Modulation Of Affinity Of A Marine Pseudomonad For Toluene And Benzene By Hidrocarbon Exposure. **Applied And Environmental Microbiology.** (51) (3):469-476
- Mijaylova P., Torres Bustillos L., Ramírez C. E. Y Campos N. (1997) Isolation And Identification Of Bacteria Present In An Activated Sludge System Used To Treat HighY Toxic Chemical- Pharmaceutical Wastewater. **Proceedings Second International Conference On Microorganisms In Activated Sludge And Biofilm Processes.** Berkeley, California, USA.
- Mirenda R.J. Y Hall W.S. (1992). The Application Of Effluent Characterization Procedures In Toxicity Identification Evaluations. **Water Science Tech.** (25)(3): 39 - 44.

- Morgan P., Lewis S.T. Y Watkinson R.J. (1993). Biodegradadion Of Benzene, Toluene, Ethylbenzene And Xylenes In Gas-Condensate-Contaminated Ground- Water. **Environmental Pollution. (82)**: 181 - 190
- Naziruddin M., Grady Jr.L. Y Tabak H.H. (1995). Determination Of Biodegradation Kinetics Of Volatile Organic Compounds Through The Use Of Respitometry. **Water Environment Research.(67) (2)**: 151 - 157.
- Paris D.F., Steen C., Baughman G.L. Y Barnett, Jr. J., (1981). Second-Order Model To Predict Microbial Degradation Of Organic Compounds In Natural Waters. **Applied Environmental Microbiology. (41) (3)**: 603 - 609
- Pawlowsky U. Y Howell J.A. (1973). Mixed Culture Bio-oxidation Of Phenol. Y. Determination Of Kinetic Parameters. **Biotechnology And Bioengineering. (15)** : 889
- Pincince A.B. (1991). Transfer Of Oxygen And Emissions Of Volatile Organic Compounds At Clarifier Weirs. **Research Journal WPCF. (63) (2)**: 114 - 119
- Ramírez E. Mijaylova P. Torres L. Cardoso Y L. López S. (1994). Informe Final Del Proyecto U19413: **Reducción De Toxicidad En Efluentes De Síntesis Orgánica**. IMTA/CTCA. Subcoordinación de Tratamiento De Aguas Residuales. 307 p.
- Ramírez E. Mijaylova P. Torres L. Cardoso Y L. López S. (1995). Informe Final Del Proyecto TC- 9507 : **Adaptación De microorganismos Para La Degradación De Contaminantes Especificos Y Reducción De Toxicidad**. IMTA/CTCA. Subcoordinación de Tratamiento De Aguas Residuales. 125 p.
- Robertson B.R. Y Button D.K. (1987). Toluene Induction And Uptake Kinetics And Their Inclusion In The Specific-Affinity Relationship For Describing Rates Of Hydrocarbon Metabolism. **Applied Environmental Microbiology. (53) (9)**: 2193 - 2205.
- Robinson J.A. Y Tiedje J.M. (1983). Nonlinear Estimation Of Monod Growth Kinetic Parameters From A Single Substrate Depletion Curve. **Applied Environmental Microbiology. (45) (5)**: 1453 - 1458.
- Robertson B.R. Y Button D.K. (1987). Toluene Induction And Uptake Kinetics And Their Inclusion In The Specific-Affinity Relationship For Describing Rates Of Hydrocarbon Metabolism. **Applied Environmental Microbiology. (53) (9)** : 2193 - 2205.
- Rosselló-Mora R.A., Luluat J. Y García-Valdéz E. (1994). Comparative Biochemical and Genetic Analysisi of Naphthalene Degradation among *Pseudomonas stutzeri* Strains. **Applied Environmental Microbiology. (60) (3)**: 966 - 972.
- Rozich A.F.Y Gaudy Jr. A.F. (1986). Process Technology For The Biological Treatment Of Toxic Organic Wastes.**Hazardous And Industrial Solid Waste Testing And Disposal: Sixth Volume. ASTM STP 933. P.P. 319 -333.**

