

2002



01187  
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE INGENIERÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

# ESTUDIO DE LA REMOCIÓN DE FENOLES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS CON BIOMASA FIJA

Tesis

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ingeniería (Ambiental)

PRESENTA:

M. en B. Luis Gilberto Torres Bustillos

Enero de 2002

Torres Bustillos, Luis Gilberto

2002

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.

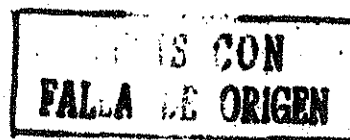
# CONTENIDO

Pags.

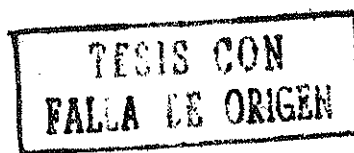
Resumen .....	i
Abstract .....	ii
Abreviaturas.....	iii
Contenido.....	v
Índice de tablas .....	xi
Índice de figuras .....	xiv
Hipótesis .....	1
Objetivo .....	2
1. Introducción.....	4
2 Antecedentes .....	11
2.1 Características generales del fenol y los clorofenoles.....	11
2.2 Mecanismos de degradación.....	11

2.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	13
2.4 Soportes disponibles para la inmovilización de células degradadoras de compuestos .....	15
2.5 Reología de las soluciones de polímeros naturales.....	16
2.6 Biodegradación de compuestos tóxicos por medio de sistemas de biomasa fija .....	17
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>25</b>
3.1 Experimentos con células libres .....	25
3.1.1 Cultivo de la bacteria	25
3.1.2 Cosecha de células	28
3.1.3 Prueba preliminar de biodegradación	28
3.2 Preparación del catalizador de alginato de calcio.....	29
3.2.1 Preparación de las soluciones de alginato de sodio	29
3.2.2 Tratamiento térmico aplicado a las soluciones de alginato	29
3.2.3 Caracterización reológica de las soluciones de alginato	29
3.2.4 Elaboración del catalizador de alginato de calcio	30
3.2.5 Caracterización de las esferas de alginato	30
3.3 Análisis de los clorofenoles y productos intermedios.....	31
3.3.1 Métodos colorimétricos	31
3.3.2 Determinación de mezclas de clorofenoles y algunos metabolitos de su degradación por cromatografía de gases	31
3.4 Determinación de biomasa y cuenta en placa .....	32
3.4.1 Determinación de biomasa por densidad óptica	32
3.4.2 Determinación de las UFC/ml o UFC/g soporte	32
3.5 Experimentos en columnas empacadas de 0.027 litros, operación por lote a temperatura controlada.....	33
3.5.1 Características de las partículas	33

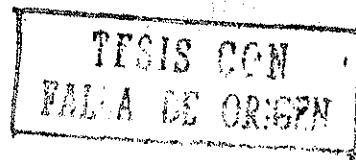
3.5.2 Determinación de la capacidad de adsorción de células en cada soporte	33
3.5.3 Determinación de las capacidades de adsorción de los materiales	35
3.5.4 Operación de las columnas empacadas	35
3.6 Experimentos en columna empacada de 5 litros, operación en continuo a temperatura ambiente	36
3.6.1 fermentación de 15 litros con <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36
3.6.2 Inoculación de la columna de 5 litros	36
3.6.3 Caracterización de las mezcla de tezontle (finos, medio y gruesos)	36
3.6.4 Característica de la columna empacada con capacidad de 5 litros	37
3.6.5 Operación de la columna de 5 litros	37
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>39</b>
4.1 Experimentos con células libres	39
4.1.1 Biodegradación de fenoles con células libres	39
4.1.2 Resultados de la fermentación de 15 litros para la producción de biomasa	39
4.2 Producción y caracterización del catalizador de alginato de calcio	40
4.2.1 Caracterización reológica de las soluciones de alginato	40
4.2.2 Producción de las esferas de alginato	43
4.2.3 Caracterización física de las esferas producidas	46
4.2.4 Fracción vacía y humedad de las partículas producidas	47
4.2.5 Caracterización cinética	49
4.2.6 Pruebas de biodegradación con las esferas de alginato	51
4.3 Caracterización de los diferentes medios de soporte	53
4.3.1 Caracterización de los distintos soportes	53



4.3.2 Determinación de la colonización de los diferentes soportes por <i>Pseudomonas fluorescens</i>	54
4.3.3 Caracterización de las mezclas de tezontle	55
4.4 Degradación de compuestos fenólicos simples en operación por lote. Columna de 27 ml de capacidad.....	56
4.4.1 Comparación del desempeño de las columnas empacadas con carbón activado, tezontle y alginato de calcio	56
4.4.2 Algunas pruebas de degradación de clorofenoles solos en la columna empacada con tezontle	58
4.4.3 Biodegradación de clorofenoles con las células inmovilizadas	58
4.4.4 Desarrollo del material celular en la columna	60
4.4.5 Relación entre la actividad de la columna y la concentración del tóxico empleado	61
4.4.6 Operación de la columna de 27 ml	63
4.4.7 Carga biomásica del biofiltro	65
4.4.8 Efecto de la relación C/N sobre la VBD de la columna	66
4.4.9 Degradación de clorofenoles y COT	67
4.5 Degradación de mezclas de fenoles en operación por lote. Columna de 54 ml de capacidad.....	70
4.5.1 Biodegradación de las mezclas de clorofenoles	70
4.5.2 Degradación de COT y caracterización cinética del proceso	76
4.5.3 Reducción de la toxicidad	78
4.6 Degradación de clorofenoles en operación continua. Columna de 5 l de capacidad .....	79
4.6.1 Producción del inóculo e inmovilización del microorganismo a la columna	79
4.6.2 Arranque y operación de la columna empacada	86
4.6.3 Biodegradación de 2,4,6-triclorofenol	92



4.6.4 Biodegradación de 2-clorofenol	96
4.6.5 Biodegradación de 2,4-diclorofenol	98
4.6.6 Biodegradación de pentaclorofenol	100
4.6.7 Biodegradación de la mezcla binaria	104
4.6.8 Biodegradación de la mezcla ternaria	105
4.7 Degradación de mezclas de fenoles en operación continua .....	105
4.7.1 Resultados de biodegradación de las mezclas de	
200, 400 y 600 mg/l	105
4.8 Análisis estadístico de algunos de los experimentos en continuo.....	112
4.8.1 Caso I. Diferentes compuestos, variando el TRH	112
4.8.1.1 Descripción	112
4.8.1.2 Modelo a utilizar	112
4.8.1.3 Hipótesis	113
4.8.1.4 Datos	114
4.8.1.5 Resumen	114
4.8.1.6 Interpretación	114
4.8.2 Caso II. Diferentes concentraciones en la mezcla, variando el TRH	115
4.8.2.1 Descripción	115
4.8.2.2 Modelo a utilizar	115
4.8.2.3 Hipótesis	116
4.8.2.4 Datos	116
4.8.2.5 Resumen	117
4.8.2.6 Interpretación	117
<b>5. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>118</b>
5.1 Conclusión general.....	118
5.2 Conclusiones específicas .....	119



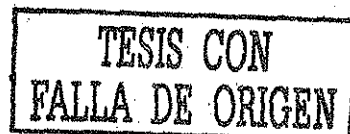
5.2.1 Aspectos bioquímicos y microbiológicos de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	119
5.2.2 Soporte más adecuado para la inmovilización	120
5.2.3 Condiciones para la producción masiva de <i>P. fluorescens</i>	120
5.2.4 Tratamiento de los compuestos por separado en una columna empacada operando en lote	121
5.2.5 Tratamiento de mezclas en la columna empacada operando en lote	122
5.2.6 Tratamiento de los compuestos por separado en la columna empacada operando en continuo	122
5.2.7 Tratamiento de las mezclas en la columna empacada operando en lote	123

**6. Referencias ..... 126**

**Anexo A. Metabolismo bacteriano de algunos clorofenoles..... 134**

A.1 Metabolismo bacteriano de los clorofenoles (excepto el pentaclorofenol).....	134
A.2 Metabolismo bacteriano del pentaclorofenol.....	137

**Anexo B. Publicaciones internacionales basadas en el trabajo de Tesis..... 141**





# ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.1** Valores de toxicidad para el fenol y algunos derivados fenólicos, como dosis letal media (EC50), en mg/l

**Tabla 1.2** Calidad requerida para usos de agua en México. Los valores están en mg/l

**Tabla 1.3** Concentraciones de fenol y clorofenoles en algunos efluentes industriales

**Tabla 2.1** Características toxicológicas del fenol y algunos clorofenoles

**Tabla 2.2** Matrices utilizadas para la inmovilización de bacterias puras o mezclas

**Tabla 2.3** Resumen de los soportes y los microorganismos empleados en la biodegradación de compuestos tóxicos por medio de sistemas de biomasa fija

**Tabla 2.4** Resumen de los compuestos tratados y las velocidades de degradación alcanzadas

**Tabla 2.5** Eficiencias alcanzadas por los sistemas en relación con el TRH

**Tabla 4.1** Resultados de las pruebas de biodegradación desarrolladas. Células libres

**Tabla 4.2** Caracterización reológica de las soluciones de alginato de sodio antes y después del tratamiento térmico

**Tabla 4.3** Caracterización reológica de las mezclas alginato/células

**Tabla 4.4a** Producción de las esferas de alginato. Efecto de la concentración de alginato

**Tabla 4.4b** Producción de las esferas de alginato. Efecto de la presión de aire

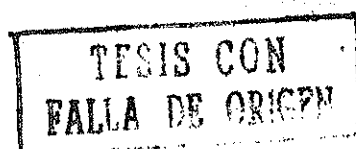
**Tabla 4.4c** Producción de las esferas de alginato. Efecto de la velocidad de alimentación

**Tabla 4.4d** Producción de las esferas de alginato. Efecto de la altura del extrusor

**Tabla 4.5** Efecto de algunos parámetros sobre la fracción vacía y la humedad de las esferas de alginato de calcio

**Tabla 4.6** Constantes cinéticas para la degradación de 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF con las esferas de alginato.

**Tabla 4.7** Resultados de las corridas de biodegradación con la columna empacada de alginato de calcio



- Tabla 4.8** Características fisicoquímicas de los soportes
- Tabla 4.9** Cargas celulares evaluadas para los diferentes soportes
- Tabla 4.10** Características de adsorción de los soportes estudiados
- Tabla 4.11** Caracterización de las mezclas de tezontle
- Tabla 4.12** Resultados de las pruebas de degradación de clorofenoles por separado.  
Remociones, pH y  $UFC/g_{\text{soporte}}$
- Tabla 4.13** Resultados de las pruebas de degradación de clorofenoles por separado.  
Remociones u  $UFC/g_{\text{soporte}}$
- Tabla 4.14** Velocidades de biodegradación o actividades de la columna empacada con tezontle  
en mg/l.día
- Tabla 4.15** Remoción de CF's y COT a las 24 horas de proceso. Concentración de 300 mg/l para  
cada CF
- Tabla 4.16** Biodegradación de las mezclas de clorofenoles
- Tabla 4.17** Experimentos con mezclas de 200 mg/l de fenoles totales
- Tabla 4.18** Resultados de los experimentos con mezclas de 400 mg/l de fenoles totales
- Tabla 4.19** Remociones alcanzadas en el experimento con 600 mg/l de fenoles totales
- Tabla 4.20** Experimentos fallidos con la mezcla de 800 mg/l de fenoles totales
- Tabla 4.21** Constantes cinéticas para la degradación de las mezclas de clorofenoles
- Tabla 4.22** Remoción de toxicidad
- Tabla 4.23** Conteo de la biomasa contenida en la columna empacada
- Tabla 4.24** Fases de operación de la columna empacada con clorofenoles individuales
- Tabla 4.25** Fases de operación de la columna empacada con clorofenoles mezclados
- Tabla 4.26** Resultados de las pruebas de degradación de mezclas de clorofenoles en continuo
- Tabla 4.27** Resultados de las corridas de biodegradación, con respecto a la degradación de  
clorofenoles totales y COT
- Tabla 4.28** Velocidades de biodegradación para los diferentes clorofenoles, concentraciones y  
sistemas de operación
- Tabla 4.29** Eficiencias de remoción (%) alcanzadas para los diferentes compuestos, en función  
del TRH.

**Tabla 4.30** Resultados del análisis estadístico

**Tabla 4.31** Eficiencias de remoción (%) alcanzadas para los diferentes compuestos, en función del TRH

**Tabla 4.32** Resultados del análisis estadístico

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1** Degradación aerobia (A) y anaerobia (B) de fenol. Field *et al.*, 1995
- Figura 2.1** Vías de degradación que pueden evolucionar a clorofenoles
- Figura 2.2** Tipos de inmovilización de células completas
- Figura 3.1** Diagrama general de la metodología empleada en este trabajo
- Figura 3.2** Microfotografía de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* empleada en este trabajo
- Figura 3.3** Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en YPG-agar sólido
- Figura 3.4** Sistema para la elaboración de las esferas de alginato de calcio
- Figura 3.5** Columna de 27 ml empacada con tezontle inoculada con *Pseudomonas fluorescens*
- Figura 3.6** Fermentador de 3.5 litros de capacidad utilizado para generar biomasa
- Figura 4.1** Diagrama de velocidad de corte-viscosidad para las diferentes mezclas alginato/células
- Figura 4.2** Distribución del tamaño de las partículas para las esferas fabricadas bajo diferentes condiciones
- Figura 4.3** Pérdida de humedad *vs* humedad porcentual para una partícula de alginato de calcio
- Figura 4.4** Cinética de degradación de clorofenoles con las esferas de alginato de calcio/células
- Figura 4.5** Cinética de degradación de 2CF
- Figura 4.6** Cinética de degradación de 2,4DCF
- Figura 4.7** Cinética de degradación de 2,4,6 TCF
- Figura 4.8** Carga celular de la columna empacada
- Figura 4.9** Actividad de la columna de tezontle en función de la concentración de compuestos tóxicos
- Figura 4.10** Variabilidad de las pruebas y resultados de la prueba abiótica
- Figura 4.11** Carga biomásica en la columna como una función de la concentración de fenoles en la prueba

- Figura 4.12** Velocidades de biodegradación de la columna como una función de la relación C/N
- Figura 4.13** Valores de COT en función del tiempo de degradación
- Figura 4.14** Cinética de degradación de TF en función del tiempo para las mezclas de 200, 400, 600 y 800 mg/l de clorofenoles totales
- Figura 4.15** Cinética de degradación de COT en función del tiempo para las mezclas de 400, 600 y 800 mg/l de CF
- Figura 4.16** Comparación del crecimiento de las *Pseudomonas fluorescens* en dos fermentaciones de 3 litros
- Figura 4.17** Tiempo *vs* Densidad óptica del 2o proceso de fermentación de 3 litros
- Figura 4.18** Resultados del proceso de fermentación a la escala de 15 litros. Densidad óptica *vs* UFC/ml
- Figura 4.19** Comportamiento de la cantidad de células contenidas en la columna empacada. Cuantificación de la biomasa en medio YPG y King-B
- Figura 4.20** Comportamiento de la cantidad de células contenidas en la columna empacada
- Figura 4.21** Relación de temperaturas máximas y mínimas durante la operación de la columna empacada
- Figura 4.22** Comportamiento de *Pseudomonas* con respecto a la temperatura
- Figura 4.23** Etapas de trabajo de la columna empacada con clorofenoles individuales
- Figura 4.24** Etapas de trabajo de la columna empacada con clorofenoles mezclados
- Figura 4.25** Tiempo de residencia hidráulica *vs* el porcentaje de remoción del 2,4,6-triclorofenol a 500 mg/l
- Figura 4.26** Tiempo de residencia hidráulica *vs* el porcentaje de remoción del 2,4,6-triclorofenol a 300 mg/l
- Figura 4.27** Tiempo de residencia hidráulica *vs* el porcentaje de remoción del 2,4,6-triclorofenol a 100 mg/l
- Figura 4.28** Tiempo de residencia hidráulica *vs* el porcentaje de remoción del 2,4,6-triclorofenol a diferentes concentraciones
- Figura 4.29** Tiempo de residencia hidráulica *vs* el porcentaje de remoción del 2-clorofenol a 500 mg/l

**Figura 4.30** Tiempo de residencia hidráulica *vs* el porcentaje de remoción del 2,4-diclorofenol a 500 mg/l

**Figura 4.31** Tiempo de residencia hidráulica *vs* el porcentaje de remoción del pentaclorofenol a 200 mg/l

**Figura 4.32** Tiempo de residencia hidráulica *vs* el porcentaje de remoción del 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol a 500 mg/l

**Figura 4.33** Tiempo de residencia hidráulica *vs* el porcentaje de remoción de los clorofenoles individuales

**Figura 4.34** Remoción de clorofenoles específicos en función del TRH para una mezcla de 200 mg/l

**Figura 4.35** Remoción de clorofenoles específicos en función del TRH para una mezcla de 400 mg/l

**Figura 4.36** Remoción de clorofenoles específicos en función del TRH para una mezcla de 600 mg/l

**Figura A.1** Metabolismo de degradación para el PCF propuesto para *Pseudomonas sp.*

**Figura A.2** Degradación de cloroaromáticos por las enzimas de *P. putida*

**Figura A.3** Metilación de clorofenoles por *Arthrobacter spp.*

# RESUMEN

El proceso de fabricación del papel, la industria de la piel, la preservación de maderas, así como la fabricación de algunos insecticidas o herbicidas organoclorados generan aguas residuales con altos contenidos de fenol y clorofenoles. Varios sistemas biológicos han sido empleados para el tratamiento de dichas aguas residuales con resultados variables, pero con limitaciones muy importantes en cuanto a las concentraciones máximas a tratar y la generación de lodos que contienen altas concentraciones de tales compuestos. Los sistemas fisicoquímicos presentan altas eficiencias de remoción de fenoles, pero son energéticamente costosos y también pueden generar lodos residuales. En este trabajo se planteó la transformación/mineralización del fenol y clorofenoles por medio de una columna empacada con un soporte muy económico, donde se inmoviliza la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, capaz de llevar a cabo las transformaciones bioquímicas antes mencionadas.

Se demostró que la bacteria *Pseudomonas fluorescens* es capaz de degradar clorofenoles y mezclas de ellos aún en altas concentraciones (hasta 1,000 mg/l para algunos clorofenoles por separado y hasta 600 mg/l para una mezcla de cuatro clorofenoles). Las eficiencias de degradación de clorofenoles solos fueron de por lo menos 95% en promedio. En el caso de las mezclas, las remociones fueron menores y variables. Para el caso de las mezclas de 2,4DCF, 2,4,6TCF, 2,3,4,6TCF y PCF, las eficiencias de remoción como clorofenoles variaron entre 42.7 y 86.6%, para distintos TRH y concentraciones totales de las mezclas.

Las velocidades de biodegradación del 2CF, 2,4DCF, 2,4,6TCF y PCF, cuando se emplearon células libres son del orden de 4.6, 7.1, 3.9 y 3.3 mg/l.día respectivamente, para concentraciones iniciales de 100, 100, 100 y 50 mg/l. Cuando estos mismos compuestos fueron tratados con células inmovilizadas en tezontle y empacadas en una columna operando en lote, las velocidades máximas fueron de 1,779, 1,669, 1,765 y 204 mg/l.día para concentraciones de 400, 500, 400 y 200 mg/l, respectivamente. Si se comparan las velocidades a concentraciones iniciales iguales, se observa que las velocidades se multiplican por factores de 16, 10, 21 y 5, aproximadamente. Cuando los cuatro clorofenoles fueron mezclados y alimentados a la columna en operación por lote, dependiendo de la concentración de la mezcla de clorofenoles, los valores de la velocidad de biodegradación se vieron reducidos sensiblemente.

Cuando se empleó una columna de 5 litros de capacidad, en operación continua y a temperatura ambiente para tratar a los clorofenoles por separado, se encontró que los valores de la velocidad de biodegradación se vieron incrementados con respecto a aquéllos obtenidos para las células libres, pero no mayores que los encontrados al tratar a los compuestos específicos en un sistema inmovilizado trabajando por lotes. El análisis multifactorial de algunos de estos resultados demostró que cuando se tratan clorofenoles por separado en la columna, ni el tipo de compuesto, ni el TRH por sí solos resultan significativos para el valor de la degradación alcanzado, sin embargo, una combinación de ambos factores sí está fuertemente ligado a la degradación alcanzada. Cuando se trata una mezcla de composición constante y con concentración variable a diferentes TRH, los resultados demuestran que la concentración de la mezcla es determinante sobre la biodegradación alcanzada en el sistema en continuo, mientras que el TRH no lo es. La combinación concentración-TRH también afecta el desempeño del reactor de lecho fijo.

A partir de las conclusiones de este trabajo se demuestra que es posible tratar corrientes que contienen uno o más clorofenoles (hasta cuatro, por lo menos) haciendo uso de una columna empacada con tezontle, en donde se ha inmovilizado la bacteria *Pseudomonas fluorescens*. Las concentraciones máximas a tratar por el sistema en el caso de las mezclas es de 600 mg/l. El pH de las corrientes debe estar alrededor de la neutralidad, y la temperatura ambiente puede oscilar entre 9 y 28°C. El TRH que se requerirá es de alrededor de 15 horas. La adición de nitrógeno al efluente a tratar, mejora el desempeño de la columna empacada. La cantidad de células bacterianas debe estar en el intervalo de  $1E04$  a  $1E08$  UFC/g<sub>soporte</sub>. Con este sistema se esperan eficiencias de degradación de entre 43 y 86%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ABSTRACT

Paper fabrication process, leather industry, woods preservation, as well as some organo-chlorinated insecticides or herbicides manufacturing generate wastewaters with high phenol and chlorophenols content. Several biological systems have been employed for those waste water's treatment, with variable results, but with important limitations regarding the maximum concentrations to treat and the sludge with high compound concentrations generation. Physical-chemical processes show high phenol removal efficiencies, but they are energetically expensive and they can generate residual sludges. In this work it was proposed the transformation/mineralization of phenol and chlorophenols using a column packed with a low-cost material, where the bacteria *Pseudomonas fluorescens*, capable of those biochemical transformations, was previously immobilized.

*Pseudomonas fluorescens* was capable of degrading chlorophenols and chlorophenols mixtures, even at high concentrations. (up to 1,000 mg/l for some single chlorophenols and up to 600 mg/l for a 4-chlorophenols mixture). Single chlorophenols degradation efficiencies were at least of 95% in average. For mixtures, degradation efficiencies were lower and quite variable. For the 2,4DCPh, 2,4,6TCPh, 2,3,4,6TeCPh and PCPh mixtures removal efficiencies as chlorophenols were in the range of 42.7 and 86.6%, for different HRT and mixture total concentrations.

2CPh, 2,4DCPh, 2,4,6TCPh and PCPh biodegradation rates for free cells were in the range of 4.6, 7.1, 3.9 and 3.3 mg/l.day respectively, for initial concentrations of 100, 100, 100 and 50 mg/l. When the same compounds were treated with the immobilized cells in tezontle and packed into a column which operating batchwise, the maximum degradation rates were as much as 1,779, 1,669, 1,765 and 204 mg/l.day for the initial compound concentrations of 400, 500, 400 and 200 mg/l, respectively. If degradation rates are compared at same initial concentrations, it is observable that degradation rates are multiplied by 16, 10, 21 and 5 fold, approximately. When the four chlorophenols were mixed and fed to a batch operation column working at environmental temperature, biodegradation rates values were reduced definitely, as a function of the chlorophenols mixture initial concentration.

When a 5 litres column was employed for the treatment of single chlorophenols streams, batchwise and at environmental temperature, it was found that the biodegradation rate values were incremented in respect to those values found for free cells. These values depend on the toxic compound, the initial concentration, and the HRT. A multifactorial analysis of these results indicated that when single chlorophenols streams are treated in the column, neither the compound type, nor the HRT were statistically significant for the biodegradation value. Nevertheless, a combination of both compound type and HRT value is tightly related to the reached degradation values.

When a given chlorophenols mixture at different total concentrations is treated in the column at different HRT values, the results showed that the total initial concentration determines the degradation level, while HRT does not. The initial concentration-HRT combination also affected the fixed bead column development.

From this work conclusion's it was shown the possibility of treating single chlorophenols or chlorophenols mixtures (up to four compounds) using a tezontle packed column where *Pseudomonas fluorescens* was previously immobilised. Maximum total chlorophenol mixture concentration is 600 mg/l. pH values for the stream must be around neutrality, and environmental temperature must be between 9 and 28°C. The optimum HRT value is around 15 hours. Nitrogen addition will enhance sensibly the packed column development. The amount of bacterial cells must be between  $1E04$  and  $1E08$  CFU/g<sub>suspense</sub>. Using this system, efficiencies between 43 and 86% are expected.



## ABREVIATURAS

2,3,4,6TeCF	2,3,4,6 tetraclorofenol
2,4,5TCF	2,4,5 triclorofenol
2,4,6TCF	2,4,6 tricloro fenol
2,4DCF	2,4 dicloro fenol
2,4DMF	2,4 dimetilfenol
2,4DNF	2,4 dinitrofenol
2NF	2-nitrofenol
3CF	3 clorofenol
4,6DNoC	4,6-dinitro-o-cresol
4CF	4 clorofenol
4NF	4-nitrofenol
AE	aerobios heterótrofos
APTS	ácido <i>p</i> -toluensulfónico
C	concentración en el equilibrio
CAS	American Chemical Society Register System
C/N	relación carbono-nitrógeno
CB	diclorobifenilo
CBA	clorobifenilos
CHQ	clorohidroquinona
CF	concentración de clorofenoles
Cfo	concentración de clorofenoles inicial
CFT	clorofenoles totales
CIPR	Comisión Internacional para la Protección del Río Rhin
Conc	concentración
COT	carbón orgánico total
COTo	carbón orgánico total inicial
DBO	demanda bioquímica de oxígeno
DCB	diclorobenceno
DH/dt	velocidad de pérdida de humedad
DQO	demanda química de oxígeno
DCHQ	diclorohidroxiquinona
DOT	Department of Transportation USA
DRFC	fuerzas centrífugas relativas
EC50	dosis letal media
EPA	agencia de protección ambiental

F	fenol
FM	<i>Fathead minnow</i> (trucha arcoiris)
FT	fenoles totales
Hum	humedad
k1	constante de la ecuación cinética para concentración de clorofenol
k2	constante de la ecuación cinética para concentración de COT
K	constante de la ecuación de Freundlich
K	índice de consistencia
LA	lodos activados
M	masa de material adsorbente
ME	metanógenos
MT	microtox
n	constante de la ecuación de Freundlich
n	índice de flujo
N	Newtons
NE	no evaluada
NI	<i>Nitrosomonas</i>
NR	no reportado
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pa	pascales
PCB	policlorobifenilos
PCF	pentacloro fenol
pCMC	<i>p</i> -cloro- <i>m</i> -cresol
PM	peso molecular
Q	velocidad de alimentación
r	factor de correlación
SAS	sodio-sulfonato de antraquinona
TeCHQ	tetraclorohidroquinona
TeCBQ	tetraclorobenzoquinona
TCHQ	triclorohidroquinona
TCHBQ	tricloro hidroxibenzoquinona
TCE	tricloroetileno
TRH	tiempo de residencia hidráulica
UFC	unidades formadoras de colonias
UMA	unidades de masa atómica
UT	unidades de toxicidad
V	volumen del reactor
VBD	velocidades de biodegradación
VBD específica	velocidad de biodegradación específica
X	cantidad de sustrato adsorbido
YPG	extracto de levadura, peptona de caseína y glucosa

# HIPÓTESIS

## Considerando que:

- El uso de sistemas biológicos con cepas puras ha sido exitoso para el tratamiento de corrientes acuosas que contienen compuestos tóxicos.
- *Pseudomonas fluorescens* es una bacteria con capacidad metabólica para degradar fenol y clorofenoles.
- Los sistemas de biomasa fija se caracterizan por su alta eficiencia para degradar materia orgánica en volúmenes menores de reactor en comparación con los sistemas de biomasa suspendida.
- Los sistemas de biomasa fija se consideran idóneos para el tratamiento de corrientes tóxicas, por el desarrollo de condiciones que protegen a los microorganismos de compuestos altamente tóxicos.