- Seibl J. (1973). **Espectrometría De Masas**. Ed. Alhambra. pp. 223
- Shaler T.A. Y Klecka G.M. (1986). Effects Of Dissolved Oxygen Concentration On Biodegradation Of 2,4-Dchlorophenoxyacetic Acid. **Applied Environmental Microbiology**. (51) (5) : 950 - 955.
- Shreve G.S. Y Vogel T.M. (1993). Comparison of Substrate Utilization and Growth Kinetics Between Immobilized and Suspended *Pseudomonas* Cells. **Biotechnology and Bioengineering**. (41) : 370 - 379.
- Shlegel H.G. (1993) "**General Microbiology**" 7th ed. Cambridge University Press. pp. 11- 15: 110- 115
- Simkins S. Y Alexander M. (1984). Models For Mineralization Kinetics With The Variables Of Substrate Concentracion And Population Density. **Applied Environmental Microbiology**. (47) (6): 1299 - 1306.
- Smith M.R., Ewing M. Y Ratledge C. (1991). The Interactions Of Various Aromatics Substrates Degraded By *Pseudomonas* Sp. NCIB 10643: Synergistic Inhibition Of Growth By Two Compounds Wich Serve As Growth Substrates. **Applied Environmental Microbiology**. 51 (5) 345 - 351.
- Stover E.L.Y Kincannon D.F. (1983). Biological Treatability Of Specific Organic Compounds Found In Chemical Industry Wastewaters. **Journal WPCF**. 55 (1): 97 - 109
- Strenstrom M.K., Cardinal L. Y Libra J. (1989). Treatment Of Harzardous Substances In Wastewater Treatment Plants. **Environmental Process**. 8 (2) : 107 - 112.
- Subba-Rao R.V., Rubin H.E. Y Alexander M. (1982). Kinetics And Extent Of Mineralization Of Organic Chemicals At Trace Levels In Freshwater And Sewage. **Applied Environmental Microbiology**. 43 (5):1139 - 1150.
- Suzuki M., Hayakawa T., Shaw J.P., Rekik M. Y Harayama S. (1991). **Journal Of Bacteriology**. 173: 1690 - 1695
- Tobita S. Y Iyobe S. (1992). Total Degradation Of 4.chlorobenzoic Acid By An *Acinetobacter* Sp. **Water Science Technology** Vol. 25 11: 411 - 418
- U.S.EPA. (1980). **Treatability Manual. Volume II-Treatability Data**. U.S. Environmental Protecction Agency, EPA-600/80-042b.
- U.S. EPA. (1994). Risk Reduction Engineering Laboratory (RREL). **Tratability Database**. Versión 5.0 EPA - 600/C-93/003a.
- Vecht S.E., Platt M.W., Er-EI Z. Y Goldberg Y. (1988). The Growth Of *Pseudomonas Putida* On M-Toluic Acid And Toluene In Batch And Chemostat Cultures. **Applied Microbiology Biotechnology**. 27: 587 - 592

- Whited G.M. Y Gibson D.T. (1991). Separation And Partial Characterization Of The Enzymes Of The Toluene-4-Monooxygenase Catabolic Pathway In *Pseudomonas Mendocina* KR1. **Journal Of Bacteriology**. **173** (9): 3017 - 3020
- Wiggins B.A., Stephen H. J. Y Alexander M. (1987). Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemical in aquatic environments. **Applied Environmental Microbiology**. **53** (4): 791 - 796.
- Wilderer P-A., Rubio M.A. Y Davids L. (1991). Impact Of The Addition Of Pure Cultures On The Performance Of Mixed Culture Reactors. **Wat. Res.** **25** (11): 1307 - 1313
- Zollingert E.S. (1966). Effects Of Inhibition And Repression On The Utilization Of Substrates By Heterogenous Bacterial Communities. **Applied Environmental Microbiology**. **14**: 654 - 658.