## Se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

La bacteria *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada en el soporte adecuado es capaz de tratar corrientes acuosas que contienen clorofenoles o mezclas de ellos, aún en altas concentraciones (en el orden de cientos de miligramos por litro).

Por lo que se establece el siguiente :

## OBJETIVO

Demostrar la factibilidad de degradar/transformar altas concentraciones de clorofenoles y mezclas de ellos, por medio de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, inmovilizada en un soporte adecuado.

### Metas específicas

- a. Estudiar los aspectos bioquímicos y microbiológicos de *Pseudomonas fluorescens*, relacionados con la transformación/degradación de clorofenoles (2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol, y pentaclorofenol específicamente).
- b. Evaluar las condiciones para la producción masiva de células de *P. fluorescens*, así como para la inoculación del reactor en donde se pondrán en contacto las soluciones de clorofenoles y el catalizador previamente elaborado (columnas empacadas con distintos volúmenes de trabajo).
- c. Determinar el soporte más adecuado para la inmovilización de *Pseudomonas fluorescens*, comparando las propiedades de algunos soportes (arena, carbón activado, alginato de calcio y tezontle) y métodos de inmovilización (por atrapamiento y adsorción).
- d. Evaluar la transformación/degradación de los clorofenoles en una columna empacada operando en lote, a temperatura controlada para definir las máximas concentraciones de los compuestos en las soluciones y el efecto de algunos parámetros tales como la temperatura, el pH, y la relación C/N.
- e. Evaluar la transformación/degradación de mezclas de los clorofenoles en una columna empacada operando en lote, a temperatura controlada. Evaluar la toxicidad de las mezclas de clorofenoles antes y

después del tratamiento. Así mismo, medir la mineralización de las mezclas de clorofenoles, como la disminución del COT.

f. Evaluar la transformación/degradación de los clorofenoles en una columna empacada operando en continuo, a temperatura ambiente. Determinar el efecto del tiempo de residencia hidráulica y la concentración de los compuestos sobre la transformación/degradación de los compuestos.

g. Determinar el efecto del tiempo de residencia hidráulica y la concentración total de la mezcla sobre la transformación/degradación de los compuestos. y medir la mineralización de los clorofenoles en el sistema en continuo a temperatura ambiente.

# 1. INTRODUCCIÓN

México produce aproximadamente tres millones de barriles de petróleo crudo diariamente (PEMEX, 1997). Se calcula que por cada 10,000 barriles refinados se producen casi 100 kg de fenoles (Nemerow, 1987), por lo que habría alrededor de 30 toneladas diarias de fenoles en nuestro país procedentes de esta actividad industrial, distribuidas en productos, subproductos y emisiones al ambiente.

La Industria Química también es otro giro importante que genera fenoles. Además de la petroquímica básica, la fabricación de sustancias químicas básicas, fibras sintéticas, plástico y sus derivados así como la industria farmacéutica y la rama del hule, también generan fenoles. Tan sólo la petroquímica básica produjo casi 25,000 toneladas de fenoles como producto intermedio en 1994 (INEGI, 1995).

El proceso de fabricación de papel, y en particular las etapas de cocción y blanqueo de pulpa, genera aguas residuales con altos contenidos de fenol y clorofenoles. La industria de la piel, la preservación de maderas y la fabricación de algunos insecticidas o herbicidas organoclorados (*i.e.* el ácido 2,4 diclorofenoxiacético), también conducen a la liberación de este tipo de tóxicos en aguas residuales.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (*Environmental Protection Agency*, USEPA) desarrolló una lista de compuestos tóxicos prioritarios para agua que comprende un centenar de compuestos divididos en 11 familias químicas (policíclicos, metales pesados, hidrocarburos lineales, etc.). Una de ellas es la de los fenoles, que abarca el fenol (F), el 2-clorofenol (2CF), el 2,4-diclorofenol (2,4DCF), el 2,4,6-triclorofenol (2,4,6TCF), el pentaclorofenol (PCF), el 2-nitrofenol (2NF), el 4-nitrofenol (4NF), el 2,4-dinitrofenol (2,4DNF), el p-cloro-m-cresol (pCMC), el 4,6 dinitro-o-cresol (4,6DNoC) y el 2,4-dimetilfenol (2,2DMF). Otras organizaciones ambientales y de salud como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comisión Internacional para la Protección de Río Rhin (CIPR), han desarrollado también sus propias listas de compuestos tóxicos prioritarios y consideran como sustancias tóxicas al fenol y al PCF (OMS), mientras que la CIPR considera al 2CF, el 3-clorofenol (3CF), el 4-clorofenol (4CF),

## 1. Introducción

el 2,4DCF, el 2,4,5TCF, el PCF, y el pCMC . La razón de ello es que los clorofenoles son compuestos altamente tóxicos. En la tabla 1.1 se observan los resultados obtenidos en diferentes pruebas de toxicidad para algunos derivados de sustancias fenólicas. Entre las pruebas que se utilizaron están el uso de peces, como el *Fathead minnow*, el uso de pruebas que emplean bacterias específicas, como *Vibrio fischeri* (Microtox) y *Nitrosomonas* y el uso de mezclas complejas de microorganismos, como las pruebas con metanógenos, aerobios heterótrofos y sistemas de lodos activados.

**Tabla 1.1. Valores de toxicidad para el fenol y algunos derivados fenólicos, como dosis letal media (EC50), en mg/l.**

Compuesto/ Prueba	FM	MT	NI	ME	AH	LA*
F	34	18	21	2,100	1,100	520
2CF	11	18	2.7	160	360	NR
2,4DCF	6.7	2	0.79	63	NR	NR
2,4,6TCF	0.8	1.9	7.9	16	NR	NR
PCF	(0.09) <sup>a</sup>	(0.735) <sup>a</sup>	0.06	0.04	NR	2.6
4CF	NR	0.95	0.73	270	98	NR
2NF	100	21	11	12	11	72
4NF	27	6.4	2.6	4	160	NR
2,4DNF	NR	NR	NR	0.01	NR	110
2,4DMF	NR	NR	0.78	890	440	190

FM, Fathead minnow; MT, Microtox; NI, nitrosomonas; ME, metanógenos; AH, aerobios heterótrofos; LA, lodos activados, NR, no reportado; <sup>a</sup> calculado por medio de la correlación establecida.

Referencia: Blum y Speece, 1991, excepto \*; de Volskay y Grady (1988)

De la revisión de esta tabla se concluye que los compuestos clorofenólicos presentan altos valores de toxicidad (*i.e.*, bajos valores de EC50, en el orden de 0.735 a 21 mg/l), con excepción de los sistemas anaerobios, poco comunes en los sistemas acuáticos. También es importante resaltar que los efectos medidos pertenecen a los conocidos como toxicidad aguda, ya que la toxicidad crónica se evalúa por otros métodos.

En la tabla 1.2, se muestra un resumen de los límites máximos permisibles en cuanto a fenol y clorofenoles, para sus diferentes usos. En todos los casos el nivel de concentración de la sustancia tóxica permitido es súmamente bajo (0.00003-0.3 mg/l).

Por otra parte, esta tabla resalta que los límites para los diferentes compuestos fenólicos para abastecimiento potable, sean como sigue: el fenol se permite en una concentración 10 veces mayor que

## 1. Introducción

el 2-clorofenol y el 2,4-diclorofenol. Éstos a su vez, en tres veces el límite permitido para el 2,4,6-triclorofenol. Finalmente, el triclorofenol presenta un límite de concentración 30,000 veces mayor que la del pentaclorofenol, relaciones de valores que no tienen fundamento alguno.

**Tabla 1.2. Calidad requerida para usos de agua en México, . Los valores están en mg/l**

Compuesto	Fuente de abastecimiento de agua potable	Recreativo contacto primario	Protección de la vida acuática dulce	Protección de la vida acuática marina
Fenol	0.3	0.001	0.1	0.06
2 CF	0.03	NR	0.04	0.1
2,4 DCF	0.03	NR	0.02	NR
2,4,6 TCF	0.01	NR	0.01	NR
PCF	0.00003	NR	0.00004	0.00004

Fuente : Criterios ecológicos de calidad del agua publicados en el Diario Oficial de la Federación del 13 de diciembre de 1989.

NR, no reportado.

En la tabla 1.3, se muestran algunos efluentes industriales que contienen fenol y clorofenoles, reportados en la literatura y específicamente en la base de datos del Risk Reduction Engineering Laboratory (RREL) de la USEPA. A pesar de que se cuenta con poca información, de la tabla anterior se puede destacar que los giros industriales relacionados con la generación de este tipo de compuestos son la refinería, tintorerías, conversión del carbón, pinturas, industria químico-farmacéutica, e industria del papel y la madera, entre otras. Las concentraciones de los compuestos en estudio van de 0.1 a 6,000 mg/l, aunque las concentraciones típicas se encuentran en el intervalo de 0.1 a 312 mg/l. Valores que demuestran la posibilidad de hallar elevadas concentraciones en las descargas.

En la tabla 1.3. se muestra el criterio de uso de agua permitido para cada tipo de clorofenol, así como la eficiencia necesaria para alcanzar ese límite en cada caso. Las eficiencias requeridas oscilan entre 95 y 99.99% para el fenol; 83 y 99 para el 2-clorofenol, 70 y 99.9% para el 2,4-diclorofenol; 63 y 99.99% para el 2,4,6-triclorofenol y 50-99.9% para el pentaclorofenol.

La biodegradación de xenobióticos tóxicos y recalcitrantes es una alternativa realista para el control de la contaminación . Ocurre debido a la capacidad de los microorganismos para metabolizar la materia orgánica mediante sistemas enzimáticos y producir dióxido de carbono, agua y energía (si se realiza en ambiente aerobio). Existe un gran número de moléculas que son susceptibles de ser



## 1. Introducción

biodegradadas por consorcios microbianos o cepas puras en ambientes aerobios, anaerobios o anóxicos (Torres *et al.*, 1997c). La bacteria que se emplea en este estudio fue aislada de sedimentos marinos y caracterizada preliminarmente como capaz de degradar fenoles y ácido 2,4-dicloro fenoxiacético (2,4D). Una de las primeras tareas de este estudio fue el corroborar la capacidad metabólica de la bacteria.

El estudio de la degradación de fenol y clorofenoles por medio de un sistema de biomasa fija, empleando la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, es importante *per se*, ya que dichos compuestos tienen una presencia importante en las aguas residuales de varias industrias de importancia para el país muy especialmente la industria petroquímica, como se ha comentado.

Por otro lado, la familia de los fenoles se ha constituido como un modelo interesante de estudio en cuanto al tratamiento de corrientes que contienen compuestos tóxicos. La determinación de la factibilidad y las condiciones generales del proceso facilitará la comprensión del fenómeno aplicado a cualesquiera otros compuestos tóxicos de interés.

Una forma ventajosa para hacer uso de esta capacidad, es la inmovilización de las bacterias. Los biocatalizadores pueden definirse como células, enzimas u organelos microbianos localizados en una región definida, que retienen sus actividades catalíticas y pueden usarse en forma repetida. Las principales formas de inmovilización son: la adsorción en un soporte inerte y el atrapamiento en una matriz polimérica. Los catalizadores han sido ampliamente usados en las industrias farmacéutica, química y de los alimentos. Algunas de estas herramientas han sido poco utilizadas en el tratamiento de aguas residuales industriales, aunque existen algunos antecedentes en la literatura (Beltran *et al.*, 1997). El presente trabajo analiza la aplicación de diferentes tipos de soportes para fijar la bacteria seleccionada y llevar a cabo la degradación/transformación de fenol y clorofenoles.

En cuanto a las principales vías de degradación del fenol y los clorofenoles, se puede decir que la primera clasificación de la vía metabólica es la que comprende la vía aerobia y la vía anaerobia. En la figura 1.1, se muestran los diagramas de dichas vías aerobia (A) y anaerobia (B) (Field *et al.*, 1995).

Un aspecto que vale la pena resaltar, es el hecho de que mucho se ha discutido en la literatura la conveniencia del tratamiento de fenol y clorofenoles por una u otra vía. Los trabajos de Field *et al.*, 1995 han sugerido que quizás la mejor opción sería la combinación de dos etapas (anaerobia y aerobia), para maximizar la degradación de tales compuestos. Este trabajo se limita al estudio de la fase aerobia,

## 1. Introducción

con el objeto de conocerla a fondo y llegar hasta las condiciones de operación idóneas para el proceso para la degradación de los clorofenoles y sus mezclas .

**Tabla 1.3. Concentraciones de fenol y clorofenoles en algunos efluentes industriales.**

Sustancia Tóxica	Fuente	Concentración, mg/l	Criterio de uso de agua para suministro mg/l	Eficiencia requerida, %	Referencia
Fenol	Tintorerías	129	0.3	98.33	Tyagi y Vembu ,1990
Fenol	Conversión de carbón	6,000	0.3	99.99	Singer <i>et al.</i> ,1977 Singer y Yen,1980
Fenol	Ind. Quim. Farm.	17	0.3	98.23	RREL,1994
Fenol	PEMEX	6,000	0.3	99.99	Comunic. personal,1996
2CF	Ind. Quim	0.178	0.03	83.14	RREL,1994
2CF	<i>Superfund</i>	0.54	0.03	94.44	RREL,1994
2CF	Ind química	4.2	0.03	99.28	RREL,1994
2,4DCF	Ind. papel	0.1	0.03	70	RREL,1994
2,4DCF	Aguas subterráneas	0.145	0.03	79.31	RREL,1994
2,4DCF	Ind. Química	312	0.03	99.19	RREL,1994
2,4DCF	Ind. Quim.	12.9	0.03	99.76	RREL,1994
2,4DCF	Ind.Elect.	23.75	0.03	99.87	RREL,1994
2,4,6TCF	Ind. Pulpa	0.027	0.01	62.96	Haggblom y Salkinojia,1991
2,4,6TCF	Ind. Quim.	0.05	0.01	80	RREL,1994
2,4,6TCF	Agua subterr.	0.88	0.01	98.86	RREL,1994
2,4,6TCF	Ind. Quim	0.77	0.01	98.70	RREL,1994
2,4,6TCF	Ind. Quim.	135	0.01	99.99	RREL,1994
PCF	Ind. pulpa	17.81	0.03	99.83	Ibarra y Rodríguez,1993
PCF	Ind. Quim.	2.88	0.03	98.25	RREL,1994
PCF	Ind. Quim.	4	0.03	98.95	RREL,1994
PCF	Ind. madera	3.4	0.03	99.11	RREL,1994

## 1. Introducción

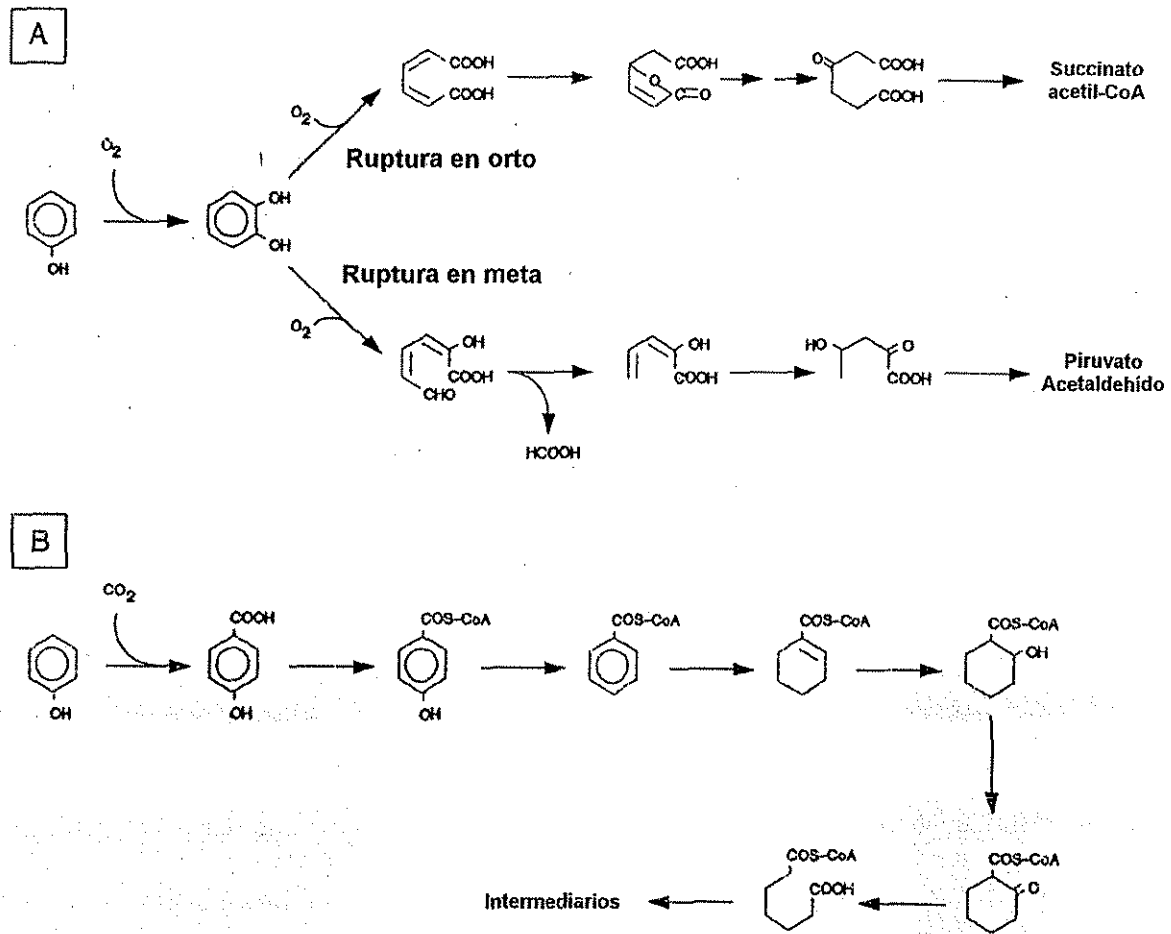


Figura 1.1. Degradación aerobia (A) y anaerobia (B) del fenol. Field *et al.*, 1995.

Para cumplir con los objetivos planeados al inicio de la tesis, se desarrollan los siguientes capítulos:

En el capítulo 2, se presentan algunas características del fenol y los clorofenoles, los soportes más comunes para la inmovilización de células, las vías de degradación de los clorofenoles y otros conceptos importantes para entender el desarrollo del trabajo. También se presenta un estado del arte en la biodegradación de compuestos tóxicos por medio de sistemas de biomasa fija, con el objeto de definir las oportunidades de aportación de este trabajo. En el tercer capítulo se discute la forma en que

## 1. Introducción

se pretende confrontar la hipótesis general del trabajo. Se mencionan las diferentes etapas experimentales del proyecto y se describen uno a uno los materiales y metodologías utilizadas.

Los principales resultados del trabajo se presentan de forma cronológica, tabulados y graficados en el capítulo 4 de manera que se destaque la aportación de este proyecto. También se discuten las concordancias y discordancias existentes entre lo encontrado aquí y lo descrito en los trabajos publicados en la presente década en libros y revistas de circulación internacional.

En el capítulo 5 se resumen las aportaciones del trabajo. También se mencionan algunas recomendaciones en cuanto a las líneas de investigación futura.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Características generales del fenol y los clorofenoles

El fenol y los clorofenoles son usados como materia prima para la elaboración de otros productos. Por ejemplo, de explosivos, fertilizantes, pinturas, resinas, textiles, drogas, perfumes, baquelita y jabones. Además, el 2,4,6TCF y el PCF se utilizan como germicidas, bactericidas y conservadores de madera, en tanto que el PCF es un conocido defoliante.

Los fenoles y sus derivados clorados son conocidos como desechos peligrosos y algunos tienen características de sustancias peligrosas y/o carcinogénicas. En la tabla 2.1 se muestran las principales características del fenol y los clorofenoles abordados en este estudio. En la sexta columna de dicha tabla se presentan los valores máximos recomendados para la protección de la vida acuática dulce, salada, así como para la protección de la salud humana (García, 1992). En algunos casos se hace la distinción entre los valores de toxicidad crónica y toxicidad aguda.

### 2.2 Mecanismos de degradación

En el anexo A se presentan los mecanismos propuestos para la degradación del mono-, di- y triclorofenol por un lado y para el pentaclorofenol, por el otro. Cabe destacar que muchos otros compuestos tóxicos cuando se degradan, son transformados en clorofenoles, por lo que el estudio de la degradación de estos compuestos contribuye al estudio de su remoción (figura 2.1). Los clorofenoles derivan en cloroanisoles o clorocatecoles que -aunque en menor grado- siguen siendo tóxicos. De ahí la importancia de encontrar un método que transforme a todos los compuestos anteriores en sustancias que no constituyen un problema para el medio ambiente o la salud humana.

## 2. Antecedentes

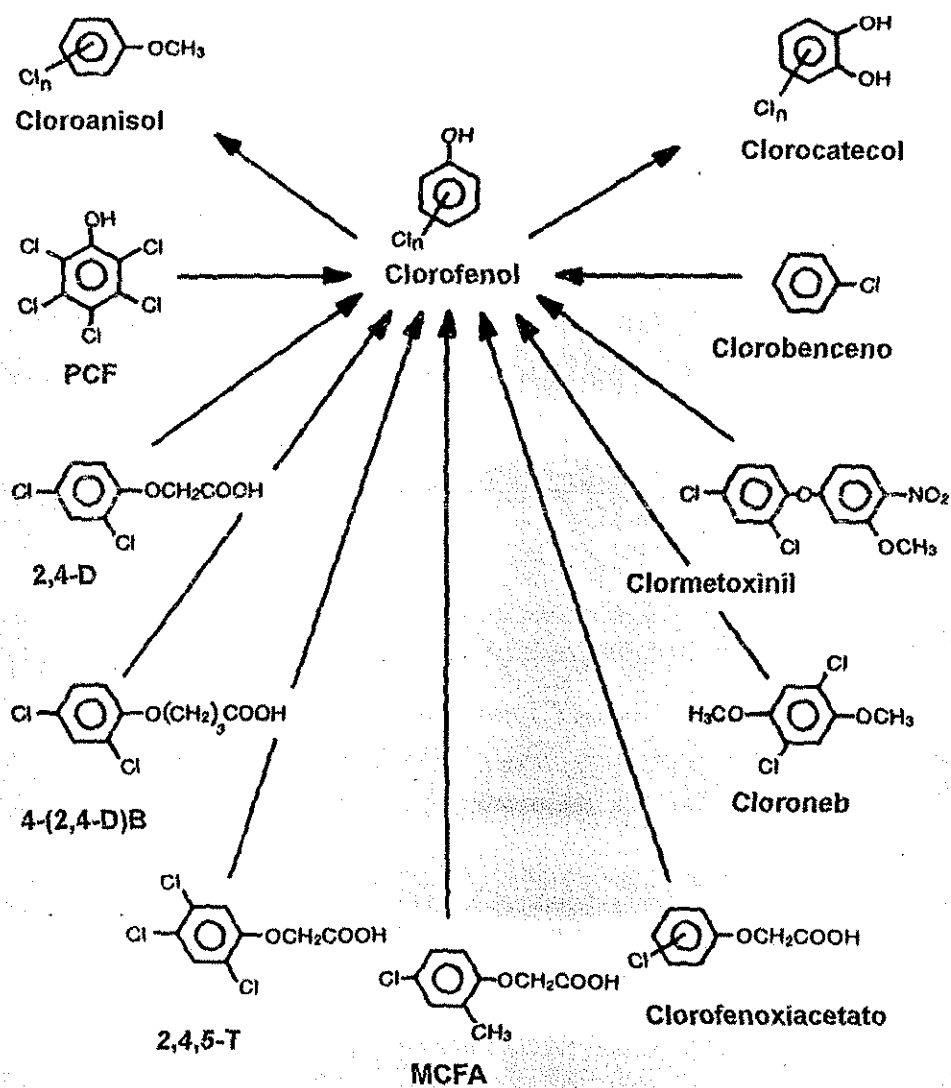


Figura 2.1. Vías de degradación que pueden evolucionar a clorofenoles.  
Referencia: Rochkind-Dubinsky *et al.*, 1987.

## 2. Antecedentes

Tabla 2.1 Características toxicológicas del fenol y algunos clorofenoles.

Com-puesto tóxico	Peso Molecular	Otros nombres	Clasificación	Designación DOT	Límite máximo recomendado	Número de código CAS
F	94.11	Hidroxiben-ceno Ac. Fénico Ac. Fenílico	Desecho peligroso, Sustancia peligrosa	Veneno B	10.20 mg/l ta <sup>a</sup> 2.56 mg/l tc <sup>a</sup> 5.80 mg/l ta <sup>b</sup> 3.50 mg/l <sup>c</sup>	CAS-108-95-2
2CF	128.56	o-DCP	Desecho peligroso	Debe contener el símbolo (X)	4.38 mg/l ta <sup>a</sup> 0.1x10 <sup>-3</sup> mg/l <sup>c</sup>	CAS-95-97-8
2,4 DCF	163.0	2,4DCP	Desecho peligroso		2.02 ml ta <sup>a</sup> 3.65 mg/l tc <sup>a</sup> 3.090 mg/l <sup>c</sup>	CAS-120-83-2
2,4,6 TCF	197.45	2,3,4TCD Dowcid25	Carcinógeno potencial, Sustancia peligrosa, Desecho peligroso	ORMA	0.97 mg/l tc <sup>a</sup> 1.2x10 <sup>-2</sup> mg/l <sup>c</sup>	CAS-88-06-2
PCF	266.35	Dowcid EC-7 Dowcid-G Monsalvo Penta-Penclorol	Sustancia peligrosa, Desecho peligroso	ORM-E	5.5x10 <sup>-2</sup> mg/l ta <sup>a</sup> 3.2x10 <sup>-2</sup> mg/l tc <sup>a</sup> 5.3x10 <sup>-2</sup> mg/l ta <sup>b</sup> 3.4x10 <sup>-2</sup> mg/l tc <sup>b</sup> 1.01 mg/l <sup>c</sup>	CAS-608-93-5

<sup>a</sup> protección de la vida acuática dulce, tc-toxicidad crónica, ta-toxicidad aguda, Ac-ácido.

<sup>b</sup> protección de la vida acuática salada

<sup>c</sup> protección de la salud humana

Adaptado de: García (1992)

### 2.3 *Pseudomonas fluorescens*

El género *Pseudomonas* comprende bacterias rectas o ligeramente curvadas, no helicoidales, con dimensiones de 0.5-1.0 x 1.5-5.0 micras. Muchas especies pueden acumular poli-(hidroxibutirato como reserva de fuente de carbón. No se conocen estados de latencia en bacterias de este género. Son células Gram negativas cuya movilidad se da a través de uno o varios flagelos.

Además, las *Pseudomonas* son aerobias con metabolismo respiratorio estrictamente aerobio con el oxígeno como aceptor final de electrones. En algunos casos el nitrato también puede ser utilizado como aceptor alternativo, permitiendo el crecimiento en condiciones anóxicas. La mayor parte de

## 2. Antecedentes

las especies no crecen en condiciones de acidez, no requieren factores orgánicos de crecimiento, son oxidasa positivas o negativas, catalasa positivas y quimiorganotróficas. Algunas especies son quimiolitótrofas, capaces de usar hidrógeno o monóxido de carbono como fuente de energía. Algunas especies son patógenas de humanos, animales o plantas.

Las especies más conocidas del género son: *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. caryophylli*, *P. chloraphis*, *P. putida* y *P. fluorescens*. En el caso de *P. fluorescens* se han reportado cinco biovars importantes (del I al V), que difieren entre sí por características como la producción de pigmentos, fitopatogenicidad, rutas de degradación del protecahuate, la formación de levana, la utilización de azúcares específicos y la presencia de la enzima lecitinasa (Holt *et al.*, 1994).

El género *Pseudomonas* ha sido mencionado en la literatura por su abundancia e inocuidad en general, así como por sus interesantes capacidades metabólicas. Algunos de los sustratos que se han reportado que degrada exitosamente son: plaguicidas, herbicidas del tipo organofosforados, ácido 2,4-dicloro fenoxiacético, ácido piperonílico, fenol, 4-clorofenol, 3,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,5,6-tetraclorofenol, pentaclorofenol, 1,4-diclorobenceno, 3-diclorobenzoato, 3-metilbenzoato, polietilenglicoles, tolueno, p-xileno, benceno, clorobenceno, etanol, butanol, octanol, 2,4-dinitrotolueno, y cloro-alilcohol (Torres *et al.*, 1997a).

### 2.4 Soportes disponibles para la inmovilización de células degradadoras de compuestos

Los métodos de inmovilización más usados para enzimas y células completas son:

- Por atrapamiento
- Por enlace

Entre los primeros encontramos al atrapamiento en una matriz y la microencapsulación. Entre los segundos, a la inmovilización por adsorción, por unión al soporte y por entrecruzamiento (ver figura 2.2) En la tabla 2.1. Se muestran algunos de los sistemas mencionados en la literatura, tanto como para bacterias como para mezclas de ellas en la degradación de compuestos específicos.



## 2. Antecedentes

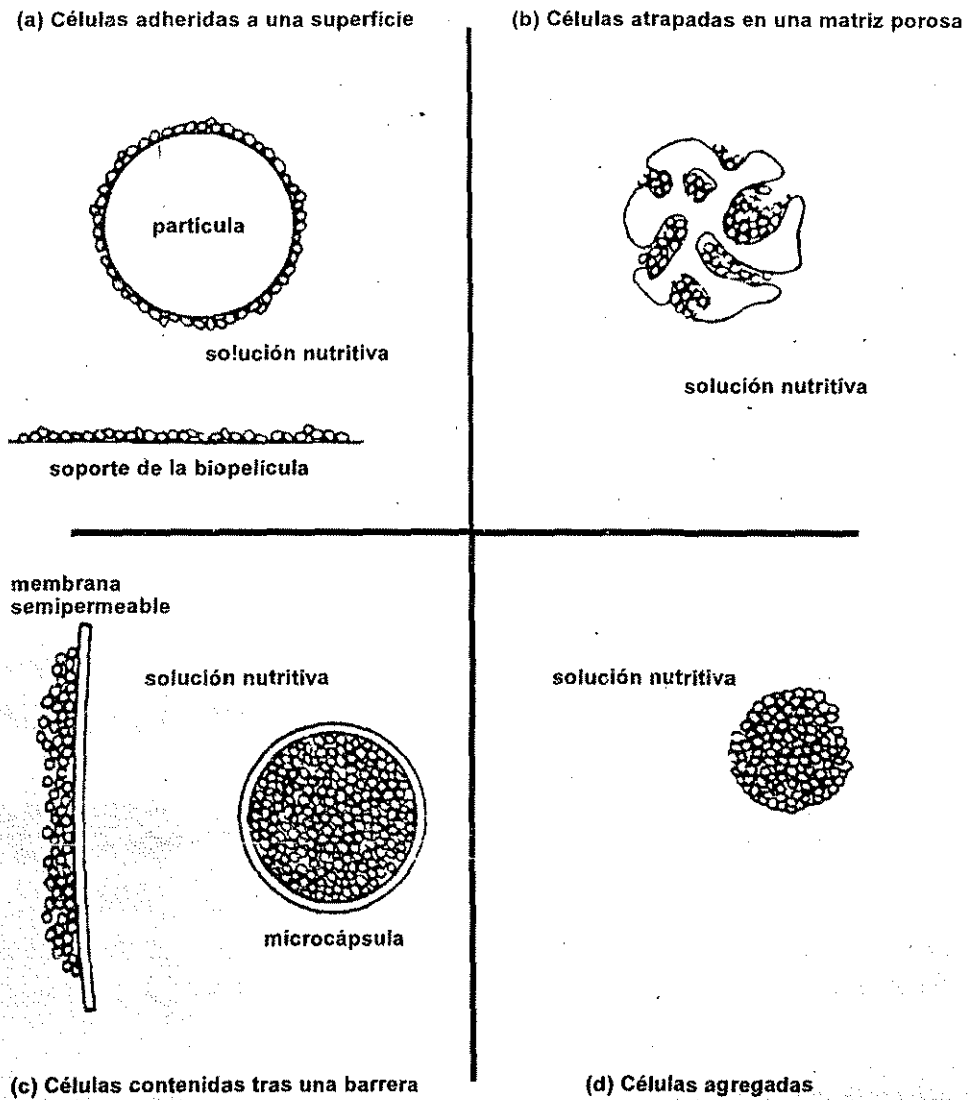


Figura 2.2. Tipos de inmovilización de células completas.

Fuente: Karel *et al.*, 1985.

Recientemente, el atrapamiento de células en polímeros naturales ha despertado el interés en su aplicación. El uso de las soluciones de polímeros lleva a la problemática de entender el comportamiento de flujo de dichas soluciones, es decir, sus características reológicas.

## 2. Antecedentes

Tabla 2.2. Matrices utilizadas para la inmovilización de bacterias puras o mezclas.

Matriz	Referencia
<b>Soportes rígidos naturales:</b>	
Agregados de arcilla granulada	Westmeier y Rehm (1987)
Arcilla granular	Belfanz y Rehm (1991)
Madera	Armentnte <i>et al.</i> (1992)
Vidrio	Morsen y Rehm (1990)
Arena	Belfanz y Rehm (1991), Silva y Campos (1996)
Cerámica	Hendricksen <i>et al.</i> (1991), Fava <i>et al.</i> (1996), Seignez <i>et al.</i> (1993)
Sílica	Puhakka <i>et al.</i> (1991), Armenante <i>et al.</i> (1992)
Celita	Anselmo <i>et al.</i> , (1989), Puhakka <i>et al.</i> , (1992), <i>ibidem</i> (1995)
Carbón activado	Ehardt y Rehm (1985), Morsen y Rehm (1987), Ehardt y Rehm (1989), Morsen y Rehm (1990)
<b>Polímeros naturales:</b>	
Alginato de calcio	Westmeier y Rehm (1985), Kewelo <i>et al.</i> (1989), Zache y Rehm (1989), Lee <i>et al.</i> (1994), Bae <i>et al.</i> (1997)
Quitosán-alginato	Zache y Rehm (1989)
<b>Polímeros sintéticos:</b>	
Espuma de poliuretano	Anselmo y Novais (1992)
Poliacrilamida-hidracida	Bettman y Rehm (1985)
Soportes estructurados de plástico	Seignez <i>et al.</i> , (1993)
Mezcladores estáticos de plástico	Khlevnikov y Peringer (1996)

### 2.5 Reología de las soluciones de polímeros naturales

Las soluciones de polímeros naturales, tales como el alginato de sodio, la carragenina, la dextrana, la levana, la goma xantana, el algarrobo, la gelatina, etc. presentan un comportamiento reológico complejo, esto es, un comportamiento no-Newtoniano (la viscosidad es una función de la temperatura, la velocidad de deformación y/o el tiempo). La relación viscosidad-velocidad de deformación para muchos de estos fluidos puede ser descrita por modelos sencillos como la ecuación de Ostwald de Weale (o ley de la potencia), la ecuación de Carreau, y la ecuación de Casson, entre otras. La ecuación más sencilla de éstas, es la que establece la ley de potencia

$$\mu = K \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

## 2. Antecedentes

Por definición

$$\mu = \tau / \gamma \quad (2)$$

entonces

$$\mu = K \gamma^{n-1} \quad (3)$$

donde

$\tau$  : esfuerzo cortante en Pa

K : índice de consistencia en  $N s^n m^{-2}$

$\gamma$  : velocidad de deformación en  $s^{-1}$

n : índice de flujo, adimensional

### 2.6 Biodegradación de compuestos tóxicos por medio de sistemas de biomasa fija

Varios trabajos han sido reportados en los últimos años relativos al uso de microorganismos específicos inmovilizados en soportes diversos (en sistemas denominados filtros aerobios sumergidos). Entre los más interesantes se encuentran los que a continuación se detallan y que se resumen en la tabla 2.3 y 2.4 y 2.5:

Bettman y Rehm (1985) emplearon la bacteria *Pseudomonas putida* inmovilizada en el polímero sintético poli(acrilamida-hidrazida) para el tratamiento de corrientes sintéticas que contenían fenol en concentraciones de 1,000 a 5,000 mg/l. Ellos trabajaron con un reactor tipo *air-lift* de 900 ml de capacidad total y 100 ml de soporte. En cierta etapa del proceso continuo, se adicionaron de 25 a 65 mg/l de 4-clorofenol o 30 mg/l de o,m,p cresoles. Estos autores concluyeron que para los experimentos en condiciones estériles, se pueden alcanzar tasas de degradación de hasta 7,200 mg/l.día, mientras que para condiciones no-estériles, las máximas tasas encontradas fueron de alrededor de 3,120 mg/l.día. El 4-clorofenol y el cresol adicionados fueron consumidos totalmente durante la experiencia.

## 2. Antecedentes

**Tabla 2.3 Resumen de los soportes y los microorganismos empleados en la biodegradación de compuestos tóxicos por medio de sistemas de biomasa fija.**

Sistema	Soporte utilizado	Microorganismos utilizados	Referencia
Matraz agitado	Alginato de calcio	Mezcla de microorganismos definidos	Lee <i>et al.</i> (1994)
Lote, quimostato y columna empacada	Sílica y madera	<i>P. cryosporium</i>	Armenante <i>et al.</i> (1992)
Matraces agitados	Alginato de calcio	<i>Pseudomonas</i> y <i>Aribrobacter</i>	Bae <i>et al.</i> (1996)
Reactor de lecho fluidificado	Arena	<i>Pseudomonas putida</i>	Silva y Campos (1996)
Reactor de biocapa de cilindros concéntricos	Ninguno	Mezcla no identificada	Arvin (1991)
Reactor de lecho empacado	Soporte cerámico	<i>Pseudomonas sp.</i>	Fava <i>et al.</i> (1996)
Reactor de lecho empacado	Soportes estructurados de cerámica	Licor mezclado de lodos activados	Seigneur <i>et al.</i> (1993)
Reactor de lecho empacado	Mezcla-dores estáticos	<i>Comamonas testosteroni</i>	Klevnikov y Peringer (1996)
Reactor de lecho empacado	Nueve diferentes soportes	mezcla proveniente de lodos activados	Deron <i>et al.</i> (1997)
Reactor de lecho fluidificado	Celita	Mezcla proveniente de lodos activados	Puhakka <i>et al.</i> (1995)

Westmeier y Rehm (1985) utilizaron la bacteria *Alcaligenes sp.* inmovilizada en esferas de alginato de calcio para el tratamiento de efluentes que contenían 4-clorofenol en concentraciones de 385-514 mg/l. Encontraron actividades entre 269 y 514 mg/l por día.

Zache y Rehm (1989) utilizaron un co-cultivo de *Cryptococcus elinovii* y *Pseudomonas putida* inmovilizadas en esferas de alginato de calcio-quitosano, para el tratamiento de fenol. Estos investigadores reportaron que el sistema fue capaz de degradar el fenol en concentraciones de hasta 3,200 mg/l en cultivos semicontinuos. Por otro lado, encontraron que en operación continua el sistema alcanzó productividades de hasta 9,840 mg/l.día.

Arvin (1991) ha trabajado exitosamente con un reactor de cilindros concéntricos y biocapa formada por microorganismos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales industriales, en el tratamiento de TCE, TCA, cDCE y tDCE en concentraciones de 1.2, 1.1, 4 y 2 mg/l, respectivamente. Utilizando tiempos de residencia hidráulica de hasta 0.2 días se obtuvieron remociones del 23, 25, 31 y 97% de los diferentes compuestos. En el caso de el cis y trans DCE se presentó la formación de epóxidos. Las velocidades de degradación de los compuestos se expresaron

## 2. Antecedentes

en miligramos desaparecidos por área de bio-capa por unidad de tiempo, por lo que se hace difícil la comparación con otros sistemas.

**Tabla 2.4 Resumen de los compuestos tratados y las velocidades de degradación alcanzadas.**

Compuestos tratados	Concentración inicial (mg/l)	Velocidad de Biodegradación (mg/l.día)
F	500	454
2CF	35	13
2,4DCF	40	80
2CF	500	variable, según el sistema
F, 4CF, 2,4,6TCF y mezcla	0.3 mM	-
F	1,588	1,430
TCE, TCA, cDCE y tDCE	1.2	-
	1.1	-
	4	-
PCB's y CBA's	75	-
SAS	1,200	170
F	4,800	280
p-toluen sulfonato de sodio	1.14	404
SAS	1.2	8.3
2,3,4,6TeCF	-	1,500
2,4,6TCF	-	
PCF y mezcla	-	

Anselmo y Novais (1992) trabajaron con el hongo *Fusarium flocciferum* inmovilizado en espuma de poliuretano, en un reactor agitado (1.5 litros de volumen activo, pH = 4 a 4.5, 300 rpm, T = 25°C) para el tratamiento de efluentes sintéticos que contenían únicamente fenol como fuente de carbono. Ellos encontraron que para un factor de dilución de  $0.069 \text{ h}^{-1}$ , alimentando cargas de 500 a 1,500 mg/l de fenol, se alcanzan velocidades de remoción de 2,400 a 5,760 mg fenol /l.día

## 2. Antecedentes

**Tabla 2.5 Eficiencias alcanzadas por los sistemas en relación con el TRH.**

Tipo de reactor	Eficiencia alcanzada (%)	TRH (horas)	Referencia
Esferas de alginato de calcio en matraces	F: 96 2CF: 97	264 648	Lee <i>et al.</i> (1994)
Lote, quimiostato y columna empacada	2CF: variable	variable	Armenante <i>et al.</i> (1992)
Matraces agitados	F: 100 4CF: 100 2,4,6TCF: 100	15-110 20-90 20-90	Bae <i>et al.</i> (1996)
Reactor de lecho fluidificado	F: 72.9-97.3	0.56-7.0	Silva y Campos (1996)
Reactor de biopelícula continuo	TCE: 23 TCA: 25 cDCE: 31 tDCE: 97	4.8	Arvin (1991)
Reactor de lecho empacado	2,5dCB: 70 2,3dCB: 75 2,4dCB: 30-40 3,3dCB: 45 4,4dCB: 90	150	Fava <i>et al.</i> (1996)
Reactor de lecho empacado	SAS: 99 F: 99	0.0136	Seigneur <i>et al.</i> (1993)
Reactor de lecho empacado	pTSS: 99	0.15-0.4	Klevnikov y Peringer (1996)
Reactor de lecho empacado	SAS: 99	0.134	Deront <i>et al.</i> (1997)
Reactor de lecho fluidificado	Mezcla: 98	1-5	Puhakka <i>et al.</i> (1995)

Armenante *et al.* (1992), emplearon el hongo filamentoso *Phanerochate chrysosporium* para la degradación de 2CF. El microorganismo fue inmovilizado en un derivado de sílica y en astillas de madera. Se emplearon diferentes sistemas para determinar cuál es el idóneo para tratar este tipo de efluentes. Entre los sistemas empleados está el reactor *batch*, el quimiostato y la columna empacada. En este trabajo se concluyó que el 2CPh es susceptible de ser degradado hasta en concentraciones de 500 mg/l y que la opción más promisoriosa a utilizar es el reactor tipo columna empacada

Seigneur *et al.* (1993) emplearon un reactor de lecho empacado con soportes estructurados de cerámica, inoculado con el licor mezclado de una planta de tratamiento tipo lodos activados. Ellos

## 2. Antecedentes

demonstraron que es posible tratar el sodio-sulfonato de antraquinona (SAS) y fenol en cargas de hasta 4,080 mg/l.día y 6,720 mg/l.día, respectivamente (con diluciones de 0.149 y 0.059 h). Las concentraciones iniciales de los sustratos fueron 1,200 y 4,800 mg/l.

Lee *et al.* (1994) utilizaron una mezcla de seis microorganismos identificados, en el tratamiento de efluentes que contenían fenol y algunos clorofenoles. Compararon las eficiencias de los microorganismos libres contra los mismos inmovilizados en esferas de alginato de calcio. Encontraron que las células inmovilizadas alcanzaron velocidades de remoción de 181 a 1000 mg/l.día para concentraciones de fenol entre 200 y 500 mg/l, de 10 a 12.96 mg/l.día para concentraciones de 10 a 35 mg/l de 2-clorofenol y de 40 a 80 mg/l.día para concentraciones de 20 a 40 mg/l de 2,4-diclorofenol.

Lee *et al.*, (1994) emplearon una mezcla definida de microorganismos, inmovilizados en esferas de alginato de calcio en el tratamiento de 2 clorofenol (2CPh), 2,4 diclorofenol (2,4DCF) y mezclas de ellos. Como reactor emplearon matraces agitados. Otros detalles pueden ser consultados en Lee *et al.* (1994). Los principales resultados del trabajo son los siguientes. El sistema fue capaz de tratar fenol en concentraciones de hasta 500 mg/l con velocidades de degradación de 454 mg/l.día. En cuanto al 2CPh, la máxima concentración tratada fue 35 mg/l y la velocidad de desaparición del compuesto 13 mg/l.día. Finalmente, el 2,4DCF fue tratado en concentraciones de hasta 40 mg/l con velocidades de remoción de 80 mg/l.día.

Puhakka *et al.* (1995) emplearon un reactor de lecho fluidificado para el tratamiento de mezclas que contienen 2,3,4,6TeCPh, 2,4,6TCF y PCF. Este reactor emplea soportes tipo celita (un mineral empleado con frecuencia para inmovilizar microorganismos) inoculados con microorganismos de lodos activados. En este trabajo se reportan actividades de 1500 mg/l.día con un tiempo de residencia hidráulica de 45 min (degradación del 99%).

Silva y Campos (1996) emplearon un reactor de lecho fluidificado con capacidad total de 3.3 litros. *Pseudomonas putida* fue el microorganismo inmovilizado en arena fina (0.25 mm de diámetro). El reactor se trabajó a un pH entre 7.3 y 8.9 y las velocidades lineales del aire fueron fijadas entre 0.299 y 1.8 cm/s. Se alimentaron con concentraciones entre 51.3 y 1,588 mg/l de fenol al reactor.

Los tiempos de residencia hidráulica oscilaron entre 0.56 y 7.01 horas. (lo que equivale a cargas volumétricas de 2,200 a 7,820 mg fenol/l.día). En este trabajo se reportan las concentraciones de nitrógeno total, nitrógeno amoniacal y fósforo, en las corrientes de alimentación y salida del sistema. A

## 2. Antecedentes

partir de estos datos se reportan las remociones de cada uno de las especies en el reactor. Un factor interesante del trabajo es la medición de oxígeno disuelto en la entrada y salida del sistema, ya que el sistema es aerado.

Khlebnikov y Péringer (1996) llevaron a cabo trabajos para la degradación de ácido p-toluensulfónico (APTS). Utilizaron un reactor de lecho empacado estructurado (mezcladores estáticos de polipropileno), inoculado esencialmente con *Comamonas testosteroni*, aunque localizaron en el biopelícula otros dos microorganismos no degradadores de APTS. El volumen de este reactor fue de 8.2 l litros y un área disponible para la adhesión del biopelícula de 2 m<sup>2</sup>. El reactor fue aerado a velocidades de 0.5 a 4 litros/min y el pH fue controlado a 6.9 +/- 0.1 unidades. Aunque la temperatura no fue controlada, permaneció relativamente constante a 28° C. El reactor se trabajó a una velocidad de recirculación de 6.5 litros/min.

Alimentando 1,140 g/l de APTS, se encontraron eficiencias de remoción entre 25 y 100% y velocidades de degradación de 2,400 a 4,800 mg C/l.día (trabajando a diluciones de 0.15 a 0.4 h<sup>-1</sup>). La velocidad de degradación resultó ser ligeramente dependiente de la velocidad de aereación para bajos valores de dilución (aeraciones entre 0.5 y 4 l/min).

Un aspecto interesante del estudio es el efectuado con respecto al efecto del retrolavado del filtro. Los autores aseguran que se puede controlar el espesor de la biopelícula, retrolavando el sistema aproximadamente cada 70 horas de operación. A partir de los datos de operación y algunas consideraciones teóricas, Khlebnikov y Péringer calcularon el *bold-up* y el espesor de la biopelícula a lo largo de 100 días de operación, en donde se demuestra que los valores estacionarios se alcanzan alrededor de los 68 días de operación.

Song y Kwon (1996) trabajaron con un filtro aerobio sumergido para el tratamiento de aguas residuales municipales sintéticas. Aunque el trabajo no está relacionado con la presencia de clorofenoles, es interesante en cuanto la operación del filtro biológico bajo diferentes cargas y condiciones. Dicho filtro fue empacado con distintos empaques entre los que se encuentran la grava, cubos de red metálica y malla. El filtro fue operado a diferentes relaciones F/M y distintas cargas orgánicas, medidas como DBO. Además de medirse las remociones correspondientes, se midieron la producción de lodos para cada una de las experiencias. Se manejaron cargas entre 800 y 3,000 mg



## 2. Antecedentes

DBO/l.día. Se reporta una gráfica en la que la remoción porcentual para cada experiencia es una función del material de empaque y la carga orgánica aplicada (relación inversamente proporcional).

Fava *et al.* (1996) estudiaron la degradación de policlorobifenilos (PCB's) y clorobifenilos (CBA's) por medio de un sistema de lecho empacado, constituido por soportes cerámicos en los que previamente se inmovilizó a *Pseudomonas sp.* Se midió la liberación de cloro y la aparición de algunos metabolitos intermediarios. Se concluyó que es posible dechlorar los compuestos en concentraciones de hasta 75 mg/l. Los compuestos evaluados fueron el 2,5dCB, 2,3dCB, 3,4dCB, 3,3dCB y 4,4dCB. Las remociones alcanzadas en un período de aproximadamente 150 fueron: 70, 75, 30-40, 45 y 90%, respectivamente.

Sung *et al.* (1997) emplearon una mezcla de *Pseudomonas* y *Arthrobacter* en la degradación de fenol, 4CF, 2,4,6TCF y mezclas de ellos. Las bacterias fueron inmovilizadas en esferas de alginato de calcio y se trabajaron en matraces agitados, con el fin de evaluar la degradación de clorofenoles. El fenol, 4CF y 2,4,6 TCPH fueron degradados hasta en concentraciones en la mezcla de 0.3 mM en un total de 55 horas en el primer lote, en subsecuentes se logró la degradación en 20 horas.

Deront *et al.*, (1997) probaron nueve diferentes empaques en un reactor de lecho empacado e inoculado con microorganismos provenientes de un sistema de lodos activados para tratar corrientes que contienen sulfato de antraquinona. En este trabajo quedó demostrado que la velocidad de degradación del sulfonato de sodio (SAS) no es una función de la cantidad de biopelícula soportado en cada tipo de empaque. Se lograron remociones de hasta 99% para corrientes que contenían 1.2 g/l de SAS. También se reportó una velocidad de degradación máxima de 8.3 g SAS/g peso seco.día.

## Discusión general

En principio puede verse que en estos trabajos existen varios elementos comunes, pero esencialmente las aproximaciones son diferentes. Por ejemplo, en cuanto a los sistemas empleados están tres trabajos realizados con un reactor agitado, dos con columna empacada, uno con reactor de lecho fluidificado y uno con un reactor tipo *air-lift*. En cuanto a los soportes utilizados, se encuentra el alginato de calcio, la poliacrilamida-hidracida, la espuma de poliuretano, la arena y soportes de polipropileno.

## 2. Antecedentes

Los compuestos tratados por estas metodologías son el fenol, algunos clorofenoles y cresoles y el APTS. Los intervalos de concentración inicial varía de 10 a 5,000 mg/l. Aunque no se reporta en todos los casos, la eficiencia de remoción osciló entre 25 y 100%. Finalmente, algunas características, tales como los niveles de aeración, pH, temperatura, y las diluciones trabajadas, se reportan para casi todos los trabajos.

En conclusión, existe un campo abierto para investigar sobre el tratamiento de efluentes tóxicos por medio de sistemas de biomasa fija, específicamente por medio de filtros sumergidos aerobios en los que una sola especie es inmovilizada. Los aspectos que la literatura sugiere investigar son:

- a. La velocidad de biodegradación.
- b. El tipo de soporte.
- c. El efecto de diferentes compuestos tóxicos solos y combinados y de la concentración de los mismos
- d. Ya que el sistema es continuo, el efecto del tiempo de residencia hidráulica.
- e. La influencia de parámetros tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto y el contenido de nitrógeno.
- f. La reducción de la toxicidad por el empleo del proceso.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir los objetivos planteados al inicio de esta tesis, se trabajó experimentalmente de acuerdo con la metodología resumida en la figura 3.1.

### 3.1 EXPERIMENTOS CON CÉLULAS LIBRES

#### 3.1.1 Cultivo de la bacteria

La bacteria empleada a lo largo de este trabajo fue amablemente donada para el estudio por el Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar (Habana, Cuba). Esta cepa fue aislada de sedimentos marinos y en algunas experiencias preliminares se detectó su capacidad para degradar clorofenoles y el ácido 2,4D

La bacteria (ver microscopía electrónica en la figura 3.1) se recibió en slant de medio YPG y se conserva desde entonces en cajas de Petri con medio YPG-sólido (figura 3.2).