## ANEXO 1

### Resultados de parámetros estimados por el modelo de Haldane

TIEMPO (Hr)	S <sub>EXP.</sub> (mg/l)	X <sub>EXP.</sub> (mg/l)	Y <sub>EXP.</sub> (mg biomasa/ mg tolueno)	S <sub>modelo</sub> (mg/l)	X <sub>modelo</sub> (mg/l)	Y <sub>modelo</sub> (mg/l)	DESVIACIÓN (%)
0	5.21	183.96	35.31	5.16	179.83	34.87	1.25
4	0.56	198.31	3.00	0.76	197.15	4.07	35.71
8	0.30	219.83	7.07	0.29	219.12	7.05	0.28
12	0.14	219.83	7.07	0.13	219.50	7.06	0.14
24	0.01	291.58	6.90	0.008	291.55	5.52	20.00
28	0	291.58	20.66	0.00	0.00	0.00	100.00

Tabla 1. Resultados experimentales y estimados por el Modelo de Haldane para el reactor con concentración de 25 mg/l de tolueno

TIEMPO (Hr)	S <sub>EXP.</sub> (mg/l)	X <sub>EXP.</sub> (mg/l)	Y <sub>EXP.</sub> (mg biomasa/ mg tolueno)	S <sub>MODELO</sub> (mg/l)	X <sub>MODELO</sub> (mg/l)	Y <sub>MODELO</sub> (mg/l)	DESVIACIÓN (%)
0	9.86	162.44	16.97	9.82	159.53	16.25	4.24
4	8.10	219.83	32.61	8.05	215.47	26.76	17.94
8	6.72	270.05	34.27	6.67	264.30	39.63	15.64
12	5.58	305.93	33.53	5.01	299.13	34.12	1.76
24	0.16	327.45	17.01	0.13	322.93	16.77	1.41
28	0.08	341.79	18.33	0.06	341.49	18.31	0.11
32	0.00	363.32	20.37	0.00	0.00	0.00	100.00

Tabla 2. Resultados experimentales y estimados por el Modelo de Haldane para el reactor con concentración de 50 mg/l de tolueno

TIEMPO (Hr)	S <sub>EXP.</sub> (mg/l)	X <sub>EXP.</sub> (mg/l)	Y <sub>EXP.</sub> (mg biomasa/ mg tolueno)	S <sub>modelo</sub> (mg/l)	X <sub>modelo</sub> (mg/l)	Y <sub>modelo</sub> (mg/l)	DESVIACIÓN (%)
0	17.20	133.74	7.89	16.97	121.33	7.15	9.28
4	15.00	140.92	2.35	14.34	126.43	2.11	10.21
8	4.80	148.09	0.99	4.17	123.39	0.82	17.17
12	2.88	155.26	1.36	2.50	131.64	1.15	15.44
24	0.02	162.44	1.55	0.016	162.15	1.54	0.64
28	0.01	169.61	1.97	0.008	169.46	1.96	0.51
32	0.00	176.79	2.38	0.00	0.00	0.00	100.00

Tabla 3. Resultados experimentales y estimados por el Modelo de Haldane para el reactor con concentración de 75 mg/l de tolueno

TIEMPO (Hr)	S <sub>EXP.</sub> (mg/l)	X <sub>EXP.</sub> (mg/l)	Y <sub>EXP.</sub> (mg biomasa/ mg tolueno)	S <sub>modelo</sub> (mg/l)	X <sub>modelo</sub> (mg/l)	Y <sub>modelo</sub> (mg/l)	DESVIACIÓN (%)
0	19.25	169.61	8.81	19.04	155.21	8.06	8.51
4	14.00	183.96	2.73	13.43	164.08	2.43	10.99
8	8.82	191.14	2.06	8.45	163.90	1.77	14.08
12	5.80	198.31	2.13	5.37	165.85	1.78	16.43
24	0.10	234.18	3.37	0.08	232.15	3.34	0.89
28	0.04	234.18	3.36	0.03	233.36	3.34	0.59
32	0.00	234.18	3.35	0.00	0.00	0.00	100.00

Tabla 4. Resultados experimentales y estimados por el Modelo de Haldane para el reactor con concentración de 100 mg/l de tolueno

## **ANEXO 2**

### **MODELO DE HALDANE**

**2.1 MÉTODODE HOOKE & JEEVES**

**2.2. MÉTODO DE RUNGE - KUTTA**



```

/* 2.1. METODO DE HOOKE & JEEVES */

/* PROGRAMA PARA ESTIMACION DE COEFICIENTES CINETICOS */

#include <stdio.h>
#include <math.h>

#define VARS (250) /* max # of variables */
#define RHO_BEGIN (0.5) /* stepsize geometric shrink */
#define EPSMIN (1E-6) /* ending value of stepsize */
#define IMAX (5000) /* max # of iterations */

/* global variables */
/* global variables */
int funevals = 0;

#ifdef Woods
double f();
#else

/* Rosenbrocks classic parabolic valley ("banana") function */
double
f(x, n)
    double x[VARs];
    int n;
{
    double a, b, c;
    funevals++;
    a = x[0];
    b = x[1];
    c = 100.0 * (b - (a * a)) * (b - (a * a));
    return (c + ((1.0 - a) * (1.0 - a)));
}

#endif

/* given a point, look for a better one nearby, one coord at a time */
double
best_nearby(delta, point, prevbest, nvars)
    double delta[VARs], point[VARs];
    double prevbest;
    int nvars;
{
    double z[VARs];
    double minf, ftmp;
    int i;
    minf = prevbest;
    for (i = 0; i < nvars; i++)
        z[i] = point[i];
    for (i = 0; i < nvars; i++) {
        z[i] = point[i] + delta[i];
        ftmp = f(z, nvars);
        if (ftmp < minf)
            minf = ftmp;
        else {
            delta[i] = 0.0 - delta[i];
            z[i] = point[i] + delta[i];
            ftmp = f(z, nvars);
            if (ftmp < minf)
                minf = ftmp;
            else
                z[i] = point[i];
        }
    }
    for (i = 0; i < nvars; i++)
        point[i] = z[i];
    return (minf);
}

int
hooke(nvars, startpt, endpt, rho, epsilon, itermax)
    double startpt[VARs], endpt[VARs];

```

```

int          nvars, itermax;
double      rho, epsilon;

{
double      delta[VARS];
double      newf, fbefore, steplength, tmp;
double      xbefore[VARS], newx[VARS];
int         i, j, keep;
int         iters, iadj;
for (i = 0; i < nvars; i++) {
    newx[i] = xbefore[i] + startp[i];
    delta[i] = fabs(startp[i] * rho);
    if (delta[i] == 0.0)
        delta[i] = rho;
}
iadj = 0;
steplength = rho;
iters = 0;
fbefore = f(newx, nvars);
newf = fbefore;
while ((iters < itermax) && (steplength > epsilon)) {
    iters++;
    iadj++;
    printf("\nAfter %5d funevals, f(x) = %.4le at\n", funevals, fbefore);
    for (j = 0; j < nvars; j++)
        printf("  x[%2d] = %.4le\n", j, xbefore[j]);
    /* find best new point, one coord at a time */
    for (l = 0; l < nvars; l++) {
        newx[l] = xbefore[l];
    }
    newf = best_nearby(delta, newx, fbefore, nvars);
    /* if we made some improvements, pursue that direction */
    keep = 1;
    while ((newf < fbefore) && (keep == 1)) {
        iadj = 0;
        for (i = 0; i < nvars; i++) {
            /* firstly, arrange the sign of delta[] */
            if (newx[i] <= xbefore[i])
                delta[i] = 0.0 - fabs(delta[i]);
            else
                delta[i] = fabs(delta[i]);
            /* now, move further in this direction */
            tmp = xbefore[i];
            xbefore[i] = newx[i];
            newx[i] = newx[i] + newx[i] - tmp;
        }
        fbefore = newf;
        newf = best_nearby(delta, newx, fbefore, nvars);
        /* if the further (optimistic) move was bad.... */
        if (newf >= fbefore)
            break;
        /* make sure that the differences between the new */
        /* and the old points are due to actual */
        /* displacements; beware of roundoff errors that */
        /* might cause newf < fbefore */
        keep = 0;
        for (i = 0; i < nvars; i++) {
            keep = 1;
            if (fabs(newx[i] - xbefore[i]) >
                (0.5 * fabs(delta[i])))
                break;
            else
                keep = 0;
        }
    }
    if ((steplength >= epsilon) && (newf >= fbefore)) {
        steplength = steplength * rho;
        for (i = 0; i < nvars; i++) {
            delta[i] *= rho;
        }
    }
}
for (i = 0; i < nvars; i++)
    endpt[i] = xbefore[i];
return (iters);
}