El medio mínimo reportado por Dapaah y Hill (1992) consiste de los siguientes componentes (en g/l):

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.840
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.750
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.488
NaCl	0.600
$\text{CaCl}_2$	0.600
$\text{MgSO}_4$	0.600
$\text{FeCl}_2$	0.006

### 3. Materiales y métodos

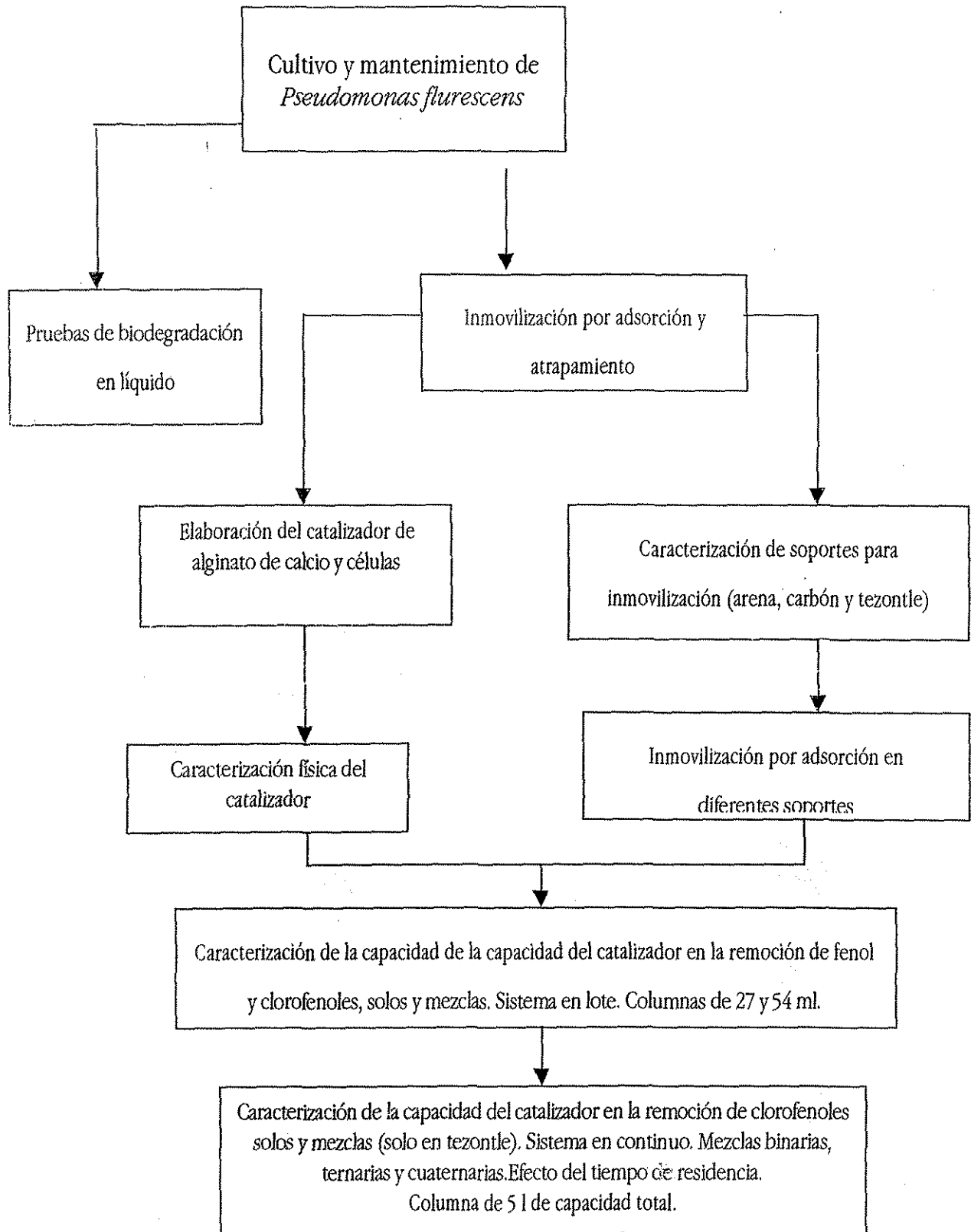


Figura 3.1 Diagrama general de la metodología empleada en este trabajo.

### 3. Materiales y métodos

El medio YPG consiste en los siguientes componentes ( en g/l):

Extracto de levadura	10.0
Peptona de caseína	10.0
Glucosa anhidra	10.0
Agar técnico (para medio sólido)	10.0

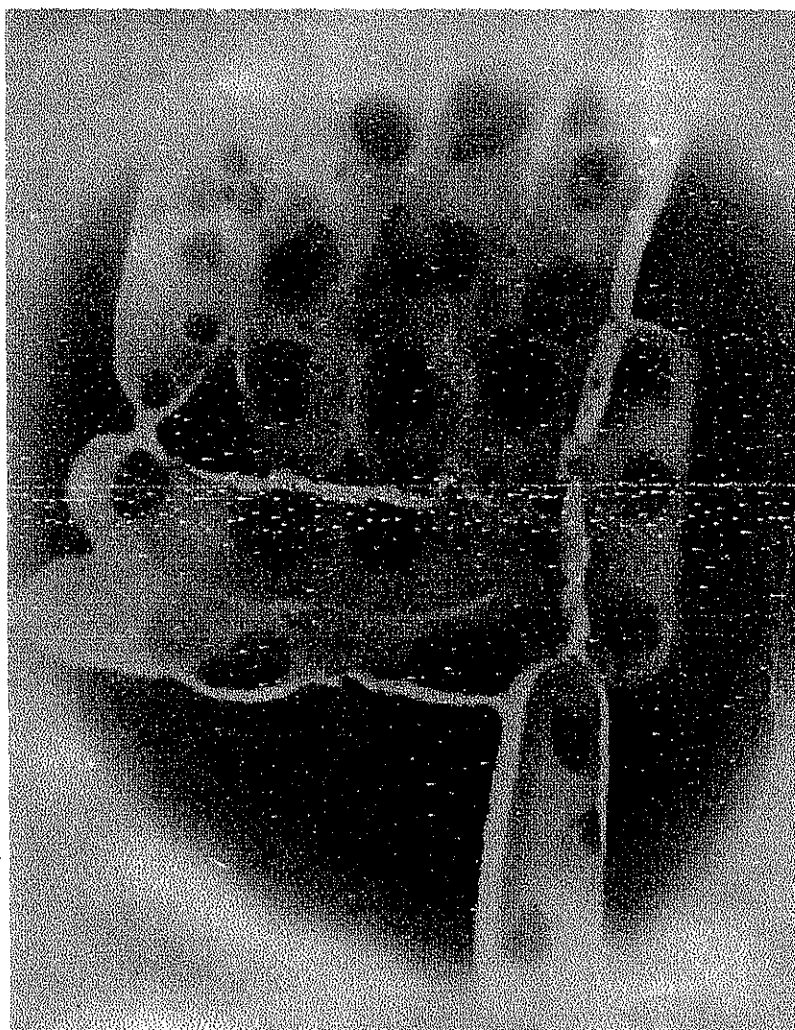


Figura 3.2 Microfotografía de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* empleada en este trabajo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

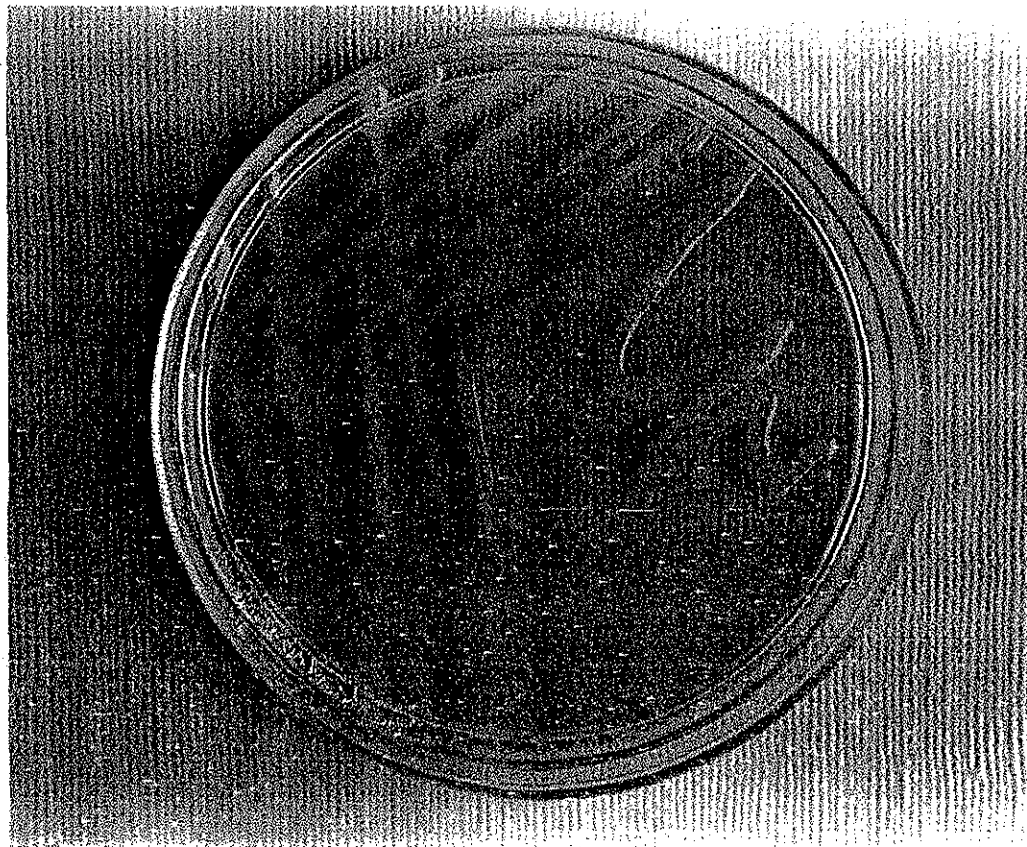


Figura 3.3. Crecimiento de *Pseudomonas* en YPG-agar sólido.

#### 3.1.2 Cosecha de células

Las células crecidas en medio YPG fueron cosechadas utilizando una mini-centrífuga (Eppendorf 5415C, USA) a 11,000 rpm (880 fuerzas centrífugas relativas RFC) durante 20 minutos. Finalmente, las células fueron enjuagadas varias veces (2-3) con una solución tampón de fosfatos (pH de 7) y recentrifugadas.

#### 3.1.3 Prueba preliminar de biodegradación

Las pruebas preliminares de biodegradación se desarrollaron de la siguiente manera. 45 ml de medio mínimo Dapaa estéril, se inocularon con 5 ml de cultivo de *Pseudomonas fluorescens* en medio

### 3. Materiales y métodos

completo YPG de 24 horas y una concentración fija de células (*i.e.* densidad óptica de alrededor de 0.2, como densidad óptica) . El cultivo fue incubado a 32°C en un agitador orbital. Cuando el cultivo cumplió 24 horas, la densidad óptica fue medida y se agregó el compuesto a evaluar. El crecimiento fue seguido por densidad óptica cada 12-24 horas. Cada compuesto fue considerado biodegradable si la densidad óptica se incrementaba en forma consistente con respecto al valor inicial, en comparación con el blanco sin compuestos adicionados. Este método de evaluación es muy grueso, ya que la formación de precipitados, la aparición de productos como polímeros bacterianos y otros factores podrían interferir en la lectura de densidad óptica.

## 3.2 PREPARACION DEL CATALIZADOR DE ALGINATO DE CALCIO

### 3.2.1 Preparación de las soluciones de alginato de sodio

Las soluciones de alginato de sodio (Burmester Pharmatrade, Hamburgo, Alemania) fueron preparadas en concentraciones del 0.5 a 4%. El polvo de alginato fue adicionado al agua deionizada o a las soluciones de células, agitando fuertemente (700 rpm) hasta que la solución se volvió homogénea.

### 3.2.2 Tratamiento térmico aplicado a las soluciones de alginato

Las soluciones fueron sometidas a un tratamiento térmico por 10 minutos a una temperatura de 100 °C. en matraces de vidrio cerrados con tapón de algodón y cubierta de papel aluminio.

### 3.2.3 Caracterización reológica de las soluciones de alginato

Las soluciones de alginato y las mezclas alginato-células fueron caracterizadas en términos reológicos por medio de un viscosímetro de aguja Brookfield DV-I (utilizando las agujas 1 y 4). Los índices  $n$  y  $K$  de la ley de la potencia fueron evaluados estadísticamente por medio de un programa de cómputo, descrito por Hannote *et al.*, 1991.

### 3.2.4 Elaboración del catalizador de alginato de calcio

Las soluciones de alginato de sodio o las mezclas alginato-células fueron extruídas a través de una aguja colocada al interior de un cilindro por el cual se alimenta aire filtrado a diferentes presiones de trabajo (Figura 3.4). Las partículas esféricas se recibieron y mantuvieron en una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M por lo menos durante 1 hora. Los parámetros controlados durante el proceso fueron la presión de aire (en  $\text{kg}/\text{cm}^2$ ), la velocidad de adición del alginato por medio de una bomba peristáltica (en  $\text{ml}/\text{min}$ ), la concentración del alginato (en %) y la altura entre la punta de la aguja extrusora y la superficie de la solución de cloruro de calcio.

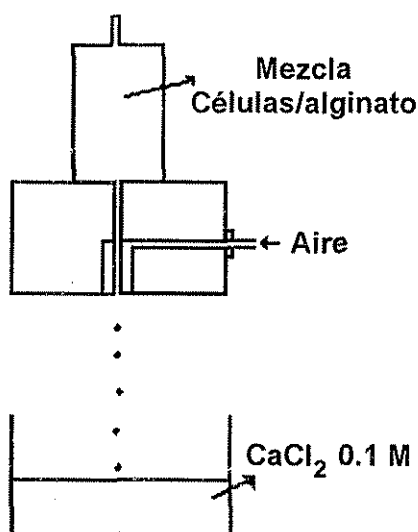


Figura 3.4 Sistema para la elaboración de las esferas de alginato de calcio.

### 3.2.5 Caracterización de las esferas de alginato

La distribución de tamaño de las partículas generadas se evaluó de dos formas. En la primera los diámetros de entre 30 y 50 partículas fueron medidos con un Vernier y promediados. Por otro lado, el lote producido fue tamizado en mallas de acero inoxidable (10, 12, 16, 18, 20 y 30, correspondientes a 1.68, 1.41, 1.13, 0.96, 0.8 y 0.59 mm, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos. La esfericidad de las partículas fue calculada como el cociente de los diámetros mayor y menor de las partículas.



### 3.3 ANALISIS DE LOS CLOROFENOLES Y PRODUCTOS INTERMEDIOS

#### 3.3.1 Métodos colorimétricos

Las concentraciones de fenol, 2clorofenol, 2,3diclorofenol, 2,4,6triclorofenol, 2,3,4,6tetraclorofenol y pentaclorofenol fueron evaluadas, cuando el compuesto se encontraba sólo en la solución, por medio del método de la 4-aminoantipirina reportado en los Métodos Estandar (APHA, AWWA, WPCF,1989). Para ello, se elaboraron curvas de calibración para cada uno de los compuestos en presencia del medio Dapaah. Algunas mezclas de clorofenoles (dicloro, tricloro, tetracloro y pentaclorofenol a concentraciones de 200, 400 y 600 mg/l) también fueron medidas de manera gruesa con este método.

El límite de detección encontrado en la determinación de fenol y clorofenoles por este método fue de 0.025  $\mu\text{g/l}$ . Para mas detalles ver Cabello (1999)

#### 3.3.2 Determinación de mezclas de clorofenoles y algunos metabolitos de su degradación por cromatografía de gases

La concentración de los clorofenoles en las mezclas, así como de algunos metabolitos de su degradación, fueron determinados por medio de un sistema acoplado de cromatografía de gases-detector de masas. La extracción de las muestras se realizó con diclorometano nanogrado (Mallinkrodt, Alemania). Los extractos fueron secados utilizando sulfato de sodio anhidro grado reactivo (J.T. Baker, México). Una vez secos, fueron concentrados hasta aproximadamente 0.5 ml en un rotavapor (Buchi RE121) a presión reducida y una temperatura no mayor a 40° C. La fase acuosa para cada una de las extracciones fue concentrada a sequedad en el evaporador rotatorio a presión reducida y resuspendida en n-hexano nanogrado.

El concentrado de la fase orgánica y la acuosa de las muestras fueron derivados utilizando 3 ml de solución 0.15 M de diazometano en éter etílico. Las mezclas de reacción fueron concentradas a 0.5 ml mediante un flujo de nitrógeno.

### 3. Materiales y métodos

Aproximadamente un microlitro de cada concentrado fue inyectado a un sistema de cromatografía de gases (Hewlett Packard 5890 Serie II) acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5971 Serie II), utilizando una columna capilar Ultra 2 (5% de fenilmetilsilicón) de 25 m x 0.2 micras x 0.33 micras. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes:

Flujo de acarreador	80 ml/min
Relación Split/splitless	1:25
Temperatura inicial	70° C
Temperatura final	250°C
Incremento	15° C/min

El espectrómetro de masas se utilizó en modo scan con un intervalo de m/z de 12 a 600 UMA. Se utilizó impacto electrónico como fuente de ionización y una energía de 70 eV.

## 3.4 DETERMINACION DE BIOMASA Y CUENTA EN PLACA

### 3.4.1 Determinación de biomasa por densidad óptica

Una dilución 1/50 de la muestra se analizó en un espectrofotómetro Spectronic 21D (Milton Roy, USA) a 590 nm. Se construyeron curvas de calibración para las determinaciones en medio YPG y medio mínimo.

### 3.4.2 Determinación de las UFC/ml o UFC/g soporte

Una muestra del soporte a caracterizar fue lavada sucesivamente con solución salina y la solución obtenida se caracterizó como a continuación se describe. En el caso de las soluciones líquidas no hubo necesidad del lavado. En el caso de las esferas de alginato de calcio, se disolvieron en una solución de EDTA-sal disódica y KCl, previamente al conteo.

La muestra líquida a evaluar se diluyó sucesivamente en proporción de 1:10. Dicho de otra manera: un ml de solución se diluyó en nueve ml de solución salina (consistente en KCl al 1%) hasta alcanzar diluciones de  $1 \times 10^8$  aproximadamente. Se sembraron cajas de YPG sólido con un ml de cada

### 3. Materiales y métodos

dilución, que se esparcieron con ayuda de entre tres y cinco esferas de vidrio estériles. Se desecharon las esferas de vidrio y se taparon las cajas de Petri. Se identificó cada caja y se incubaron a 32°C durante 24 horas. El conteo de UFC se realizó en las cajas en las que se encontraron entre 20 y 200 colonias (tres cajas de ser posible) y se promediaron los valores.

En el caso de la cuenta en medio King B, el medio utilizado es el que a continuación se describe (en g/l):

Polipetona	20.0
Glicerol	10.0
MgSO <sub>4</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.9
Agar técnico	15.0

### 3.5 EXPERIMENTOS EN COLUMNAS EMPACADAS DE 0.027 LITROS, OPERACION POR LOTE A TEMPERATURA CONTROLADA

#### 3.5.1 Características de las partículas

La densidad aparente de las partículas fue determinada en una probeta graduada de 50 ml con medio Dapaah. La densidad real, por medio de un tubo de Jackson. La humedad de las partículas fue determinada por pérdida al secado en un horno convencional en el caso de la arena, el tezontle y el carbón activado y en una termobalanza (Ohaus, USA) en el caso de las esferas de alginato de calcio.

La porosidad de los materiales rígidos, la pérdida por ignición (700° C, por una hora) y la dilución en medio ácido (HCl al 30%, por 24 horas) y alcalino (NaOH al 10%, por 24 horas) fueron evaluadas siguiendo las técnicas propuestas para la caracterización de materiales de filtración. La fracción de vacíos de las esferas de alginato se determinó por el método de Buchholz (Quirazco,1994), consistente en la deshidratación de las partículas hasta la humedad crítica, seguida de la reconstitución de las partículas en una solución 0.1 M de CaCl<sub>2</sub>. Para mas detalles, ver Torres *et al.*, 1998.

#### 3.5.2 Determinación de la capacidad de adsorción de células en cada soporte

### 3. Materiales y métodos

Mediante esta técnica se mide la colonización de los diferentes materiales por la bacteria. Se desarrolló un cultivo de *Pseudomonas* en medio YPG por 24 horas hasta una densidad óptica de aproximadamente 0.25 (leída a 610 nm, dilución 1/50). Se empacó la columna de vidrio con capacidad de 29 ml con los materiales a evaluar (tezontle, carbón activado y arena), previamente tamizados (se decidió utilizar una muestra equivalente de malla 12, 14 y 16), lavados y secados en el horno. Se recircularon 100 ml (en flujo ascendente) del inóculo de *Pseudomonas* a temperatura ambiente (ver figura 3.4). Al finalizar el periodo, se desplazó todo el líquido y se tomaron 2-3 partículas del material por la parte de arriba de la columna. Se determinó la cantidad e UFC/g<sub>soporte</sub> de acuerdo con la técnica descrita en esta sección.

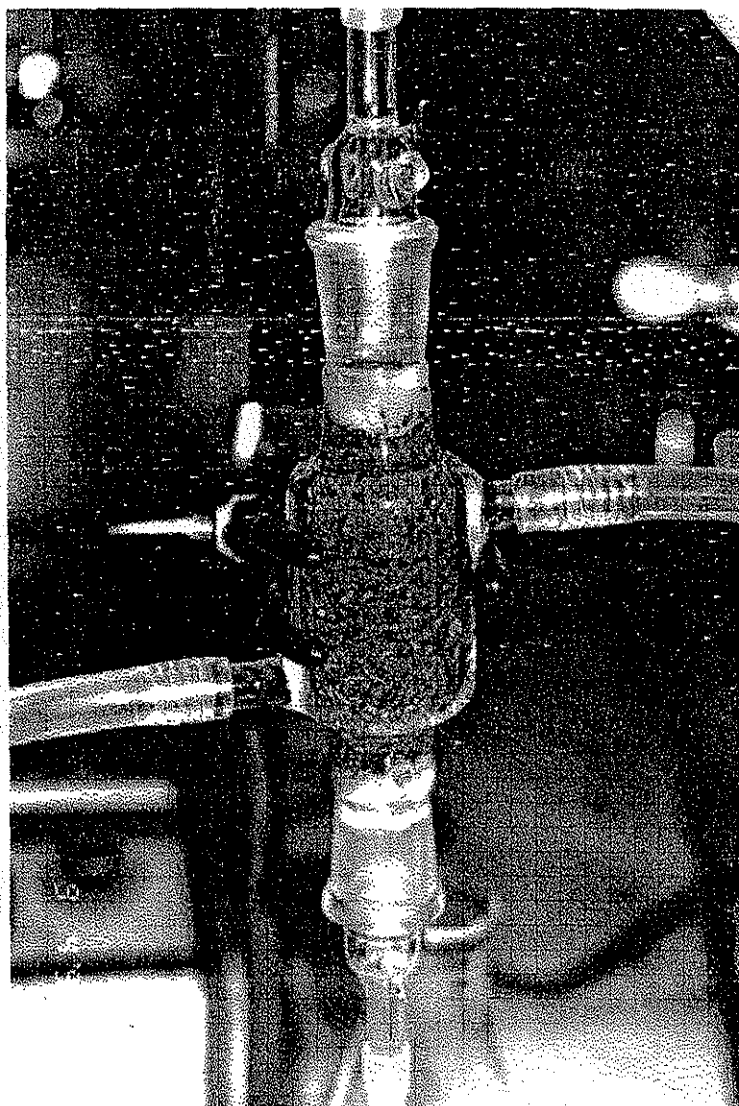


Figura 3.5 Columna de 27 ml empacada con tezontle e inoculada con *Pseudomonas fluorescens*.

#### 3.5.3 Determinación de las capacidades de adsorción de los materiales

0, 2, 4, 6, 8 y 10 g/l de cada material a evaluar fueron puestos en vasos de precipitado de 1,000 ml conteniendo 500 ml de una solución de medio Dapaah y el fenol (a una concentración de 1,000 mg/l) o clorofenol (a una concentración de 100 mg/l) en cuestión. El contenido de los recipientes fue agitado con la ayuda de un sistema de agitación de 6 plazas durante 2-4 horas, hasta que las muestras alcanzaron el equilibrio. Todas las experiencias fueron realizadas a temperatura ambiente. Los datos fueron analizados en términos de la ecuación de Freundlich

$$X/M = KC^{1/n} \quad (1)$$

donde

X: cantidad de tóxico adsorbido

M: masa de material adsorbente

C: concentración de equilibrio

n y K: constantes a determinar

#### 3.5.4 Operación de las columnas empacadas

Las columnas empacadas con una cantidad conocida de cada material, fueron inoculadas siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en la técnica de determinación de la capacidad de adsorción de células a cada soporte. Las columnas se operaron de la siguiente manera. Se hizo pasar la solución conteniendo fenol o clorofenoles a través de la columna (de abajo hacia arriba) por el tiempo necesario para alcanzar una remoción del (los) componente(s) de 90-95 % por lo menos. Al finalizar la operación, la columna se vacía, se toman muestras para determinar la cantidad de biomasa presente y la fracción líquida se analiza para conocer la concentración final de clorofenoles o COT.

## **3.6 EXPERIMENTOS EN COLUMNA EMPACADA DE 5 LITROS, OPERACION EN CONTINUO A TEMPERATURA AMBIENTE**

### **3.6.1 Fermentación de 15 litros con *Pseudomonas fluorescens***

Se llevaron a cabo fermentaciones para contar con suficiente material celular para inocular la columna. El proceso fue llevado a cabo como se explica a continuación. Se hizo crecer los microorganismos en ocho matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio mínimo Dapaah y tres-cuatro azadas de *Pseudomonas fluorescens* por 24 horas a 32 °C. Se midió la densidad óptica final de dichos cultivos y con 350 ml de este medio se inoculó el fermentador de 3.5 litros de volumen de trabajo (Ver figura 4.5). Se siguió la fermentación por 36 horas, evaluando el crecimiento a través de la densidad óptica. Con el producto de cada fermentación se inoculó un fermentador de 15 litros y se procedió como en el caso de la fermentación en 3.5 litros. En algunos puntos del proceso se caracterizó el crecimiento celular por cuenta en placa en medios YPG y King B, además de las determinaciones de densidad óptica.

### **3.6.2 Inoculación de la columna de 5 litros**

El material celular proveniente de dos fermentaciones de 15 litros fue circulado en la columna por 24 horas. Después de este período la columna fue drenada y se tomaron algunas partículas para medir la cantidad de UFC/g soporte.

### **3.6.3 Caracterización de las mezclas de tezontle (finos, medio y gruesos)**

Se caracterizaron tres mezclas de tezontle con diferentes granulometrías: finos (0.84 a 1.19 mm), medios (1.19 a 1.68 mm) y gruesos (1.68 a 3.36 mm) de acuerdo a las técnicas antes descritas. Las pruebas desarrolladas fueron porosidad, densidad aparente, solubilidad en HCl y NaOH y capacidad de atrapamiento de células

### 3.6.4 Características de la columna empacada con capacidad de 5 litros

La columna está construida en acrílico. Presenta un diámetro de 95 mm y una altura total de 900 mm. El volumen activo de la columna, dependiendo del material con el que se empaque es de aproximadamente 3.5 litros. La sección transversal es equivalente a  $0.007 \text{ m}^2$ . Fue empacada con 100 mm de grava y 710 mm de altura de una mezcla de granulometría conocida de tezontle.

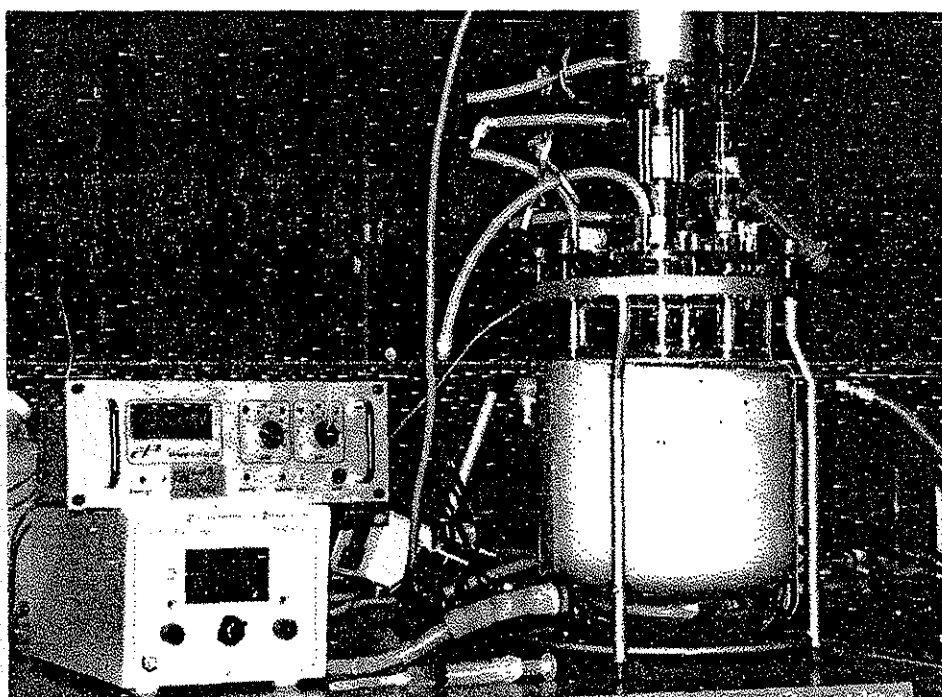


Figura 3.6 Fermentador de 3.5 litros de capacidad utilizado para generar biomasa.