```

```

#ifndef Woods
main()
{
    double  startpt[VARs], endpt[VARs];
    int     nvars, itemax;
    double  rho, epsilon;
    int     i, jj;

    /* starting guess for rosenbrock test function */
    nvars = 2;
    startpt[0] = -1.2;
    startpt[1] = 1.0;

    itemax = IMAX;
    rho = RHO_BEGIN;
    epsilon = EPSMIN;
    jj = hooke(nvars, startpt, endpt, rho, epsilon, itemax);
    printf("\n\nHOOKE USED %d ITERATIONS, AND RETURNED\n", jj);
    for (i = 0; i < nvars; i++)
        printf("x[%3d] = %15.7le \n", i, endpt[i]);
}
#else
/* The Hooke & Jeeves algorithm works reasonably well on
 * Rosenbrock's function, but can fare worse on some
 * standard test functions, depending on rho. Here is an
 * example that works well when rho = 0.5, but fares poorly
 * with rho = 0.6, and better again with rho = 0.8.
 */

#ifndef RHO_WOODS
#define RHO_WOODS 0.6
#endif

/* Woods -- a la More, Garbow & Hillstom (TOMS algorithm 566) */

double
f(x, n)
{
    double  x[VARs];
    int     n;

    double  s1, s2, s3, t1, t2, t3, t4, t5;
    funevals++;
    s1 = x[1] - x[0]*x[0];
    s2 = 1 - x[0];
    s3 = x[1] - 1;
    t1 = x[3] - x[2]*x[2];
    t2 = 1 - x[2];
    t3 = x[3] - 1;
    t4 = s3 + t3;
    t5 = s3 - t3;
    return 100*(s1*s1) + s2*s2 + 90*(t1*t1) + t2*t2
        + 10*(t4*t4) + t5*t5/10.;
}

main()
{
    double  startpt[VARs], endpt[VARs];
    int     nvars, itemax;
    double  rho, epsilon;
    int     i, jj;

    /* starting guess test problem "Woods" */
    nvars = 4;
    startpt[0] = -3;
    startpt[1] = -1;
    startpt[2] = -3;
    startpt[3] = -1;

    itemax = IMAX;
    rho = RHO_WOODS;
    epsilon = EPSMIN;
    jj = hooke(nvars, startpt, endpt, rho, epsilon, itemax);
}

```

```
printf("\n\n\nHOOKE USED %d ITERATIONS, AND RETURNED\n", jj);
for (i = 0; i < nvars; i++)
    printf("x[%3d] = %15.7le \n", i, endpt[i]);
printf("True answer: f(1, 1, 1, 1) = 0.\n");
}
#endif
```

{ 2.2. METODO DE RUNGE-KUTTA }

```
PROGRAM RESOLUCION_DE_ECUACION_DE_HALDANE_POR_RUNGE_KUTTA;
```

```
USES
```

```
CRT,GRAPH,PRINTER;
```

```
CONST
```

```
MAX=100; { EL NUMERO MAXIMO DEL ARREGLO MATRIZ }
```

```
TYPE
```

```
MATRIZ=ARRAY[1..MAX] OF REAL;
```

```
VAR
```

```
XX,YY,X,Y,K1,K2,K3,K4,VALEXP,ERR:MATRIZ;
```

```
N,NDAT:INTEGER;
```

```
SEL:CHAR;
```

```
S:REAL;
```

```
{ FUNCION DIFERENCIAL BIOMASA X }
```

```
FUNCTION FS(X,Y:REAL):REAL; {FUNCION EJEMPLO PARA VERIFICAR RUNGE }
```

```
BEGIN
```

```
FS:=-(UMAX*S)/(S+KS+((S*S)/KI))*Y; { Y ES BIOMASA }
```

```
END;
```

```
{ FUNCION DIFERENCIAL SUSTRATO S }
```

```
FUNCTION F(X,Y:REAL):REAL;
```

```
BEGIN
```

```
F:=-Y/(Y+KS+((Y*Y)/KI)); {Y ES S }
```

```
END;
```

```
PROCEDURE PAUSA;
```

```
VAR
```

```
A:CHAR;
```

```
BEGIN
```

```
GOTOXY(20,25);
```

```
TEXTCOLOR(14);
```

```
WRITE('.....OPRIME ENTER PARA CONTINUAR');
```

```
A:=READKEY;
```

```
END;
```

```
PROCEDURE PRESENT1;
```

```
BEGIN
```

```
TEXTBACKGROUND(10);
```

```
CLRSCR;
```

```
GOTOXY(20,1);
```

```
TEXTCOLOR(14+BLINK);
```

```
WRITE('>>>METODO DE RUNGE-KUTTA <<<');
```

```
END;
```

```
PROCEDURE EXPLIC1;
```

```
BEGIN
```

```
TEXTBACKGROUND(10);
```

```
CLRSCR;
```

```
TEXTCOLOR(11);
```

```
WRITELN('EL METODO RUNGE-KUTTA DE 4 ORDEN ES UN METODO NUMERICO POPULAR PARA ');
```

```
WRITELN;
```

```
WRITELN('ENCONTRAR SOLUCIONES DE ECUACIONES DIFERENCIALES DONDE SE REQUIERE DE');
```

```
WRITELN;
```

```
WRITELN('RESPUESTAS CON ALTO GRADO DE EXACTITUD. EL ALGORITMO PUEDE SER MAS ');
```

```
WRITELN;
```

```
WRITELN('PRECISO USANDO EL METODO RK DE 5 ORDEN, PERO LA GANANCIA OBTENIDA EN');
```

```
WRITELN;
```

```
WRITELN('EXACTITUD SE CONTRAPONA CON LA COMPLEJIDAD Y ESFUERZO DE CALCULO. NO ');
```

```
WRITELN;
```

```
WRITELN('OBSTANTE SE PUEDE IMPLEMENTAR FACILMENTE.');
```

```
WRITELN;
```

```
WRITELN('EL TAMAÑO DE PASO ES EL INCREMENTO DEL VALOR DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE');
```

```
WRITELN;
```

```
WRITELN('Y SE RECOMIENDA VALORES PEQUEÑOS PARA DISMINUIR ERRORES (GRANDES
```

```
VALORES');
```

```
WRITELN;
```

```

WRITELN('DISMINUYEN EL TIEMPO DE CORRIDA PERO AUMENTAN LOS ERRORES. POR EL
CONTRARIO');
WRITELN;
WRITELN('PEQUEÑOS VALORES DISMINUYEN ERRORES PERO AUMENTA EL TIEMPO DE CORRIDA.');
```

```

PAUSA
END;
```

```

PROCEDURE RUNGE(VAR X,Y,K1,K2,K3,K4,ERR:MATRIZ;VAR N:INTEGER);
```

```

VAR
I,L:INTEGER;
XI,XF,YI,H:REAL;
BEGIN
  CLRSCR;