### 3.6.5 Operación de la columna de 5 litros

Se empleó una bomba peristáltica para hacer circular el efluente a tratar en forma ascendente. En una primera etapa, se alimentaron soluciones Dapaah conteniendo 2clorofenol, 2,4diclorofenol, 2,4,6triclorofenol y pentaclorofenol por separado, a diferentes concentraciones. Se manipularon varias

### 3. Materiales y métodos

velocidades de alimentación, dando como resultado tiempos de residencia de entre 10 y 90 horas. La carga celular de la columna fue evaluada (por siembra en placa para los medios YPG y King B) cada vez que se realizó un cambio de compuesto o concentración. Se tomaron muestras para determinar la concentración de los clorofenoles por el método de la 4-aminoantipirina y carbón orgánico total, por el método descrito en esta misma sección. Esta etapa tuvo una duración aproximada de diez meses. La operación se llevó a cabo a temperatura ambiente entre los meses de octubre y enero. Las temperaturas se monitorearon tres veces como mínimo al día, para reportar el promedio diario. El criterio que se utilizó para muestrear las concentraciones iniciales y finales fue esperar por lo menos 3 TRH antes de tomar dichas muestras. Para los tiempos de residencia hidráulica más cortos, se esperaron hasta más de 5 TRH.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 EXPERIMENTOS CON CÉLULAS LIBRES

#### 4.1.1 Biodegradación de fenoles con las células libres

En la tabla 4.1 se presentan los resultados de la prueba de biodegradación de los distintos compuestos fenólicos. Como se puede observar, debido a la toxicidad de los diferentes compuestos, *Pseudomonas fluorescens* degradó diferentes concentraciones de fenol, clorofenoles, nitrofenoles, metil fenoles, cloro-metil fenoles y un derivado clorado del ácido fenoxiacético. De acuerdo con éstos resultados, los sustituyentes más tóxicos son: metil y nitrofenoles > diclorofenoxiacético, di- y triclorofenol > clorofenol. El fenol sin sustituyente alguno resulta el de menor toxicidad.

#### 4.1.2 Resultados de la fermentación de 15 litros para la producción de biomasa

La fermentación tuvo una duración de 24 horas y alcanzó densidades ópticas de alrededor de 0.3 (1.08 g/l de biomasa, de acuerdo con la curva de peso seco). Al finalizar el proceso, la cuenta total de organismos (en medio YPG) fue de alrededor de  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml<sub>medio</sub>, mientras que la cuenta de *Pseudomonas* (medio King B) fue muy cercana ( $5 \times 10^{10}$  UFC/ml medio). Esto significa que la mayor parte de las bacterias crecidas son *Pseudomonas fluorescens*

#### 4. Resultados y discusión

Tabla 4.1. Resultados de las pruebas de biodegradación desarrolladas. Células libres.

Compuesto tóxico	Concentración (mg/l)		
	1	10	50
Fenol	+	+	+
2 Clorofenol	+	+	+
2,4 Diclороfenol	+	+	-
2,4,6 Triclorofenol	+	+	-
2 Nitrofenol	+	-	-
4 Nitrofenol	+	-	-
2,4 Nitrofenol	+	-	-
2,4 Dimetilfenol	+	-	-
4 Cloro 3 metilfenol	+	-	-
cido 2,4 dicloro fenoxiacético	+	+	-

Clave : (+) Prueba exitosa, hubo crecimiento sostenido de células por arriba del valor inicial

(-) Prueba fallida.

## 4.2 PRODUCCION Y CARACTERIZACION DEL CATALIZADOR DE ALGINATO DE CALCIO

### 4.2.1 Caracterización reológica de las soluciones de alginato

Los datos crudos del viscosímetro de Brookfield fueron procesados como se detalla en Hannote *et al.*, (1991) para calcular estadísticamente los índices de consistencia K y de flujo n de la ley de la potencia  $\mu = K\gamma^{n-1}$ , donde  $\mu$  es la viscosidad aparente en mPa, K es el índice de consistencia en  $Ns^n/m^2$ ,  $\gamma$  es la velocidad de deformación en  $s^{-1}$ , n es el índice de flujo (adimensional) y r es el factor de correlación para el método de mínimos cuadrados. Las soluciones de alginato de sodio (sin células) se caracterizaron reológicamente antes y después del tratamiento térmico. En la tabla 4.2 se muestran los principales resultados de dichas pruebas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

Tabla 4.2. Caracterización reológica de las soluciones de alginato de sodio antes y después del tratamiento térmico.

Antes del tratamiento térmico					Después del tratamiento			
Conc. Alginato (%)	Número de aguja	n (-)	K $\text{Ns}^n/\text{m}^2$	R (-)	Número de aguja	n (-)	K $\text{Ns}^n/\text{m}^2$	r (-)
4	4	0.88	16.99	0.99	4	0.77	2.75	0.97
3	4	0.86	6.65	0.99	4	0.73	1.15	0.94
2	4	0.67	1.31	0.94	1	0.90	0.26	0.99
1	1	0.95	0.19	0.99	1	0.84	0.06	0.99
0.5	1	0.83	0.04	0.98	1	0.75	0.02	0.97

En el caso de las soluciones antes del tratamiento térmico, todos los fluidos mostraron comportamiento pseudoplástico o reofluidizante ( $n < 1$ ) con valores de  $n$  entre 0.67 y 0.95. Con respecto al índice de consistencia  $K$ , se encontró una clara relación entre la concentración de la solución de alginato de sodio y el valor de  $K$  (el cual presentó valores entre 0.04 y 16.9  $\text{Ns}^n/\text{m}^2$ ). Es importante observar que los valores de  $r$  siempre fueron iguales o mayores que 0.94, lo cual confirma la idoneidad de la ecuación de la ley de potencia para modelar los datos experimentales. En términos de viscosidad, las soluciones presentaron valores de entre 28 y 13,619 cp (ya que el fluido es no Newtoniano, la viscosidad aparente puede definirse para cada velocidad de deformación usada, en este caso 60 rpm).

Después del tratamiento térmico la solución sufrió cambios importantes. Como describieron Cheatman y Bucke (1984), el proceso de esterilización causa una drástica disminución en la viscosidad de la solución. Las soluciones de alginato de sodio fueron en general más pseudoplásticas ( $0.73 < n < 0.9$ ) y menos viscosas. Los índices de consistencia variaron entre 0.02 y 2.75  $\text{Ns}^n/\text{m}^2$  (a mayor concentración de polímero, mayor valor de  $K$ ) y viscosidades entre 10 y 1,476 cp (para una velocidad de deformación de 60 rpm). El valor de  $K$  representa el nivel de viscosidad de la solución y se sabe que es directamente proporcional a la concentración del polímero presente. Esto significa una disminución de entre 50 y 600% con respecto a los valores antes del tratamiento térmico. Otra vez, los valores de  $r$  fueron suficientemente altos (0.94-0.99), para indicar el buen ajuste a la ecuación antes descrita.

#### 4. Resultados y discusión

La disminución de viscosidad antes explicada (debido al proceso de esterilización) puede resultar benéfica para la economía del proceso, ya que menores viscosidades requieren tamaños de bombas menores y disminución de algunos problemas de operación siempre y cuando no se presenten problemas de gelación (como formación de geles débiles o largos procesos de gelación).

Cuando se mezcló la solución de *Pseudomonas fluorescens* (conteniendo 0.067% de células) y diversas soluciones de alginato de sodio (con 1 a 4% de polímero), las características reológicas fueron como se describen a continuación. La proporción alginato/células varió entre 15 y 60 (tabla 4.3). Las soluciones tuvieron un comportamiento pseudoplástico o reofluidizante ( $0.7 < n < 0.96$ ) pero con valores diferentes a las soluciones de alginato a igual concentración de polímero. En general, se observaron menores valores de  $n$ .

Los valores de  $K$  fueron siempre mayores para las mezclas que para las correspondientes soluciones sin ellas, pero las diferencias más relevantes se observan en las soluciones de alginato con 2 y 3% de polímero.

Tabla 4.3. Caracterización reológica de las mezcla alginato/células.

Alginato (%)	Número de aguja	Razón alginato/células	$n$ (-)	$K$ ( $Ns^n/m^2$ )	$R$ (-)
4	4	60	0.84	18.22	0.99
3	4	45	0.76	17.00	0.99
2	4	30	0.70	4.02	0.97
1	1	15	0.96	0.32	0.99

Los valores de  $r$  fueron muy buenos (0.97-0.99), mejores que aquellos encontrados en el caso de las soluciones de alginato solo.

En la figura 4.1 se muestra un reograma de velocidad de deformación contra viscosidad para las mezclas alginato-células. Las líneas sólidas corresponden a la ley de potencia. Como se muestra se encontró una buena correlación entre los datos experimentales y el modelo teórico. Las viscosidades de las mezclas alginato/células con proporciones de 45 y 60 fueron muy

#### 4. Resultados y discusión

similares (especialmente a bajas velocidades de deformación), mientras que las viscosidades para las mezclas de proporción alginato/células 30 y 15 son muy diferentes.

#### 4.2.2 Producción de las esferas de alginato

Se prepararon diferentes lotes de esferas de alginato con diferentes condiciones experimentales: presión de aire, concentraciones de alginato, velocidad de alimentación y distancia entre el extrusor y la solución de cloruro de calcio.

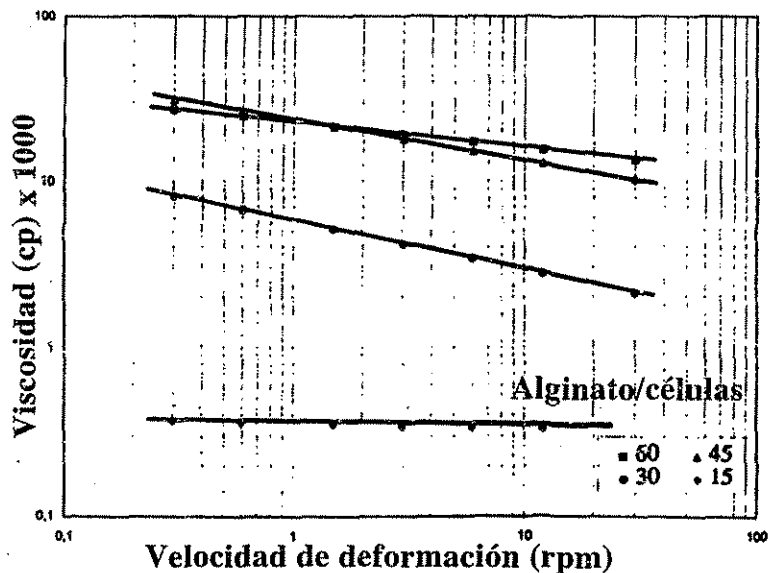


Figura 4.1 Diagrama velocidad de corte-viscosidad para las diferentes mezclas alginato-células.

Se obtuvieron lotes con diferentes distribuciones de tamaño de partícula. Por ejemplo, en la figura 4.2, se muestran los porcentajes de material retenido para concentraciones de alginato entre 1 y 4%. Para cada concentración de alginato se encontró una diferente distribución *i.e.* los tamaños más frecuentes fueron 1.41, 1.13, 0.96 y 0.59 mm para las esferas fabricadas con soluciones de 4, 3, 2, y 1% de alginato, respectivamente. Todas estas pruebas fueron realizadas con una presión de aire de 3 kg/cm<sup>2</sup>. Los resultados que se observaron utilizando las mediciones con Vernier fueron muy semejantes, aunque no se muestran.

#### 4. Resultados y discusión

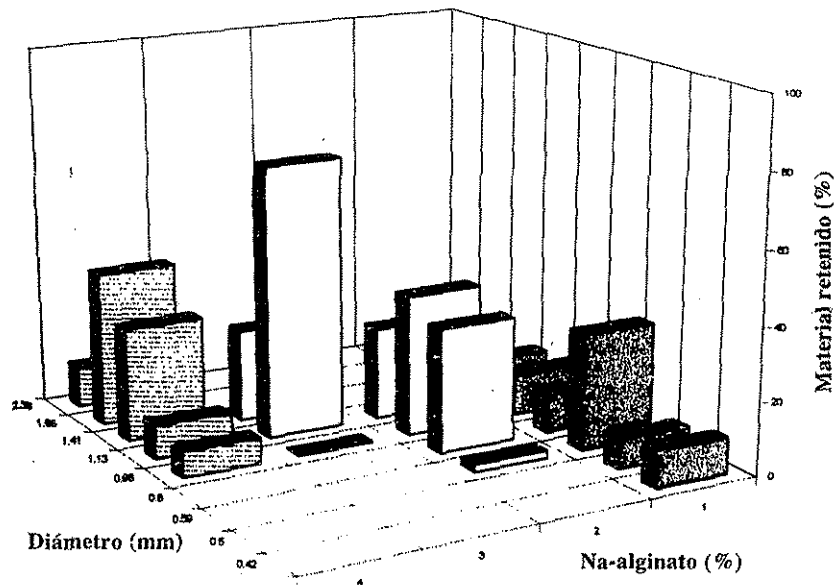


Figura 4.2 Distribución del tamaño de partícula para las esferas fabricadas bajo diferentes condiciones.

Si establecemos que las partículas deben tener un diámetro cercano a 1.5 mm (con el fin de disminuir los problemas de transferencias de masa), la concentración ideal de alginato en las esferas sería de 3%, ya que más del 74% del material generado tendría un diámetro por arriba de 1.17 mm, 2.54% un diámetro de 1.41 mm y solo 1% un diámetro de 0.96% (ver tabla 4.4a).

En el caso de las presiones de aire (para una solución de alginato de sodio del 3%), los diámetros más frecuentes para las presiones de 0, 1, 2, y 3 kg/cm<sup>2</sup> fueron 3.35, 2.38, 1.41 y 1.13 mm con abundancias relativas de 98.5, 86.5, 86.8 y 74.5%, respectivamente (ver tabla 4.4b).

Tabla 4.4a. Producción de las esferas de alginato. Efecto de la presión de aire (Concentración de alginato = 3%).

Presión de aire (kg/cm <sup>2</sup> )	Diámetro (mm)
0	3.35
1	2.38
2	1.41
3	1.13

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

**Tabla 4.4b. Producción de las esferas de alginato. Efecto de la concentración de alginato (Presión de aire = 3 kg/cm<sup>2</sup>).**

Conc. alginato (%)	Diámetro (mm)
1	0.59
2	0.96
3	1.13
4	1.41

**Tabla 4.4c. Producción de las esferas de alginato. Efecto de la velocidad de alimentación. (Concentración de alginato = 3%, presión de aire = 3 kg/cm<sup>2</sup>).**

Vel. Alim. (ml/min)	Diámetro (mm)
1.1	1.13
30	1.13
150	1.13
325	1.13

**Tabla 4.4d. Producción de las esferas de alginato. Efecto de la altura del extrusor (velocidad de alimentación = 325 ml/min, concentración de alginato = 3%, presión de aire = 3 kg/cm<sup>2</sup>).**

Altura (m)	Esfericidad (-)
20	2.61±0.71
40	1.74±0.67
80	1.00±0.00

La velocidad de alimentación no afectó el diámetro de las partículas. Velocidades de entre 1.1 y 325 ml/min condujeron a la obtención de esferas con el mismo diámetro medio de 1.13 mm cuando una solución de 3% de alginato se alimentó a una presión de aire de 3 kg/cm<sup>2</sup> (tabla 4.4c).

Finalmente, la distancia del extrusor a la superficie de la solución curadora no produjo efecto alguno sobre la distribución de tamaños, sino más bien sobre la esfericidad de las partículas generadas. El mejor resultado se obtiene con 0.8 m de distancia, ya que las esfericidades (diámetro mayor/diámetro menor) de las partículas así obtenidas es de alrededor de uno (1). Los materiales generados a menores alturas, produjeron partículas alargadas, con esfericidades de 2.61 y 1.74, respectivamente (tabla 4.4d).

#### 4. Resultados y discusión

En resumen, las condiciones idóneas de fabricación de las esferas de alginato de calcio para obtener partículas con diámetros medios alrededor de 1.5 mm y esfericidades iguales a uno, son una presión de aire de 3 kg/cm<sup>2</sup>, concentración de alginato del 3%, velocidad de alimentación tan alta como sea posible (325 ml/min y más) y una altura de 80 cm aproximadamente.

##### 4.2.3 Caracterización física de las esferas producidas

Las densidades reales de las partículas producidas con diferentes proporciones alginato-células fueron de 1.0066 ml/g ( 0.136%. En el caso de las densidades aparentes, oscilaron entre 0.5673 y 0.9542 ml/g, como efecto de las diferentes concentraciones celulares presentes y en parte como producto de las diferentes distribuciones de tamaños de partícula.

Las diferentes proporciones alginato/células dieron diferentes cargas celulares en UFC/g<sub>soporte</sub>, pero algunas de estas combinaciones resultaron en geles muy débiles. Con base en una observación gruesa de este fenómeno, se considera recomendar la proporción de 2.54/18.8, que equivale a una carga de  $3.85 \times 10^{14}$  UFC/g<sub>soporte</sub>, la cual no es nada despreciable si se compara con otros catalizadores de polímeros. Sánchez de la Vega (1996) reportó una revisión de varios catalizadores preparados con células y polímeros naturales conteniendo de entre  $1 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^8$  UFC/ml de mezcla.

Se desarrollaron algunas pruebas para determinar la cantidad de Ca<sup>++</sup> requerido para el proceso de gelación. La concentración de alginato de sodio resultó de manera muy clara un factor determinante para la determinación de los requerimientos de calcio, pero la proporción mg Ca<sup>++</sup>/mg alginato fué diferente para las diferentes concentraciones de alginato probadas. Cuando no estuvieron presentes las células en el gel, para concentraciones de alginato de 0.5, 1, 2 y 3% las proporciones fueron 2.07, 1.079, 0.835 y 0.78 (esto es, entre mayor sea la concentración de alginato, menor será la proporción mg Ca<sup>++</sup>/mg alginato). Cuando las células de *Pseudomonas* estuvieron presentes en diferentes concentraciones en el gel, las proporciones mg Ca<sup>++</sup>/mg alginato fueron ligeramente superiores. Por supuesto, estos hechos están relacionados con la difusión de los iones de calcio en los geles de alginato de calcio y alginato de calcio-células.



#### 4. Resultados y discusión

Finalmente, un lote promedio de manufactura de esferas fue suficiente para preparar 22.7 g esferas/g alginato y 566 g esferas/l de solución, valores que son importantes para el cálculo de los costos de producción.

##### 4.2.4 Fracción vacía y humedad de las partículas producidas

La fracción vacía es un parámetro de suma importancia en el diseño de la columna empacada, ya que determina parámetros de operación como la caída de presión al interior del sistema y el tiempo de retención requerido para cierto grado de biotransformación. Por ejemplo, el tiempo de residencia para una columna empacada operada en continuo se define por la relación:

$$\Theta = V \varepsilon / Q \quad (1)$$

donde  $\Theta$  es el tiempo de retención hidráulica en horas,  $\varepsilon$  es la fracción vacía (adimensional),  $V$  es el volumen activo de la columna (en litros) y  $Q$  la velocidad de alimentación en litros/hora.

Para determinar el valor de este importante parámetro, es necesario conocer la humedad crítica, como medida del agua libre en la hidratación del gel (Quirazco, 1994). La curva de secado para las esferas de alginato al 3% (de 1.13 mm de diámetro) se muestra en la figura 4.3. La humedad total fue graficada contra la velocidad de pérdida de humedad  $dH/dt$ . La curva está representada por tres secciones:

- a) Donde la evaporación ocurre a altas velocidades,
- b) Donde se establece un equilibrio entre las velocidades de transferencia de masa y calor, y
- c) Donde la velocidad de secado disminuye drásticamente.

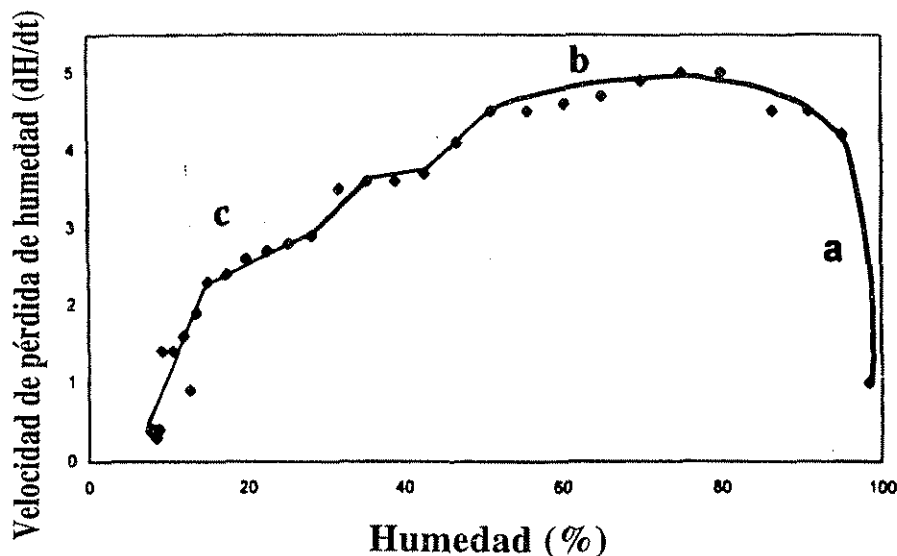


Figura 4.3 Pérdida de humedad vs humedad porcentual para una partícula de alginato de calcio.

Cuando la partícula de alginato alcanza la humedad crítica (el punto que divide a la sección b de la sección c), ésta se rehidrata en una solución 0.1 M de  $\text{CaCl}_2$ . Por diferencia de volúmenes se calcula la fracción vacía (ya que ésta es la relación entre los volúmenes inter e intrapartícula sobre el volumen total).

Las fracciones vacías y la humedad de las partículas de alginato de calcio producidas bajo diferentes condiciones se muestran en la tabla 4.5. Primero, se determinó el efecto de la concentración de alginato de calcio (manteniendo fijo el diámetro de las esferas en 1.13 mm). Se encontró un valor promedio de ( de  $0.6862 \pm 1.3\%$ . Los valores de humedad para este caso oscilaron entre 93 y 96% para las concentraciones de alginato de 3 a 1% (las esferas preparadas con 4% de alginato no se evaluaron).

Cuando se usó una solución de 3% de alginato y se prepararon esferas entre 1.13 y 3.35 mm, la fracción vacía tuvo valores entre 0.634 y 0.694 con diferencias áximas del 10%, que no son significativas. La humedad en todos los casos fue de alrededor del 93%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

Tabla 4.5. Efecto de algunos parámetros sobre la fracción vacía y la humedad de las esferas de alginato de calcio.

Diámetro= 1.13 mm			Conc. Alginato= 3%			Diámetro= 1.13 mm		
Conc. Alginato (%)	$\epsilon$ (-)	Hum. (%)	Diámetro (mm)	$\epsilon$ (-)	Hum. (%)	Radio alginato/células	$\epsilon$ (-)	Hum. (%)
4	ND	92.0	3.35	0.6875	93.0	60	0.6853	83.0
3	0.6862	93.0	2.38	0.6938	93.0	45	0.5777	84.5
2	0.6734	95.0	1.41	0.6346	93.0	30	0.6354	85.5
1	0.6930	96.0	1.13	0.6862	93.0	15	0.6428	87.0

Conc: concentración, Hum: humedad

Finalmente, las esferas de diámetro 1.13 mm y proporciones alginato/células entre 15 y 60 tuvieron fracciones vacías de entre 0.578 y 0.685, con valores de humedad entre 0.83 y 0.87%. Este efecto fue el más interesante, si se compara con el observado para esferas con diferentes diámetros o concentraciones de alginato, pues significa que podemos manipular una fracción vacía deseada, al combinar diferentes proporciones de alginato y células.

#### 4.2.5 Caracterización cinética

En la tabla 4.6 se muestran las constantes cinéticas para la degradación de 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF a diferentes concentraciones, para la ecuación

$$C = C_0 \exp(-k_1 t) \quad (1)$$

Los parámetros reportados son  $C_0$ ,  $k_1$ ,  $t_{1/2}$  y el factor de correlación  $r$ . En términos generales, se observa que los valores de  $C_0$  son similares a las concentraciones iniciales de los experimentos, lo que es normal. Quizás el caso menos afortunado es el de las experiencias con 2,4,6TCF. No fue posible observar ninguna tendencia clara en cuanto a la concentración de los compuestos al inicio del experimento y los valores de  $k_1$ . En el caso del 2CF, ésta varió entre 0.0724 y 0.326.

#### 4. Resultados y discusión

Para las pruebas con 2,4DCF y 2,4,6TCF osciló entre 0.129 y 0.236 y 0.048-0.1583 h<sup>-1</sup>, respectivamente. Es importante recordar que las experiencias desarrolladas con 2,4,6TCF tuvieron una concentración máxima de 300 mg/l, ya que el biocatalizador no es capaz de biodegradar soluciones con concentraciones mayores de clorofenoles.

**Tabla 4.6 Constantes cinéticas obtenidas en la degradación de 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF con las esferas de alginato de calcio.**

Fenol	Parámetro	Concentraciones (mg/l)							
		25	50	70	100	300	500	700	1000
2CF	C <sub>0</sub> (mg/l)	23.83	50.30	62.83	92.02	287.78	462.31	760.14	1004.7
	k (h <sup>-1</sup> )	0.0724	0.0999	0.2424	0.0972	0.2132	0.2140	0.3257	0.2256
	t <sub>1/2</sub> (h)	9.57	6.93	2.85	7.13	3.25	3.28	2.12	3.07
	r (-)	0.89	0.89	0.98	0.89	0.99	0.98	0.98	0.990
2,4DCF	C <sub>0</sub> (mg/l)	20.73	51.96	65.97	79.04	314.16	530.19	602.43	979.08
	k (h <sup>-1</sup> )	0.142	0.1492	0.129	0.1533	0.1961	0.1963	0.2365	0.2512
	t <sub>1/2</sub> (h)	4.88	4.64	5.37	4.52	3.53	3.53	2.93	2.76
	r (-)	0.91	0.98	0.95	0.90	0.97	0.98	0.98	0.99
2,4,6TCF	C <sub>0</sub> (mg/l)	12.5	43.55	68.56	60.18	287.27	NE	NE	NE
	k (h <sup>-1</sup> )	4.37	14.4	5.45	7.24	7.60	NE	NE	NE
	t <sub>1/2</sub> (h)	8.76	28.76	10.9	14.48	15.2	NE	NE	NE
	r (-)	0.62	0.51	0.91	0.51	0.89	NE	NE	NE

NE : No evaluado.

Las tendencias de k<sub>1</sub> no fueron muy claras como se indicó anteriormente. Si los valores de k<sub>1</sub> para los tres compuestos en cuestión se comparan a la concentración de 25 mg/l (la más baja de todos los experimentos), se observará que los más altos valores de k<sub>1</sub> corresponden al 2,4,6TCF, seguido del 2,4DCF y finalmente por el 2CF. Esta tendencia no es la misma para todas las concentraciones. En el caso de las experiencias con 50, 100 y 1,000 mg/l el mayor valor de k<sub>1</sub> se encontró para el 2,4DCF, mientras que para 70, 300, 500 y 700 mg/l, los mejores valores de k<sub>1</sub> fueron para el 2CF.

El valor de t<sub>1/2</sub>, reportado en la tabla 4.6 representa el tiempo requerido para degradar el 50% de la concentración inicial del compuesto tóxico, definido por la ecuación:

$$t_{1/2} = \ln 2/k_1 \quad (2)$$

#### 4. Resultados y discusión

Como se observa en la tabla, los valores de  $t_{1/2}$  para el 2CF fueron 9.57, 6.93, 2.85, 7.13, 3.25, 3.28 y 3.07 horas. Para el 2,4DCF los tiempos de vida media fueron de 4.88, 4.64, 5.37, 4.52, 3.53, 3.53 y 2.76 horas. Finalmente, para el 2,4,6TCF los valores encontrados fueron 4.37, 14.4, 5.45, 7.24 y 7.6 horas.

Es importante mencionar que los valores de  $r$  fueron bastante satisfactorios para los experimentos con 2CF y 2,4DCF (entre 0.89 y 0.99), pero no para todos los experimentos con 2,4,6TCF (0.51-0.91). Esto significa que la degradación del 2,4,6TCF no es tan bien modelada por la ecuación propuesta.

#### 4.2.6 Pruebas de biodegradación con las esferas de alginato de calcio

Las pruebas de biodegradación fueron realizadas con las esferas de alginato empacadas en una columna de 27 ml de capacidad. En la figura 4.4 se muestran los valores experimentales de las pruebas con F, 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF. Las líneas representan la ecuación de primer grado antes propuesta. En la tabla 4.7 se resumen las principales características de las pruebas.

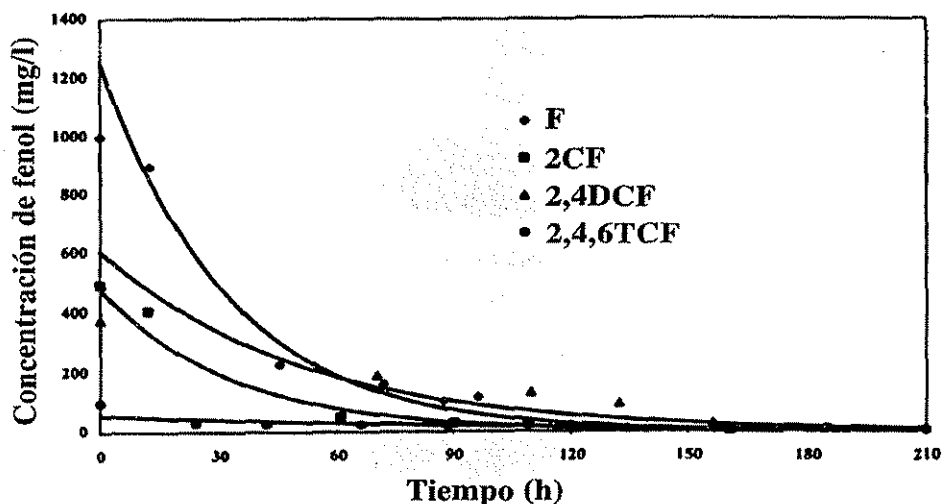


Figura 4.4 Cinética de degradación de clorofenoles con las esferas de alginato de calcio-células.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

**Tabla 4.7. Resultados de las corridas de biodegradación con la columna empacada de alginato de calcio.**

Compuesto	Conc. (mg/l)	UFC/g <sub>soporte</sub>	Tiempo de operación (h)	Remoción (%)	VBD mg/l.día)	VBD específica (mg/UFC.día) x10 <sup>10</sup>
F	1000	1.41x10 <sup>8</sup>	120	98.0	669.2	58.4
2CF	500	1.40x10 <sup>9</sup>	109	95.0	345.9	3.31
2,4DCF	400	6.90x10 <sup>6</sup>	160.5	98.0	190.7	3.86
2,4,6TCF	100	9.60x10 <sup>6</sup>	210	97.0	37.9	55.3

VBD, velocidad de biodegradación

Para el experimento con 1,000 mg/l de F, el tiempo de operación fue de 120 horas, suficiente para degradar el 98% del F inicial, mientras que en el caso del 2CF (500 mg/l), 2,4DCF (400 mg/l) y 2,4,6TCF(100 mg/l) se requirió de 109, 160.5 y 210 horas para alcanzar una remoción total de 95, 98 y 97%, respectivamente.

Estas remociones combinadas con los tiempos de operación generan velocidades de consumo o biodegradación de clorofenoles (VBD). En el caso de las VBD específicas, se tomó en cuenta el promedio de la carga celular en la columna (entre las condiciones iniciales y finales de la prueba) como UFC/g<sub>soporte</sub>. Las VBD estuvieron entre 38 y 670 mg/l.día para el 2,4,6TCF 2,4DCF 2CF < F, congruente con las toxicidades MICROTOX (Blum y Specee, 1991) de dichos compuestos: 1.9,2.0, 18 Y 18 mg/l como EC50.

Dapaah y Hill (1992) estudiaron la biodegradación de una mezcla de F y 4CF con células libres de *Pseudomonas putida*. Ellos reportaron VBD de 64 mg/l.día para 500 mg/l de F y de 13 mg/l.día para 100 mg/l de 4CF.

Westmeier y Rehm (1985) emplearon células de *Alcaligenes sp.* Atrapadas en esferas de alginato de calcio en la degradación de 4CF. Reportaron actividades o VBD de 269-514 mg/l.día para concentraciones de 0.25-0.5 mg/l de 4CF.

Lee *et al.* (1994) estudiaron el uso de una mezcla de seis microorganismos identificados, inmovilizados en alginato de calcio, para la biodegradación de F, 2CF, y 2,4DCF. Estos autores encontraron VBD de 181-1000 mg/l.día para 200-500 mg/l de F, 10-12.96 mg/l.día para 10-35 mg/l de 2CF y 40-80 mg/l.día para 20-40 mg/l de 2,4DCF.

#### 4. Resultados y discusión

Shwu-ling *et al.* (1995) inmovilizaron células de *Rhodococcus sp.* En carbón activado granular y en esferas de alginato de calcio para la degradación continua de F. Ellos probaron el sistema con 500-1500 mg/l de F y encontraron que el sistema con carbón activado granular tuvo VBD de hasta 2,910 mg/l.día, mientras que el biocatalizador de alginato de calcio tuvo VBD de 2,100 mg/l.día. También reportaron que al sistema le tomó 10 días antes de que la concentración del efluente fuese menor que la concentración del influente (periodo de aclimatación).

Comparando los valores reportados en la literatura para algunos catalizadores con los obtenidos en este trabajo, se puede decir que el biocatalizador desarrollado presenta buenas velocidades de biodegradación y es aplicable a fenol y algunos clorofenoles.

### 4.3 CARACTERIZACION DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE SOPORTE

#### 4.3.1 Caracterización de los distintos soportes

Las características fisicoquímicas de los soportes evaluados se resumen en la tabla 4.7. Una mezcla de mallas 12, 14 y 16 (diámetros equivalentes de entre 1.13 y 1.41 mm) de los soportes se caracterizaron como se describió en materiales y métodos. Los contenidos de humedad fueron de 0% para los soportes rígidos y del 93% aproximadamente para el alginato de calcio. La solubilidades en ácido e hidróxido, así como el valor de pérdida por ignición son una manera simple y cuantitativa de caracterizar la dureza de los diferentes materiales. De acuerdo con estos resultados, la arena mostró la mayor dureza, seguida del tezontle y el carbón activado. Es interesante observar que el carbón activado mostró un alto valor de pérdida por ignición (16%). Los valores de porosidad fueron considerablemente altos para todos los catalizadores (entre 52% para la arena y el 68% para el carbón activado). Ya que la técnica del tubo de Jackson no es aplicable a las esferas de alginato de calcio, se reporta el valor de la fracción vacía calculada para el catalizador. Este valor, de 0.74 significa que el 74% del catalizador está formado por agua libre. Finalmente, las densidades de los productos variaron entre 1.38 (para el carbón activado) y 3.15 mg/ml para la arena.

#### 4. Resultados y discusión

Tabla 4.8 Características fisicoquímicas de los soportes.

Material	Densidad aparente (g/ml)	Densidad real (g/ml)	Porosidad (%)	Solubilidad en HCl (%)	Solubilidad en NaOH (%)	Pérdida por ignición (%)
Arena	1.49	3.15	51.81	0.221	0.321	0.45
Tezontle	0.77	2.60	65.09	3.23	1.36	0.73
Carbón activado	0.27	1.38	68.00	17.60	11.66	16.11
Ca-alginato	0.95	2.01	$\epsilon = 0.74$	NE	NE	NE

$\epsilon$  Representa la fracción vacía promedio, NE no evaluado

#### 4.3.2. Determinación de la colonización de los diferentes soportes por

##### *Pseudomonas fluorescens*

En la tabla 4.9 se muestran las UFC/g<sub>soporte</sub>, UFC/ml<sub>soporte</sub> y UFC/ml<sub>columna</sub>, medidos con el método antes descrito. Las UFC/g<sub>soporte</sub> encontradas estuvieron entre  $8.43 \times 10^4$  y  $4.69 \times 10^{15}$ , para la arena y el carbón activado, respectivamente. Klein y Ziehr (1990) reportaron un intervalo de biomasa inmovilizada en carbón activado y vidrio poroso de  $1.86 \times 10^6$  y  $4.0 \times 10^9$  UFC/g<sub>soporte</sub>, respectivamente. Los valores encontrados para el carbón activado en este trabajo para tezontle y carbón activado, son bastante altos si se comparan con los reportados por Klein y Ziehr (1990).

Tabla 4.9 Cargas celulares evaluadas para los diferentes soportes.

Soporte	Porosidad (%)	UFC/g <sub>soporte</sub>	UFC/ml <sub>soporte</sub>	UFC/ml <sub>columna</sub>
Arena	51.81	$8.43 \times 10^4$	$2.67 \times 10^4$	$5.67 \times 10^3$
Tezontle	65.09	$1.39 \times 10^{11}$	$5.34 \times 10^{10}$	$1.80 \times 10^{11}$
Carbón activado	68.00	$4.69 \times 10^{15}$	$3.39 \times 10^{15}$	$1.73 \times 10^{16}$
Alginato de calcio	$\epsilon = 0.74$	$3.85 \times 10^{14}$	$1.91 \times 10^{14}$	$4.03 \times 10^{14}$

En la misma tabla se reportan los valores de porosidad o de fracción vacía de los soportes caracterizados. Si se compara este valor con el de las UFC atrapadas en el soporte, parece haber una relación. Schneider et al., 1990, evaluaron el factor asociado a superficie en la formación de biopelículas, especialmente en el efecto de la porosidad del material sobre la formación de la biopelícula.



#### 4. Resultados y discusión

En la tabla 4.10 se presentan los resultados de la caracterización de los soportes en cuanto a su capacidad de adsorber fenol y/o clorofenoles. Algunos de los valores de  $n$  y  $K$  de la ecuación de Freundlich reportados en la literatura se incluyen con fines comparativos.

Tabla 4.10 Características de adsorción de los soportes estudiados.

Soporte	Compuesto	Adsorción máxima (%)	K	n	R
Carbón activado	Fenol	79.84	2.00	1.93	0.99
			0.0478 <sup>a</sup>	2.44 <sup>a</sup>	NR <sup>a</sup>
	2-clorofenol	94.03	322.40	1.48	0.94
		NR <sup>b</sup>	262.5b	11.90 <sup>b</sup>	NR <sup>b</sup>
	2,4-diclorofenol	99.74	238.28	1.87	0.98
	2,4,6-triclorofenol	99.84	147.53	2.25	0.97
Tezontle	Fenol	8.12	1.68	1.49	0.95
Ca-alginato	Fenol	13.21	1.59	1.52	0.96
Arena	Fenol	0	-	-	-

<sup>a</sup>De Singer y Yen, 1980.

<sup>b</sup>de Vidic *et al.*, 1992., NR no reportado.

#### 4.3.3 Caracterización de las mezclas de tezontle

La caracterización del material con distintas distribuciones de tamaño de partícula se muestra en la tabla 4.11. Se encontraron diferencias entre las distintas mezclas. Las densidades aparentes se presentaron en el intervalo de 0.77 a 0.93 mg/l. Los valores de solubilidad, como ya se indicó anteriormente emulan una prueba acelerada de desgaste de materiales. La mezcla con mayor dureza es la proporción de gruesos, seguida por la de finos y finalmente los medios. Con respecto a la capacidad de las mezclas de ser colonizadas por la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, es interesante notar que los finos y medios lograron una buena adhesión celular (alrededor de  $10^9$  UFC/g<sub>soporte</sub>), pero la porción de gruesos mostró la mejor carga celular (alrededor de  $10^{11}$  g<sub>soporte</sub>). Quizás el parámetro más interesante a evaluar sea la porosidad del material. De acuerdo con este

#### 4. Resultados y discusión

parámetro, la mezcla de medios tuvo la mayor porosidad (65%), seguida de los finos (44%) y al final la porción gruesa (21%). Ya que ésta es una característica muy importante para la selección del empaque de la columna, se decidió utilizar la mezcla de los medios en la columna de 5 litros.

**Tabla 4.11 Caracterización de las mezclas de tezontle.**

Mezcla	Mallas	Porosidad (%)	Densidad aparente (g/ml)	Densidad real (g/ml)	Sol en HCL (%)	Sol en NaOH (%)	UFC/g <sub>support</sub>
Finos	16, 18 y 20	44.08	0.9378	1.7	3.47	0.897	8.5x10 <sup>9</sup>
Medianos	12, 14 y 16	65.09	0.7700	2.6	3.23	1.360	1.4x10 <sup>9</sup>
Gruesos	6, 8 y 10	61.28	0.8594	2.2	1.88	0.197	1.7x10 <sup>11</sup>

### 4.4 DEGRADACION DE COMPUESTOS FENOLICOS SIMPLES EN OPERACIÓN POR LOTE. COLUMNA DE 27 ML DE CAPACIDAD

#### 4.4.1 Comparación del desempeño de las columnas empacadas con carbón activado, tezontle y alginato de calcio

Se llevó a cabo una comparación del desempeño de las columna empacadas con alginato de calcio, tezontle y carbón activado. En la Tabla 4.12 se muestran las remociones porcentuales, los tiempos de degradación y las velocidades de biodegradación calculadas. Se debe recordar que se fijó trabajar con una eficiencia de remoción igual o mayor al 95%.

#### 4. Resultados y discusión

**Tabla 4.12. Resultados de las pruebas con la columna empacada con tezontle, alginato de calcio y carbón activado.**

Empaque	Compuesto tóxico y conc., mg/l	Peso de soporte (g)	Biomasa (UFC/g <sub>cat</sub> )	Degradación (%)	Tiempo (horas)	Act volumétrica mg <sub>fenol</sub> /l.día)
Tezontle	Fenol, 100	31.74	$2,48 \times 10^9$	95,4	96	82
Tezontle	Fenol, 500	31.72	$5,67 \times 10^{11}$	95,0	216	181
Tezontle	Fenol, 1000	31,60	$2,64 \times 10^7$	95,2	190	413
Alginato de calcio	Fenol, 1000	23,65	$2,80 \times 10^8$	97,5	120	669
Carbón activado	Fenol, 1000	6,64	$7,63 \times 10^9$	100,0	24	3,422

Primero hay que observar las diferencias entre las experiencias degradando fenol a 100, 500 y 1,000 mg/l en la columna de tezontle. La cantidad de soporte en la columna se mantuvo constante. La carga biomásica reportada corresponde a los valores al finalizar la prueba y como se ve, osciló entre  $10^7$  y  $10^{11}$  UFC/g<sub>cat</sub>. Es difícil repetir experiencias en la columna con una misma cantidad de biomasa fija, ya que ésta varía de prueba a prueba. Los valores de biodegradación para las tres pruebas fueron de más del 95% para tiempos de 96, 216 y 190 horas, respectivamente. Calculando las velocidades volumétricas, encontramos valores de 82, 182 y 413 mg/l.día, lo que significa un aumento de la actividad en un 200 y 400% con respecto a la actividad inicial de la columna.

Al comparar las experiencias con la columna empacada con tezontle, con las esferas de alginato de calcio y carbón activado, es importante observar algunos elementos importantes. Dadas las diferencias en la densidad real de los soportes, la cantidad de soporte utilizado en la columna es muy dispar (31.6, 23.6 y 6.6 g, respectivamente). Por otro lado, el sistema de inmovilización para las tres columna es distinto. En el caso del tezontle, la inmovilización es del tipo de adsorción en un soporte muy poroso, mientras que en el caso del alginato de calcio, se trata de una inmovilización por atrapamiento. Finalmente, para el caso del carbón activado, se trata de una inmovilización por adsorción a un soporte conocido por sus excelentes características de adsorción.

Estos elementos se ven reflejados en los resultados de la prueba. Las concentraciones de células medidos al final fueron de órdenes de magnitud diferentes  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  UFC/g<sub>catalizador</sub>.

#### 4. Resultados y discusión

para las pruebas con tezontle, alginato de calcio y carbón activado respectivamente. Las degradaciones alcanzadas fueron de 95.2 , 97.5 y 100%, pero los tiempos de degradación fueron de 190,120 y 24 horas, respectivamente. Estas grandes diferencias en el tiempo dan como resultado actividades volumétricas de 413, 669 y 3,422 mg/l.día, esto es un aumento de mas de 1 50% y 800% si se considera como base la actividad de la columna de tezontle. No hay que olvidar las características de adsorción del carbón activado, en comparación con las del alginato de calcio y el tezontle, así como sus capacidades para retener células, fundamentalmente.

Ya que el excelente desempeño del carbón activado se debe a su gran capacidad de adsorción, lo cual significa que los compuestos no son modificados, sino solo cambian de fase, este no fue seleccionado para ser utilizado como soporte para las bacterias con capacidad de degradación de clorofenoles.

A partir de este punto, todas las pruebas que se presentan fueron realizadas con el catalizador de tezontle inoculado con *Pseudomonas fluorescens*.

##### **4.4.2 Algunas pruebas de degradación de clorofenoles solos en la columna empacada con tezontle**

Se llevaron a cabo algunas pruebas de degradación de clorofenoles por separado. Los resultados más relevantes se muestran en la tabla 4.13 Como se puede observar la concentración inicial de fenoles no fue la misma para las diferentes pruebas. Se reportan los resultados en cuanto a la desaparición de fenol o COT al tiempo final y a las 24 horas de proceso. También se indica la variación en el F de las muestras y el valor promedio de UFC/g<sub>soporte</sub> a fin de tomar la carga celular en cuenta.

##### **4.4.3 Biodegradación de clorofenoles con las células inmovilizadas**

Como se puede observar en las figuras 4.5, 4.6 y 4.7, *P. fluorescens* degradó el 2 clorofenol (2CF), 2,4 diclorofenol (2,4DCF) y 2,4,6 triclorofenol (2,4,6TCF) en concentraciones máximas de 700, 700 y 800 mg/l, respectivamente. En términos generales, la mayor proporción de clorofenoles

#### 4. Resultados y discusión

fueron degradados durante las primeras 24 horas. Las actividades volumétricas (mg/l.día) de las columnas empacadas, serán discutidas en los siguientes apartados.

**Tabla 4.13. Resultados de las pruebas de degradación de clorofenoles por separado.**  
Remociones y UFC/g<sub>soporte</sub>

Compuesto (mg/l)	Remoción porcentual %				pH <sub>i</sub> /pH <sub>f</sub>	ΔpH	UFC/g <sub>soporte</sub>
	F (24 h)	F (total)	COT (24 h)	COT (total)			
*					*	*	*
2CF (500)	93.02	98.18	60.84	60.84	6.22/6.3	0.08	5x10 <sup>7</sup>
2,4DCF (500)	92.50	96.49	50.70	56.55	6.80/7.0	0.20	3.4x10 <sup>7</sup>
2,4,6TCF(400)	92.29	93.68	46.93	48.06	6.50/7.0	0.50	1x10 <sup>4</sup>
PCF (200)	35.08	71.21	23.73	27.69	6.11/6.36	0.25	1.1x10 <sup>6</sup>

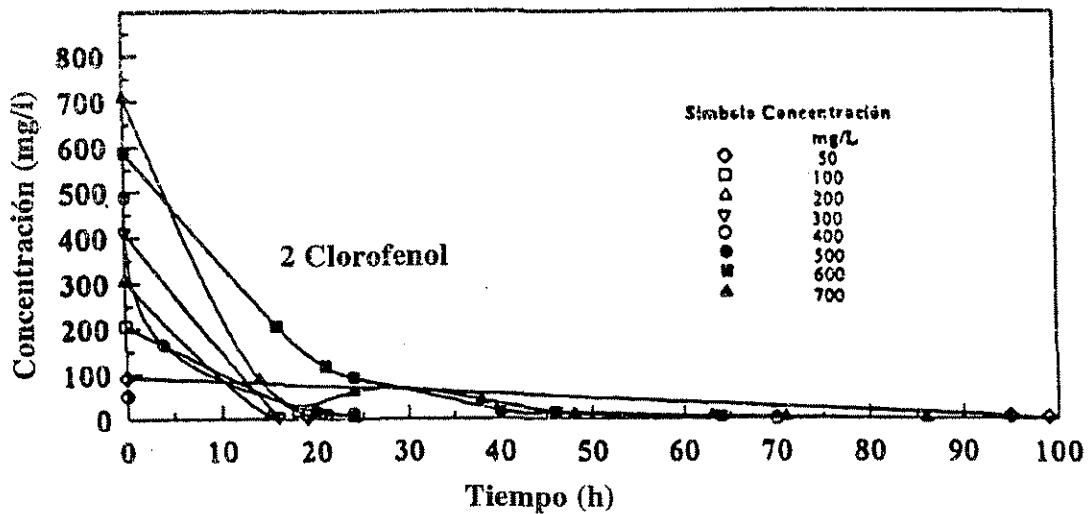


Figura 4.5 Cinética de degradación de 2CF.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

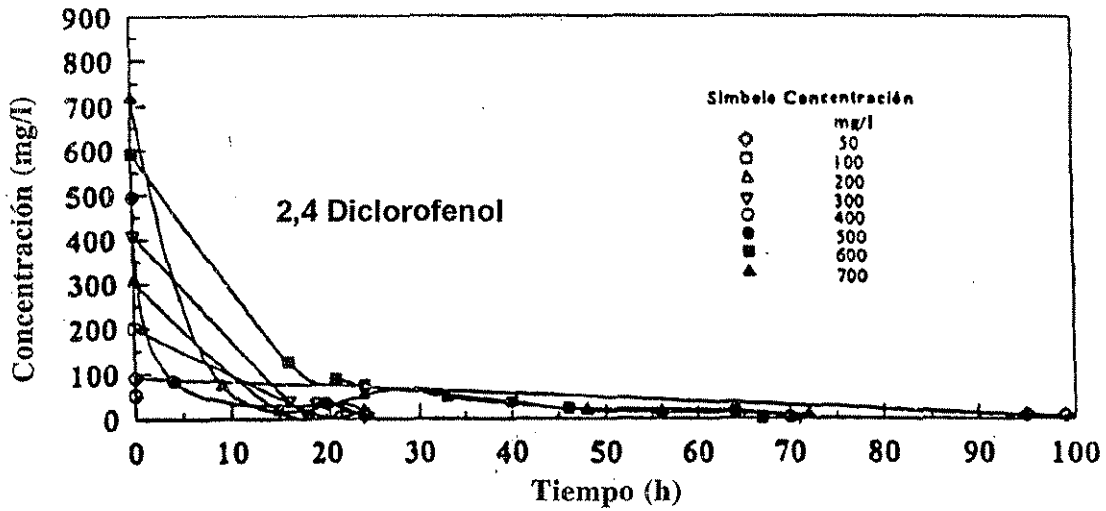


Figura 4.6 Cinética de degradación de 2,4DCF.

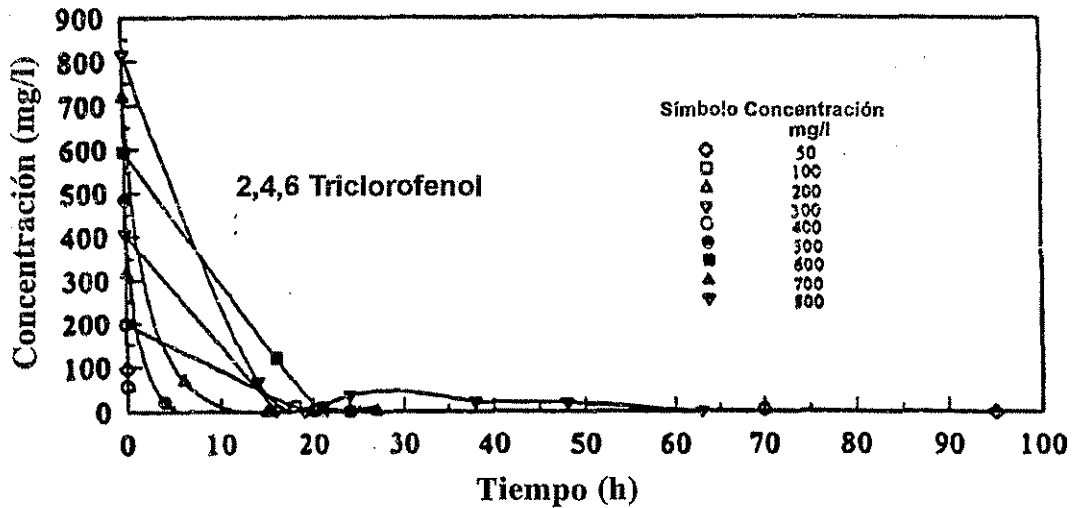


Figura 4.7 Cinética de degradación de 2,4,6TCF.

#### 4.4.4 Desarrollo del material celular en la columna

En la figura 4.8 se presenta el contenido de células en las tres columnas empacadas con tezontle, en función de la concentración del compuesto tóxico empleado. Como se puede observar, los niveles de células oscilaron entre  $10^4$  y  $10^{10}$  UFC/g soporte. La tendencia observada en la gráfica es la siguiente: a medida que la concentración de la sustancia tóxica se incrementa, la biomasa crece,

#### 4. Resultados y discusión

lo que significa que hay asimilación. Este comportamiento fue el mismo para los tres compuestos hasta una concentración de 200-300 mg/l. A partir de este punto la biomasa se mantuvo constante, para empezar a decrecer a los 300 y 400 mg/l, dependiendo de el compuesto tóxico en cuestión, lo que implicaría que empieza a haber efectos tóxicos. Extrañamente, para la concentración de 600 mg/l (en los tres casos) se observó un nuevo incremento en la biomasa total. No se tiene una explicación para este efecto.

Estas observaciones indican que a mayor cantidad de sustrato carbonado sea suministrado, mayor será la producción de células, mientras no se alcancen niveles de concentración que presentan un efecto inhibitor al sistema (200-300 mg/l).

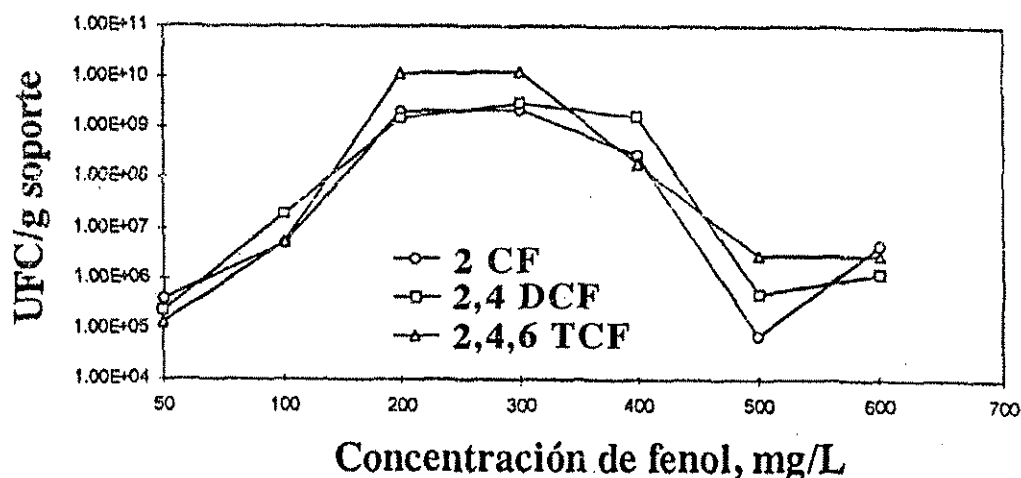


Figura 4.8 Carga celular de la columna empacada.