  N:=ROUND((XF-XI)/H)+1;
  X[1]:=XI;
  Y[1]:=YI;
  IF (N<>0) THEN
    BEGIN
      FOR I:=1 TO N DO
        BEGIN
          K1[I]:=F(X[I],Y[I]);
          K2[I]:=F(X[I]+(0.5*H),Y[I]+(0.5*H*K1[I]));
          K3[I]:=F(X[I]+(0.5*H),Y[I]+(0.5*H*K2[I]));
          K4[I]:=F(X[I]+H,Y[I]+(H*K3[I]));

          Y[I+1]:=Y[I]+(((K1[I]+(2*K2[I])+(2*K3[I])+K4[I])/6)*H);
          X[I+1]:=X[I]+H;
        END;
      END;
    END;
```

```

(CALCULA EL ERROR DEL DATO CALCULADO CON EL DEL VALOR EXPERIMENTAL)
```

```

FOR L:=1 TO NDAT DO
  ERR[L]:=((ABS(Y[L]-VALEXP[L]))/Y[L])*100;
END;
```

```

PROCEDURE RESULTA(X,Y,K1,K2,K3,K4,ERR:MATRIZ;N:INTEGER);
```

```

VAR
CONT,RENGL,I:INTEGER;
BEGIN
  CLRSCR;
  GOTOXY(25,1);
  TEXTCOLOR(14+BLINK);
  WRITE('<<<RESULTADOS RUNGE-KUTTA PARA EC. HALDANE DS/DT>>>');
  TEXTCOLOR(11);
  GOTOXY(7,3);
  WRITE('T');
  GOTOXY(17,3);
  WRITE('S');
  GOTOXY(28,3);
  WRITE('K1');
  GOTOXY(40,3);
  WRITE('K2');
  GOTOXY(53,3);
  WRITE('K3');
  GOTOXY(63,3);
  WRITE('K4');
  GOTOXY(70,3);
  WRITE('ERROR %');
  GOTOXY(1,4);
  WRITE('-----');
  CONT:=0;
  FOR I:=1 TO N DO
    BEGIN
      CONT:=CONT+1;
      RENGL:=CONT+4;
      GOTOXY(1,RENGL);
      WRITE(X[I]:10:6);
      GOTOXY(12,RENGL);
      WRITE(Y[I]:10:6);
      GOTOXY(24,RENGL);
      WRITE(K1[I]:10:6);
```

```

GOTOXY(36,RENGL);
WRITE(K2[I]:10:6);
GOTOXY(48,RENGL);
WRITE(K3[I]:10:6);
GOTOXY(60,RENGL);
WRITE(K4[I]:10:6);
GOTOXY(70,RENGL);
WRITE(ERR[I]:10:6);

IF (RENGL=23) THEN
BEGIN
PAUSA;
CLRSCR;
CONT:=0;
END
END;
PAUSA;
END;

PROCEDURE RUNGE2(VAR XX,YY,K1,K2,K3,K4,ERR:MATRIZ;VAR N:INTEGER);
VAR
I,L:INTEGER;
XI,XF,YI,H:REAL;
BEGIN
CLRSCR;
N:=ROUND((XF-XI)/H)+1;
XX[1]:=XI;
YY[1]:=YI;
IF (N<>0) THEN
BEGIN
FOR I:=1 TO N DO
BEGIN

K1[I]:=FS(XX[I],YY[I]);
K2[I]:=FS(XX[I]+(0.5*H),YY[I]+(0.5*H*K1[I]));
K3[I]:=FS(XX[I]+(0.5*H),YY[I]+(0.5*H*K2[I]));
K4[I]:=FS(XX[I]+H,YY[I]+(H*K3[I]));

YY[I+1]:=YY[I]+(((K1[I]+(2*K2[I])+(2*K3[I])+K4[I])/6)*H);
XX[I+1]:=XX[I]+H;
END;
END;

{CALCULA EL ERROR DEL DATO CALCULADO CON EL DEL VALOR EXPERIMENTAL}

FOR L:=1 TO NDAT DO
ERR[L]:=((ABS(YY[L]-VALEXP[L]))/YY[L])*100;
END;

PROCEDURE RESULTA2(XX,YY,K1,K2,K3,K4,ERR:MATRIZ;N:INTEGER);
VAR
CONT,RENGL,I:INTEGER;
BEGIN
CLRSCR;
GOTOXY(25,1);
TEXTCOLOR(14+BLINK);
WRITE('<<<RESULTADOS RUNGE-KUTTA PARA EC. HALDANE DX/DT>>>');
TEXTCOLOR(11);
GOTOXY(7,3);
WRITE('T');
GOTOXY(17,3);
WRITE('S');
GOTOXY(28,3);
WRITE('K1');
GOTOXY(40,3);
WRITE('K2');
GOTOXY(53,3);
WRITE('K3');
GOTOXY(63,3);
WRITE('K4');
GOTOXY(70,3);
WRITE('ERROR %');

```

```

GOTOXY(1,4);
WRITE('-----');
CONT:=0;
FOR I:=1 TO N DO
  BEGIN
    CONT:=CONT+1;
    RENGL:=CONT+4;
    GOTOXY(1,RENGL);
    WRITE(X[I]:10:6);
    GOTOXY(12,RENGL);
    WRITE(Y[I]:10:6);
    GOTOXY(24,RENGL);
    WRITE(K1[I]:10:6);
    GOTOXY(36,RENGL);
    WRITE(K2[I]:10:6);
    GOTOXY(48,RENGL);
    WRITE(K3[I]:10:6);
    GOTOXY(60,RENGL);
    WRITE(K4[I]:10:6);
    GOTOXY(70,RENGL);
    WRITE(ERR[I]:10:6);

    IF (RENGL=23) THEN
      BEGIN
        PAUSA;
        CLRSCR;
        CONT:=0;
      END
    END;
  END;
PAUSA;
END;

```

```

PROCEDURE ESTIMAY (Y,YY:MATRIZ;NDAT:INTEGER);
VAR
  CONT,I,RENGL:INTEGER;
  YOBS,YEST,ERR2:MATRIZ;
  A:CHAR;
  BEGIN
    REPEAT
      CLRSCR;
      GOTOXY(10,1);
      WRITE(' INTRODUCIR DATOS DE Y EXPERIMENTAL ');
      WRITELN;
      WRITELN;

      FOR I:=1 TO NDAT DO
        BEGIN
          WRITE('DAME EL VALOR DE Y[',I,']: ');
          READLN(YOBS[I]);
          END;
        WRITELN;
        WRITELN(' LOS DATOS ESTAN CORRECTOS (S/N)');
        A:=READKEY;
        UNTIL (A='S') OR (A='s');
        CLRSCR;
        GOTOXY(10,1);
        WRITE('CALCULOS PARA Y ESTIMADA ');
        TEXTCOLOR(11);
        GOTOXY(7,3);
        WRITE('DS/DT');
        GOTOXY(17,3);
        WRITE('DX/DT');
        GOTOXY(28,3);
        WRITE('Y EST. ');
        GOTOXY(40,3);
        WRITE('Y OBS. ');
        GOTOXY(53,3);
        WRITE('ERROR');
        CONT:=0;
      FOR I:=1 TO NDAT DO
        BEGIN
          YEST[I]:=YY[I]/Y[I];
          ERR2[I]:=(ABS(YEST[I]-YOBS[I])/YEST[I])*100;
          CONT:=CONT+1;

```



```
RENGL:=CONT+4;  
GOTOXY(1,RENGL);  
WRITE(Y[I]:10:6);  
GOTOXY(12,RENGL);  
WRITE(YY[I]:10:6);  
GOTOXY(24,RENGL);  
WRITE(YEST[I]:10:6);  
GOTOXY(36,RENGL);  
WRITE(YOBS[I]:10:6);  
GOTOXY(48,RENGL);  
WRITE(ERR2[I]:6:6);  
END;
```

```
END;
```

```
BEGIN  
RUNGE(X,Y,K1,K2,K3,K4,ERR,N);  
RESULTA(X,Y,K1,K2,K3,K4,ERR,N);  
RUNGE2(XX,YY,K1,K2,K3,K4,ERR,N);  
RESULTA2(XX,YY,K1,K2,K3,K4,ERR,N);  
ESTIMAY (Y,YY,NDAT);  
PAUSA;  
END .
```