En las siguientes secciones se discute la actividad de las columnas, cuyo valor refleja también el efecto inhibitor que los compuestos fenólicos producen sobre las células.

#### 4.4.5 Relación entre la actividad de la columna y la concentración del compuesto tóxico empleado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

En la figura 4.9 se resumen las actividades volumétricas de las columnas empacadas cuando trataron 2CF, 2,4 DCF y 2,4,6TCF. Las actividades oscilaron entre 50 y 2,500 mg/l.día, dependiendo de la sustancia tóxica y su concentración. En términos generales la actividad fue mayor entre más alta fue la concentración del clorofenol. Esta tendencia cambió a una concentración de 500, 400 y 600 mg/l para el 2CF, 2,4 DCF y 2,4,6TCF, respectivamente. A partir de este punto la actividad empezó a disminuir en todos los casos. Se puede generalizar diciendo que las actividades volumétricas fueron iguales para los tres compuestos en el intervalo de 50-200 mg/l. Entre 200 y 500 las actividades para cada compuesto se separan. Las mejores actividades las presentó la columna alimentada con 2,4,6TCF, seguida de la columna alimentada con 2CF y finalmente la alimentada con 2,4DCF. Por arriba de 500 mg/l las actividades de la columna con 2CF y 2,4 DCF son muy similares e inversamente proporcionales a la concentración de cada compuesto. Finalmente, la actividad de la columna que trató 2,4,6 TCF aumentó hasta los 600 mg/l y disminuyó un poco a los 700 mg/l, pero con un valor superior a cualquier otra actividad de columna alimentada con 2CF o 2,4 DCF. Hasta esta etapa las pruebas fueron presuntivas o preeliminares, con el fin de seleccionar los parámetros definitivos que se considerarán en el diseño estadístico de los siguientes experimentos.

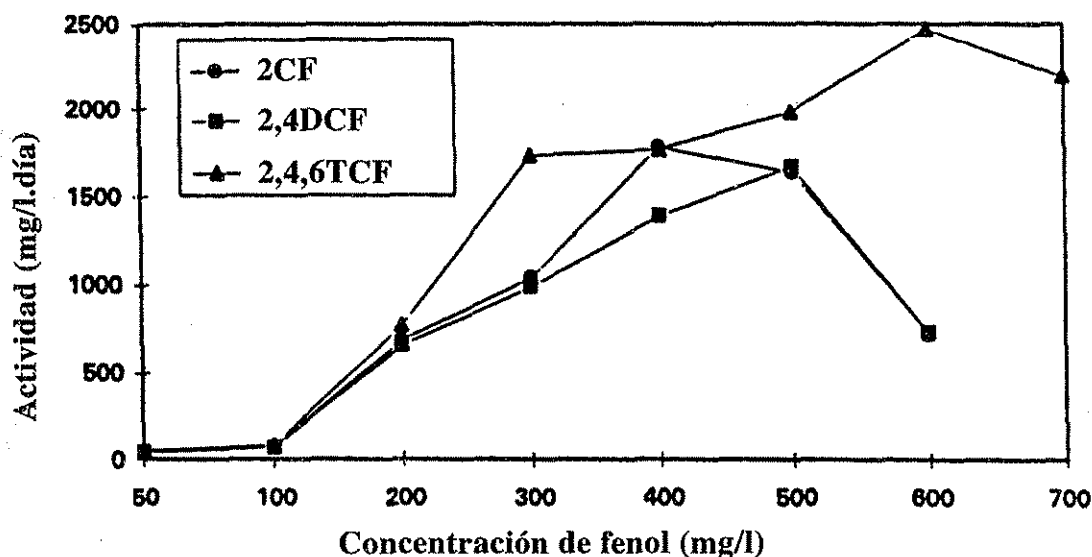


Figura 4.9 Actividad de la columna de tezontle en función de la concentración de tóxicos.



## 4.4.6 Operación de la columna de 27 ml. Clorofenoles simples

El sistema fue capaz de remover entre el 90 y el 100% de la concentración inicial de fenol o clorofenoles. Las máximas concentraciones probadas fueron 1000, 600, 600, 700 y 300 mg/l para el F, 2CF, 2,4DCF, 2,4,6TCF y PCF, respectivamente. En la figura 5.10 se muestra un diagrama típico de la degradación de dichos clorofenoles. En este caso se trata del 2,4,6TCF a una concentración inicial de 600 mg/l. Las barras indican la variabilidad de tres experimentos desarrollados de forma no secuencial. Además, los resultados de una prueba abiótica (en la que la columna fue empacada con tezontle estéril). Como se observa, el 2,4,6CF no desaparece abióticamente. En general, el tiempo de degradación fue muy dependiente del tipo de compuesto tóxico y su concentración. Para todos los clorofenoles probados, la mayor parte del material se degradó en las primeras 24 horas, pero el proceso fue detenido hasta que se alcanzó una eliminación del 95%. Entre más grande fue la concentración inicial, más corto fue el tiempo de proceso para concentraciones entre 50 y 600 mg/l. Para el experimento de 700 mg/l, se observó un incremento en el tiempo del proceso. Este comportamiento fue el mismo para todos los clorofenoles.

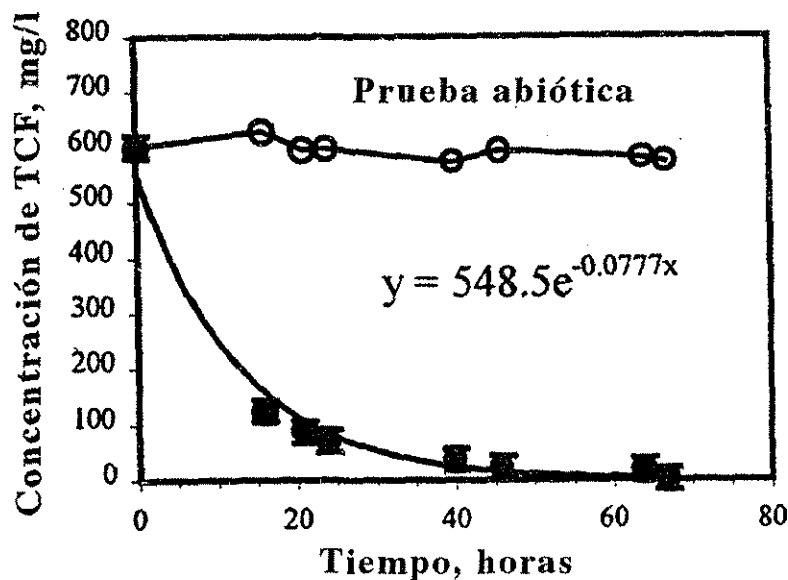


Figura 4.10. Variabilidad de las pruebas y resultados de la prueba abiótica. (2,4,6TCF, 600 mg/l).

#### 4. Resultados y discusión

Las actividades de la columna empacada o velocidades de biodegradación VBD (en mg/l.día) toman en cuenta la cantidad de material degradado, el volumen empleado y el tiempo de proceso. Estas actividades fueron calculadas para todos los experimentos y se presentan en la tabla 4.14.

**Tabla 4.14. Velocidades de biodegradación o actividades de la columna empacada con tezontle, en mg/l.día.**

Concentración, mg/l	Velocidad de biodegradación VBD, en mg <sub>fenol</sub> /l.día				
	F	2CF	2,4DCF	2,4,6TCF	PCF
50	-	43	45	52	16
100	82	73	69	83	16
200	-	688	656	770	204
300	-	1,038	986	1,731	100
400	-	1,779	1,388	1,765	-
500	132	1,638	1,669	1,983	-
600	-	72	729	2,043	-
700	-	-	-	2,193	-
1000	413	-	-	-	-

Como procedimiento general, cada compuesto fue probado en concentraciones sucesivas hasta que se observó una disminución en la velocidad de biodegradación. En el caso del fenol, sólo se probaron concentraciones de 100, 500 y 1000 mg/l. Es interesante notar que las velocidades de biodegradación de los clorofenoles resultaron mayores a las del fenol, a pesar de que éstos son más tóxicos que el compuesto no-sustituído. No se tiene una explicación detallada sobre este comportamiento, que no corresponde con el reportado por otros autores. Dapaah y Hill (1992) midieron la degradación de fenol y 4-clorofenol por medio de células libres de *Pseudomonas putida*. Ellos alcanzaron actividades o velocidades de biodegradación de 64 mg/l.día para 500 mg/l de fenol y 13 mg/l.día para 100 mg/l de 4-clorofenol. Westmeier y Rehm (1985) emplearon células de *Alcaligenes sp.* atrapadas en esferas de alginato de calcio para la degradación de 4-clorofenol. Ellos reportaron actividades en el intervalo de 269 a 514 mg/l.día para concentraciones iniciales de 0.25 a 0.5 mg/l de clorofenol. Por otro lado, Lee *et al.* (1994) estudiaron el uso de una mezcla de 6 microorganismos identificados, inmovilizados en esferas de

#### 4. Resultados y discusión

alginate de calcio en la biodegradación de fenol, 2clorofenol y 2,4diclorofenol. Estos autores reportaron actividades de 181-1000 mg/l.día para concentraciones de 200 a 500 mg/l de fenol, de 10 a 12.96 mg/l.día para 10 a 35 mg/l de clorofenol y de 40 a 80 mg/l.día para 20 a 40 mg/l de diclorofenol. En el caso del pentaclorofenol no hay mucha información disponible en cuanto a sistemas inmovilizados, pero existe una excelente revisión sobre la degradación de pentaclorofenol, publicada por McAllister *et al.*, 1996.

#### 4.4.7 Carga biomásica del biofiltro

Es necesario resaltar que todas las remociones y velocidades de biodegradación reportadas están relacionadas con la carga másica. En la figura 4.11 se muestra la carga celular de la columna medida como las UFC/g<sub>soporte</sub> para las diferentes experiencias de biodegradación.

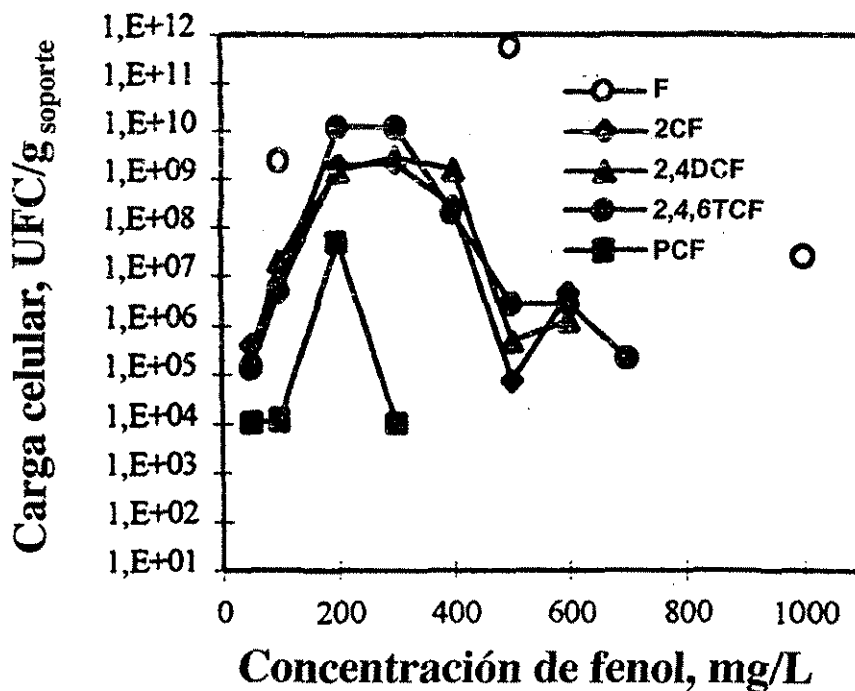


Figura 4.11 Carga biomásica como una función de la concentración de fenoles en la prueba.

Los valores de UFC/g<sub>soporte</sub> para las columnas alimentadas con 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF son muy similares entre sí. En todos los casos iniciaron con una carga de alrededor de  $10^5$  y

#### 4. Resultados y discusión

aumentaron a medida que la concentración del tóxico fue incrementada hasta valores de  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/g<sub>soporte</sub>, para concentraciones de 200-300 mg/l de los clorofenoles. A partir de este valor, se observó un decremento en la carga celular hasta valores de  $10^5$ - $10^6$  que fueron alcanzados a concentraciones de alrededor de 500 mg/l. Después de este punto se observa un nuevo incremento en los valores de UFC/g<sub>soporte</sub>, pero no se tiene una explicación para este fenómeno. Seguramente, estos eventos están relacionados con la toxicidad del efluente y del afluente generado. Con el fin de investigar este aspecto, se sugiere trabajar con más de una columna por separado, con la misma carga celular (tan cercanas como puedan ser), para efectuar pruebas con diferentes concentraciones de clorofenoles al mismo tiempo, sin el efecto de la historia de la columna.

En el caso del PCF, la concentración inicial de biomasa fue de  $10^4$  UFC/g<sub>soporte</sub> cuando la concentración del compuesto llegó a 200 mg/l, la carga fue de  $10^7$  UFC/g<sub>soporte</sub>. Finalmente, a las mayores concentraciones de pentaclorofenol (300 mg/l) la biomasa fue de alrededor de  $10^4$  UFC/g<sub>soporte</sub>. En todos los casos la carga celular fue menor que la entrada para los demás clorofenoles.

La columna que sólo trató F presentó, en cambio, mayores concentraciones de carga celular. Empezó con un valor de aproximadamente  $10^9$  UFC/g<sub>soporte</sub> y alcanzó hasta  $10^{12}$  UFC/g<sub>soporte</sub> para el caso de una concentración de F de 500 mg/l. Para la prueba de 1000 mg/l, se tuvieron concentraciones de hasta  $10^7$  UFC/g<sub>soporte</sub>. Empleando la curva de peso seco desarrollada, se calcula que el promedio de biomasa en base seca en la columna fue de alrededor a 0.42 mg/l.

#### 4.4.8 Efecto de la relación C/N sobre la VBD de la columna

Durante los experimentos de degradación antes descritos, se utilizaron las sales minerales incluidas en el medio Dapaah y Hill (1992). En esta serie de experimentos se varió la relación C/N modificando la proporción de la fuente de nitrógeno ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) y manteniendo la cantidad de fuente de carbón. La relación C/N fue fijada a valores de entre 0.5 y 2 para el 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF a una concentración inicial del CF de 300 mg/l. Las experiencias de degradación se detuvieron al alcanzar al menos 95% de degradación. Se calcularon las actividades de la columna y se graficaron contra la relación C/N. En la figura 4.12, se muestra el comportamiento de esta

#### 4. Resultados y discusión

función para el caso del 2,4,6TCF. Como se muestra claramente, existe una función inversamente proporcional entre la actividad de la columna y la razón C/N. Este comportamiento es igual para los otros dos compuestos y tiene interesantes implicaciones para la operación del biofiltro. La necesidad de adicionar nitrógeno al influente a tratar, es común para algunos sistemas de tratamiento biológico. Si se determinan adecuadamente las relaciones C/N requeridas, es posible manipular la actividad biológica de la columna, disminuyendo el volumen requerido para alcanzar las eficiencias de remoción necesarias.

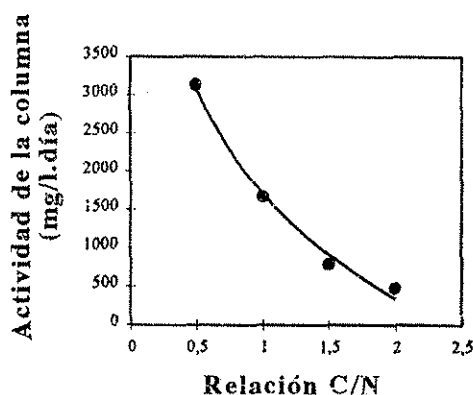


Figura 4.12. Velocidades de biodegradación de la columna como una función de la relación C/N.

#### 4.4.9 Degradación de clorofenoles y COT

En la figura 4.13 se muestran los valores de COT en la biodegradación de 2CF, 2,4DCF, 2,4,6TCF y PCF. Es notable que mientras el valor de COT para el mono-, di- y triclorofenol se ve reducido considerablemente, para el caso del penta-sustituído este valor es prácticamente constante en el mismo periodo. De hecho el experimento con PCF se continuó por más de 100 horas y ningún cambio fue detectado. Las líneas sólidas muestran los datos de biodegradación ajustados a una ecuación del tipo  $COT = COT_0 e^{-k_2t}$ , donde  $COT_0$  es la cantidad inicial de COT,  $k$  es una constante cinética y  $t$ , el tiempo de proceso.

#### 4. Resultados y discusión

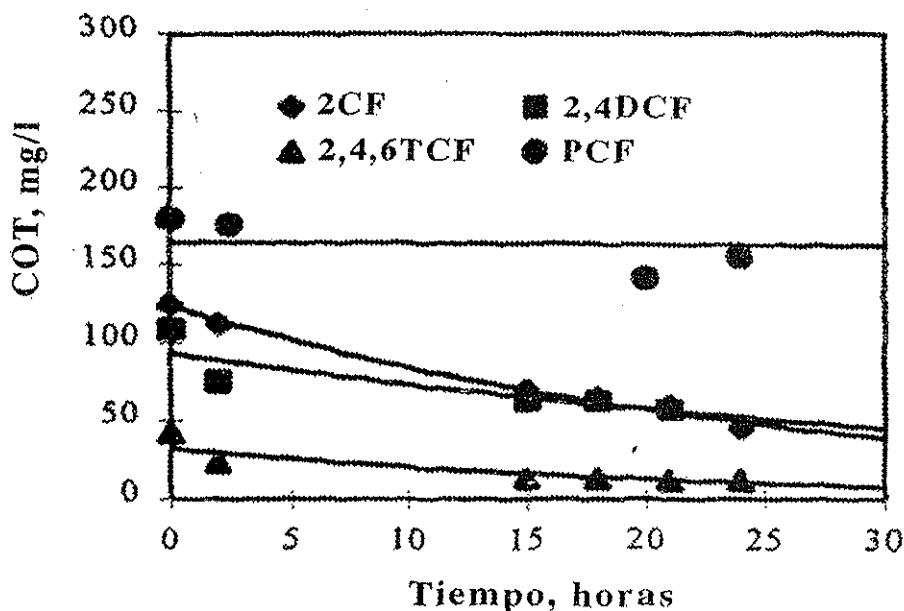


Figura 4.13. Valores de COT en función del tiempo de degradación.

Los valores de remoción de CF y COT se encuentran reportados en la tabla 4.14. Se presentan los valores de la degradación de fenoles y COT a las 24 horas de proceso, cuando la mayor parte del 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF han sido removidos. Las remociones de COT fueron del orden del 63, 47, 71 y 14% del 2CF, 2,4DCF, 2,4,6TCF y PCF, respectivamente. Estas remociones representan el 73,53, 75 y 24% de los fenoles removidos. Es interesante observar que los mayores valores corresponden al 2,4,6TCF (el segundo mejor valor en cuanto a la VBD) y el 2,4DCF (el tercer valor en relación a la VBD). El valor más bajo corresponde al PCF, tres veces menor que el de los otros compuestos mencionados. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a un pH inicial de 7.0, y aunque no se siguieron cinéticas de pH durante el proceso, se midió este valor al finalizar 24 horas y se encontraron valores de pH de 5.9, 6.1, 6.1 y 6.9 respectivamente. Una vez más se observa la similitud entre los procesos de degradación de los clorofenoles y el del pentaclorofenol específicamente. La observación de estas evidencias, junto con algunas experiencias llevadas a cabo con ayuda de la cromatografía de gases, hace pensar que el

#### 4. Resultados y discusión

mecanismo de degradación del los CF es la decoloración del intermediario alifático después de la ruptura del anillo aromático (para el 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF) como ha sido sugerido por Uotila(1993) para la decoloración de mono y diclorofenoles por los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Rhodococcus*. En cuanto al mecanismo de degradación del PCF, el mecanismo es evidentemente otro, quizás la dehidroxilación, como lo revisa Uotila (1993) para la degradación de fenoles policlorados por los géneros *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* y *Flavobacterium*.

**Tabla 4.15. Remoción de CF's y COT a las 24 horas de proceso.  
Concentración de 300 mg/l. para cada CF.**

Concepto	2CF	2,4DCF	2,4,6TCF	PCF
Remoción de CF, %	86	89	94	59
Remoción de COT, %	63	47	71	14
CF/COT, %	73	53	75	24
pH	5.9	6.1	6.1	6.9

## 4.5 DEGRADACION DE MEZCLAS DE FENOLES EN OPERACIÓN POR LOTE. COLUMNA DE 54 MILILITROS DE CAPACIDAD

### 4.5.1 Biodegradación de las mezclas de clorofenoles

Las concentraciones de clorofenoles en las muestras fueron de 200, 400, 600 y 800 mg/l. En la figura 4.14 se muestran los perfiles de concentración de fenoles totales (medidos con el método de la antipirina) como una función del tiempo. Las corridas de biodegradación fueron interrumpidas al alcanzar una remoción de clorofenoles del 95%, salvo en el caso de la experiencia con 800 mg/l. Para las experiencias con 200, 400 y 600 mg/l de CF los tiempos aproximados fueron de 123, 64 y 89 horas respectivamente, aunque la mayor parte del material desapareció en las primeras 15 a 20 horas. El caso de la mezcla de 800 mg/l fue completamente diferente. El experimento fue detenido a las 281 horas, pero la remoción de fenoles totales no alcanzó más del 50%. Algunos problemas con el método de la aminoantipirina fueron detectados, como la formación de colores diferentes a los esperados. Se decidió detener la prueba y hacer los análisis de las concentraciones iniciales y finales por medio de cromatografía acoplada a espectrometría de masas.

En la figura 4.14 las líneas sólidas representan la ecuación

$$CF = CF_0 \exp(-k_1 t) \quad (2)$$

donde  $CF_0$  es la concentración inicial de clorofenoles (mg/l),  $k_1$  es una constante cinética ( $\text{horas}^{-1}$ ) y  $t$ , el tiempo de proceso (horas). Los resultados son resumidos en la tabla 4.16, con concentraciones iniciales y finales determinadas por cromatografía de gases. Como se muestra, estos resultados son similares a los reportados en la figura 4.17. Al final de la experiencia con 200 mg/l solo 26.23 mg/l de CF permanecieron (remoción del 87 %), dando una velocidad de biodegradación de solo 33.9 mg/l.día. En el experimento con 400 mg/l permanecieron sólo 10.8 mg/l de clorofenoles totales (remoción del 97.29%), dando una VBD de 145.9 mg/l.día. La tercera experiencia dió los mejores resultados, ya que sólo 17.84 mg/l de los 600 iniciales fueron



#### 4. Resultados y discusión

detectados al final de la experiencia (remoción del 97.02%), dando una VBD de 156 mg/l.día. La prueba con la concentración mayor falló, ya que 699 de los 800 mg/l iniciales permanecieron al final del proceso (remoción del 12.56%), dando una VBD de 8.58 mg/l.día.

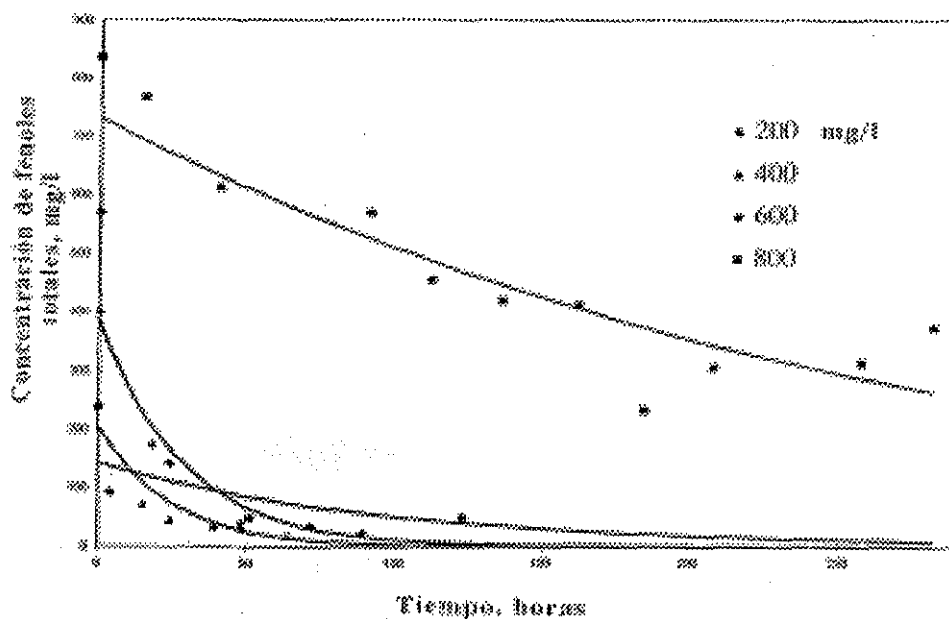


Figura 4.14 Cinética de degradación de fenoles totales en función del tiempo para las mezclas de 200, 400, 600 y 800 mg/l de CFT.

Tabla 4.16. Biodegradación de las mezclas de clorofenoles.

Conc. inicial mg/l	Conc. final mg/l	Remoción %	Tiempo de proceso, h	VBD mg/l.día	Biomasa inicial UFC/g <sub>soporte</sub>	Biomasa Final UFC/g <sub>soporte</sub>
200	26.23	86.88	123	33.90	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^2$
400	10.80	97.29	64	145.94	$1 \times 10^4$	$7 \times 10^4$
600	17.84	97.02	89	156.98	$1.3 \times 10^7$	$1 \times 10^4$
800	699.51	12.56	281	8.58	$7 \times 10^4$	$2 \times 10^4$

En la misma tabla 4.16 la biomasa inicial y final de la columna para cada experiencia se muestra como las UFC/g<sub>soporte</sub>. Es notorio que las diferentes mezclas tuvieron un efecto positivo o negativo en la carga celular inmovilizada en la columna, con un mínimo de de  $1 \times 10^2$

#### 4. Resultados y discusión

UFC/g<sub>soporte</sub>. El primer experimento inició con 400 mg/l. Durante la prueba la biomasa aumentó en 7 veces. En la segunda prueba (600 mg/l) se inició con  $10^7$  y terminó con  $10^4$  UFC/g<sub>soporte</sub>, lo que significa una disminución de 3 órdenes de magnitud, debida a la toxicidad del efluente a tratar. En el tercer experimento (800 mg/l), una nueva disminución en la biomasa fue observada. La última prueba se llevó a cabo con la mezcla de 200 mg/l de concentración. En ésta, fue observada una disminución de dos órdenes de magnitud, quizás no relacionada con la alta toxicidad del efluente, sino con la baja disponibilidad de fuente de carbón para las bacterias inmovilizadas.

En las tablas 4.17, 4.18, 4.19, y 4.20, las concentraciones iniciales y finales de los fenoles específicos, las remociones alcanzadas y las VBD, se comparan. En la tabla 4.17 se muestran los valores de la experiencia con 200 mg/l. Las remociones de los fenoles específicos oscilaron entre 77.6 y 99.8%, dando VBD de 7.57 a 9.74 mg/l.día. Las remociones globales y la VDB fueron de 86.88% y 33.9 mg/l.día, respectivamente.

La prueba que inició con 400 mg/l de clorofenoles totales, alcanzó mejores remociones de los clorofenoles específicos (94.55-99.99%), así como VBD entre 34.49 y 37.27 mg/l.día. Las remociones globales y la VBD alcanzaron cifras de 97.29% y 145.94 mg/l.día, respectivamente, como se muestra en la tabla 4.18.

**Tabla 4.17. Experimentos con mezclas de 200 mg/l de fenoles totales.**

Compuesto	Concentración inicial mg/l	Concentración final mg/l	Remoción %	VBD mg/l.día
2,4DCF	50	0.078	99.80	9.74
2,4,6TCF	50	4.084	91.83	8.95
2,3,4,6TeCF	50	10.901	78.19	7.62
PCF	50	11.174	77.65	7.57
TF	200	26.237	86.88	33.9

#### 4. Resultados y discusión

**Tabla 4.18. Resultados de los experimentos con mezclas de 400 mg/l de fenoles totales.**

Compuesto	Concentración inicial mg/l	Concentración final mg/l	Remoción %	VBD mg/l.día
2,4DCF	100	0.0073	99.99	34.49
2,4,6TCF	100	0.596	99.40	37.27
2,3,4,6TeCF	100	4.755	95.24	35.71
PCF	100	5.455	94.55	35.45
TF	400	10.803	97.29	145.94

El experimento que inició con 600 mg/l fue el mejor de la serie. La remoción de clorofenoles específicos tuvo valores de 94.14 a 99.95% con VBD de 38.08 a 40.43 mg/l.día. Las remociones y VBD globales alcanzaron niveles de 97.02% y 156.98 mg/l.día, respectivamente. Los detalles de la prueba se muestran en la tabla 4.19.

La corrida con 800 mg/l iniciales de CF falló. Las remociones de clorofenoles específicos alcanzaron valores de 0 a 27.13%, con VBD de 0 a 4.43 mg/l.día, consecuentemente. Los valores globales de remoción y VBD fueron de 12.56% y .58 mg/l.día, respectivamente. Estos valores fueron los más bajos de todo el juego de experimentos. Los valores específicos se muestran en la tabla 4.20.

**Tabla 4.19. Remociones alcanzadas en el experimento con 600 mg/l de CF.**

Compuesto	Concentración inicial mg/l	Concentración final mg/l	Remoción %	VBD mg/l.día
2,4DCF	150	0.0678	99.95	40.43
2,4,6TCF	150	1.207	99.19	40.12
2,3,4,6TeCF	150	7.79	94.80	38.34
PCF	150	8.78	94.14	38.08
TF	600	17.84	97.02	156.98

**Tabla 4.20. Experimentos fallidos con la mezcla de 800 mg/l de fenoles totales.**

Compuesto	Concentración inicial mg/l	Concentración final mg/l	Remoción %	VBD mg/l.día
2,4DCF	200	145.72	27.13	4.63
2,4,6TCF	200	180.33	9.83	1.67
2,3,4,6TeCF	200	173.46	13.26	2.26
PCF	200	200.0	00.00	0.0
TF	800	699.51	12.56	8.58

#### 4. Resultados y discusión

El sistema fue capaz de tratar soluciones conteniendo 200-600 mg/l de clorofenoles con excelentes remociones de entre 86.66 y 97.02%, con VBD de 33.9 a 156.9 mg/l.día. En el caso de la prueba con 800 mg/l, se observó una fuerte inhibición debida a la alta toxicidad de la mezcla. Es importante recalcar que los experimentos con los clorofenoles por separado dieron resultados igualmente satisfactorios. El sistema fue capaz de tratar soluciones conteniendo de 100 a 1,000 mg/l de fenol, 50-600 mg/l de 2CF y 2,4DCF, 50 a 700 mg/l de TCF y 50 a 300 mg/l de PCF. Aun cuando el TeCF no fue probado individualmente, fue muy bien degradado, alcanzándose remociones del 78.2 al 95.2% en los experimentos de 200-600 mg/l.

Las VBD específicas para cada clorofenol son bajas si se comparan con aquellas determinadas para los clorofenoles por separado. Por ejemplo, la VBD para el 2,4DCF en la mezcla tiene un valor de 9.74 a 40.43 mg/l.día, en comparación con la VBD de 45 a 656 mg/l.día reportada para el 2CF en concentraciones de 50-200 mg/l. En el caso del 2,4,6TCF las diferencias son aún más grandes: las VBD de 52 a 770 mg/l.día para concentraciones de 50 a 200 mg/l para el compuesto solo, son mucho mayores que aquellas reportadas para el compuesto en la mezcla (8.9 a 38.3 mg/l.día). Finalmente, los valores de VBD para el PCF fueron de 7.6 a 38 mg/l.día para la mezcla y de 16.6 a 203.6 mg/l.día para el compuesto solo.

Otros trabajos han reportado valores de VBD para filtros aerobios y sistemas similares. Por ejemplo, Bettman y Rehm (1985) inmovilizaron *Pseudomonas putida* en poliacrilamida-hidracida. Este biocatalizador fue utilizado en un reactor tipo *air-lift* de 0.9 l para tratar soluciones conteniendo mezclas de fenol (1,000 a 5,000 mg/l), 4-clorofenol (25 a 65 mg/l) y cresol (30 mg/l). Los autores reportan remociones en el rango de 75 a 100 % con VBD de 3,120 a 7,200 mg/l.día. Estos valores no son de extrañar si se recuerda que el fenol tiene una toxicidad equivalente a una dosis letal media EC50 de 18 mg/l (medida con el método Microtox).

Khlevnikov y Peringer (1996) inmovilizaron a *Comamonas testosteroni* en un mezclador estático de material plástico para el tratamiento (en una columna empacada de 8 litros) de corrientes conteniendo ácido paratoluen-sulfónico en concentraciones de alrededor de 1,140 mg/l. Los autores concluyeron que es posible tratar estas corrientes con eficiencias tan altas como 90 a 100% con VBD de 2,400 a 4,800 mg/l.día.

#### 4. Resultados y discusión

Fava *et al.* (1996) experimentaron con un co-cultivo de bacterias inmovilizadas en sílica, vidrio y cubos de espuma de poliuretano. El volumen interno de la columna empacada utilizada fue de 0.57 l. Los sustratos a degradar fueron 2,5-diclorobifenil, 2,3'-diclorobifenil, 2,4'-diclorobifenil, 3,3'-diclorobifenil y 4,4'-diclorobifenil por separado, a concentraciones de 75 mg/l. Los autores reportaron que el sistema es capaz de biodegradar cualquiera de los sustratos alimentados. Se midieron decloraciones del 30 al 90% en 100 a 150 horas y se reportaron las concentraciones de algunos metabolitos intermedios de la degradación.

Finalmente, Seignez *et al.* (1993) emplearon un cultivo mixto inmovilizado para el tratamiento de antraquinona 2-sulfato (1,200 mg/l) y fenol (4,800 mg/l) por separado, en una columna de 1.2 l. Ellos mostraron que es posible obtener eficiencias de remoción de alrededor del 90%, con VBD de 4,080 mg/l.día para el antraquinona 2-sulfato y de 6,720 mg/l.día para el fenol.

En general, todos estos trabajos se llevaron a cabo con compuestos menos compuesto tóxicos que los utilizados en este trabajo. Sólo en el caso de los bifenilos policlorados se podría esperar una toxicidad mayor a la reportada para los clorofenoles. Además, es importante subrayar el hecho de que las mezclas de clorofenoles mostraron toxicidades mayores que las de los compuestos individuales. Otro aspecto relevante es el tiempo de inoculación y arranque de los sistemas. Seignez *et al.* (1993) reportaron 25 días de operación continua para alcanzar la operación óptima con del consorcio aerobio que utilizaron. Por el otro lado, Fava *et al.* (1996) mencionaron que la suspensión celular fue reciclada durante 5 días como procedimiento de inoculación. En este trabajo, la solución celular fue circulada durante 12-24 horas al inicio del proceso. Se demuestra entonces que es posible degradar compuestos a altas concentraciones sin necesidad de un proceso de adaptación, como el empleado en algunos trabajos reportados en la literatura, en los que se aclimata a los microorganismos aumentando poco a poco las concentraciones de los compuesto tóxicos a tratar.

La aportación de este trabajo radica fundamentalmente en la demostración de que es factible tratar corrientes que contienen concentraciones de hasta 600 mg/l de mezclas de cuatro clorofenoles, cuando en la literatura se ha reportado la degradación de mezclas binarias, con menores concentraciones totales.

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.5.2 Degradación de COT y caracterización cinética del proceso

La figura 4.15 muestra el desarrollo del COT a lo largo del proceso de degradación. Las líneas sólidas representan a la ecuación :

$$\text{COT}/\text{COT}_0 = \text{COT}_0 \exp(-k_2 t) \quad (3)$$

donde  $\text{COT}/\text{COT}_0$  es la razón del COT a cualquier momento del proceso y el COT inicial, expresada en %,  $\text{COT}_0$  es un parámetro que indica la cantidad porcentual de COT al inicio del proceso (debe ser cercano al 100%),  $k_2$  es un parámetro cinético ( $\text{horas}^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo de proceso (en horas). Como se muestra en la figura, en los experimentos con mezclas de concentración 400 y 600 mg/l de CF, se alcanzaron valores de remoción de hasta 68-79%, mientras que en la prueba de 800 mg/l, sólo desapareció un 2% del inicial., quizás debido a que el tiempo de reacción no fue suficiente para mineralizar una mayor proporción de compuestos fenólicos. La mayor parte del material carbonado desapareció entre las 50 y las 160 horas para el caso de los experimentos con 600 y 800 mg/l. Desafortunadamente en el caso de las pruebas con la mezcla de 200 mg/l no se tienen valores de COT, por un error en el manejo de las muestras.

#### 4. Resultados y discusión

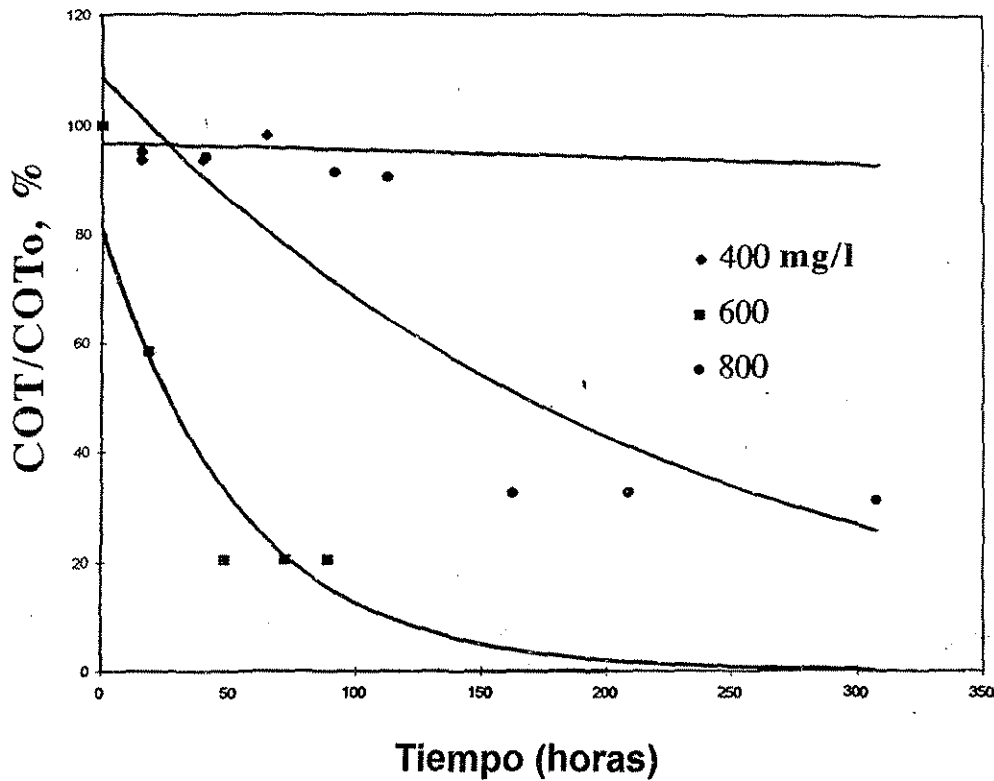


Figura 4.15 Cinética de degradación de COT en función del tiempo para las mezclas de 400, 600 y 800 mg/l de CF.

En la tabla 4.21 se muestran los valores de las constantes cinéticas para la desaparición de CF's y COT. Como se observa en el caso de los clorofenoles, los valores de  $TF_0$  no están muy cerca de las concentraciones reales del experimento (diferencias hasta de más del 100%).

Tabla 4.21. Constantes cinéticas para la degradación de las mezclas de clorofenoles.

Concentración de la mezcla Mg/l	Fenoles (expresados como mg/l)			COT (expresado como % del COT inicial)		
	$TF_0$	$k_1$	$r$	$COT_0$	$k_2$	$r$
200	140.96	0.0102	0.7512	-	-	-
400	203.87	0.0419	0.9046	96.75	0.0001	0.1191
600	385.75	0.0353	0.9575	80.53	0.0106	0.9163
800	730.8	0.0036	0.8578	108.71	0.0047	0.8818

#### 4. Resultados y discusión

En relación a la degradación de fenoles, los valores de  $k_1$  son variables y no presentan una clara relación con la concentración inicial de la mezcla. Los valores de  $r$  demuestran que se logran buenos ajustes a la curva teórica, quizás con excepción del experimento con 200 mg/l. En cuanto a la degradación de COT, los valores de  $COT/COT_0$  se encuentran muy cerca del 100%. Los valores de  $k_2$  son también diferentes y no se observa ninguna relación entre éstos y las concentraciones iniciales de COT. Finalmente, los valores de  $r$  son aceptables para las experiencias con 600 y 800 mg/l, no así para la de 400 mg/l. Este comportamiento podría ser definitivamente ajustado a una curva lineal del tipo  $COT/COT_0 = A + B t$ .

Eckenfelder (1991) reportó la oxidación por peróxido de hidrógeno de algunos clorofenoles utilizando dosis estequiométricas de  $H_2O_2$ . Entre otras experiencias, el encontró que es factible alcanzar reducciones del 75 y 48% de DQO y COT para el 2CF (625 mg/l), 69 y 50% de DQO y COT para el 2,4DCF (815 mg/l) y de 47 y 44% de DQO y COT para el 2,4,6TCF (800 mg/l), respectivamente. Estos valores son únicamente una referencia de las capacidades oxidativas de un sistema alterno como lo es la oxidación química, aún cuando las experiencias se llevaron a cabo con los clorofenoles por separado y las concentraciones totales no son exactamente las mismas.

#### 4.5.3 Reducción de la toxicidad

Las pruebas de toxicidad (Microtox) se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con el fin de estimar las toxicidades iniciales y finales para el caso de las mezclas de 400, 600 y 800 mg/l. Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 4.22

Tabla 4.22. Remoción de toxicidad (Microtox).

Mezcla o compuesto, mg/l	Toxicidad inicial UT (EC50, mg/l)	Toxicidad final UT (EC50, mg/l)	Remoción, %
Mezcla, 400	40.8(2.4)	21.1(4.7)	48
Mezcla, 600	52.4(1.9)	12.2(8.1)	77
Mezcla, 800	358.0(0.3)	278.2(0.4)	22
Fenol, 100	3.8(26.0)	-	-



#### 4. Resultados y discusión

Las toxicidades iniciales, como EC50 en mg/l fueron de 2.45, 1.9 y 0.28 para las correspondientes mezclas (400, 600 y 800 mg/l), lo que corresponde a 40.8, 52.4 y 358 unidades de toxicidad UT definidas como:

$$UT = 100/EC50 \quad (4)$$

Las unidades de toxicidad permiten un manejo más fácil de los valores de toxicidad, a mayor valor de UT, mayor toxicidad y *viceversa*. Como elemento comparativo, se anexa el valor de toxicidad del fenol puro en una solución a concentración de 100 mg/l (EC50 de 3.85 y UT = 25.98).

A partir de estos valores es evidente que todas las muestras son altamente tóxicas (un valor de UT superior a 4 es considerado altamente compuesto tóxico). La toxicidad fue disminuída a causa de la degradación de clorofenoles, pero no en la misma proporción. Las toxicidades finales de las mezclas fueron de 21, 12.25 y 278.24 UT para las mezclas de 400, 600 y 800 mg/l. Esto significa una reducción de toxicidad del 48.3, 76.6 y 22.3%, respectivamente. La cantidad de UT removida por corrida fue de 19.7, 40.1 y 79.8 para cada caso, lo que significa que entre más concentrada estaba la muestra, mayor fue la remoción en UT. Es importante recordar que los valores de toxicidad para los compuestos por separado como EC50 reportados por Blum y Speece, (1991) son 2.0, 1.9 y 0.735 mg/l para el 2,4DCF, 2,4,6TCF y PCF, respectivamente.

### 4.6 DEGRADACION DE CLOROFENOLES EN OPERACION CONTINUA. COLUMNA DE 5 L DE CAPACIDAD

#### 4.6.1 Producción del inóculo e inmovilización del microorganismo a la columna

La columna fue empacada con la mezcla de tezontle con la fracción de tamaños denominada medios (mallas 12, 14 y 16). Se hizo circular a través de la columna el producto de dos fermentaciones de 15 litros consecutivas. Al final del proceso se drenó el líquido y se midieron las UFC/g<sub>soporte</sub>. Este parámetro alcanzó un valor de 10<sup>7</sup> UFC/g<sub>soporte</sub>.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

#### 4. Resultados y discusión

Se realizó una inoculación en medio líquido para lograr su crecimiento durante 24 horas con agitación continua y a 35 °C y un volumen total de 300 ml. Después se procedió a inocular una fermentación de 3,0 litros llevada a cabo durante 25,5 horas. Debido a que la cantidad de células crecidas durante esta fermentación no fue lo suficiente para poder utilizarla como inóculo, se procedió a llevar a cabo nuevamente la fermentación a 3.0 litros, previamente teniendo los 300 ml de cultivo. Ahora el tiempo de fermentación fue de 22.5 horas, (tres horas menos), ya que a este tiempo había una buena cantidad de células para realizar el escalamiento a 15.0 litros. Los resultados de las fermentaciones se presentan en las gráficas siguientes.

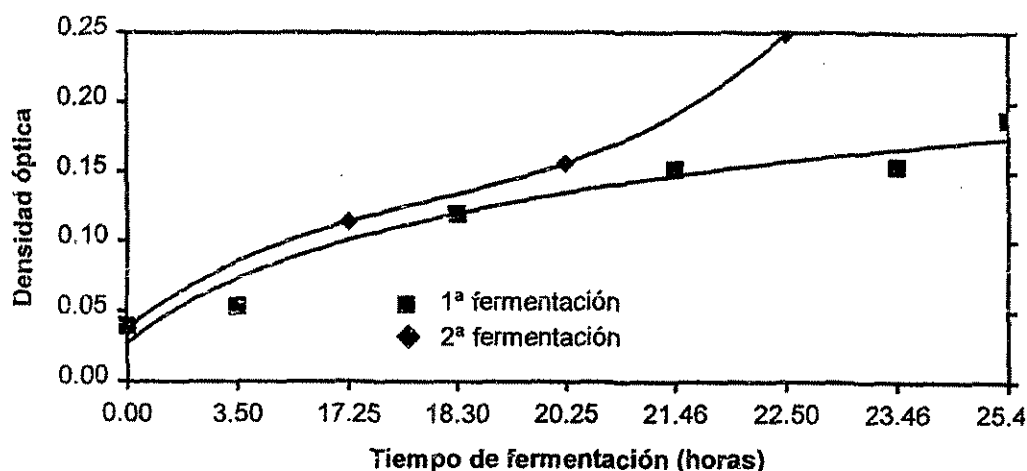


Figura 4.16 Comparación del crecimiento de las *Pseudomonas fluorescens* en dos fermentadores de tres litros.

#### 4. Resultados y discusión

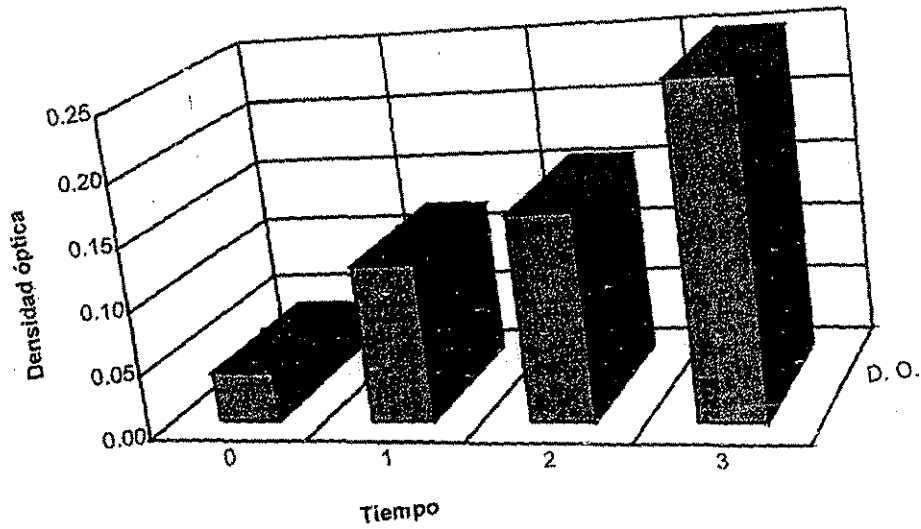


Figura 4.17. Tiempo vs. Densidad óptica del 2o. proceso de fermentación de 3.0 litros.

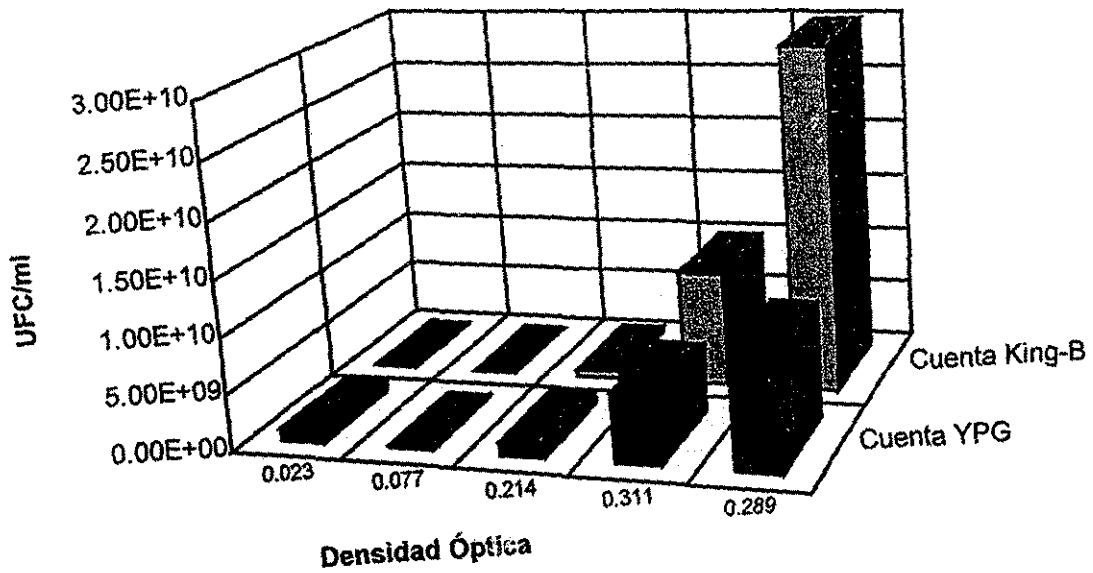


Figura 4.18 Resultados del proceso de fermentación a la escala de 15.0 litros. Densidad óptica vs. UFC/ml.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

Se empacó tezontle mallas (12, 14 y 16) sobre una base de arena de 10 cm dentro de una columna de acrílico con volumen de 5.0 l. El tezontle fue perfectamente mezclado hasta lograr una mezcla uniforme. Después se procedió a realizar el proceso de inmovilización en dicha columna. Para la inmovilización de la biomasa se utilizaron los quince litros obtenidos a partir de la fermentación.

Después de haber realizado la inmovilización se procedió a realizar un conteo de la cantidad de biomasa contenida en el tezontle, que es el soporte de la biomasa en la columna empacada. Este procedimiento de conteo se realizó aproximadamente cada siete días o cada cambio de compuesto tóxico y de concentración. La tabla 4.23 muestra los resultados de estos conteos y la gráfica 4.19 muestra como fue el comportamiento de la biomasa durante la operación de la columna empacada con diferentes compuestos compuestos tóxicos variando las concentraciones.

Los conteos se realizaron tanto en medio rico (YPG) como en medio específico para *Pseudomonas* (King-B). La razón de este doble conteo es el conocer si además de *Pseudomonas fluorescens*, podía haber otro tipo de microorganismo creciendo junto con las *Pseudomonas* en la columna empacada.

Como puede observarse, tanto en la tabla 4.23 y en la gráfica 4.19, durante los meses de diciembre, enero, febrero y parte de marzo, la cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo de tezontle (UFC/g) disminuyó debido a la temperatura promedio de la estación del año (invierno). Esto es debido a que la *Pseudomonas fluorescens* crecen más favorablemente, como ya se mencionó de 28 a 35 °C. En el transcurso del invierno la temperatura promedio osciló entre 12 °C y 16 °C, la cual es muy baja (menos de la mitad de la temperatura favorable de crecimiento) para que los microorganismos puedan mantener su crecimiento, y en la misma gráfica se puede apreciar como conforme transcurrió el invierno y aumentó la temperatura ambiente promedio, la cantidad de biomasa fue aumentando.

También se muestran los promedios aritmético y geométrico para las dos cuentas bacterianas. Se observa que el valor de ambos promedios es muy similar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

Tabla 4.23 Conteo de la biomasa contenida en la columna empacada.

Fecha	Tiempo acumulado (días)	Cuenta UFC/g YPG	Cuenta UFC/g King B	Promedio geométrico
09/10/96	0	1.60E+06	1.60E+06	1.60E+06
23/10/96	14	4.80E+06	3.90E+06	4.33E+06
29/10/96	20	4.00E+06	5.00E+05	1.41E+06
07/11/96	29	4.00E+05	2.80E+06	1.06E+06
13/11/96	35	3.40E+06	2.73E+06	3.05E+06
20/11/96	42	4.33E+06	5.33E+06	4.80E+06
26/11/96	48	9.66E+05	2.00E+06	1.39E+06
03/12/96	55	2.46E+06	1.66E+06	2.00E+06
06/12/96	58	6.00E+06	6.50E+06	6.24E+06
10/12/96	62	1.30E+06	1.20E+06	1.25E+06
17/12/96	69	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05
20/12/96	72	2.10E+05	2.80E+05	2.42E+05
27/12/96	79	3.80E+05	1.00E+06	6.16E+05
07/01/97	90	3.75E+06	2.90E+06	3.28E+06
10/01/97	93	3.30E+04	3.30E+04	3.30E+04
14/01/97	97	3.00E+04	2.00E+04	2.45E+04
23/01/97	106	3.20E+06	4.53E+06	3.79E+06
29/01/97	112	3.00E+04	6.25E+04	4.31E+04
31/01/97	114	8.90E+04	8.10E+04	8.49E+04
04/02/97	118	1.40E+05	3.00E+05	2.05E+05
07/02/97	121	1.71E+04	2.88E+04	2.22E+04
11/02/97	125	7.80E+04	1.00E+05	8.83E+04
18/02/97	132	2.00E+04	2.00E+04	2.00E+04
26/02/97	140	1.08E+04	2.50E+04	1.64E+04
04/03/97	146	5.00E+04	5.16E+04	5.10E+04
11/03/97	153	4.40E+05	1.13E+05	2.23E+05
18/03/97	160	2.00E+05	1.91E+05	1.95E+05
01/04/97	179	2.56E+05	2.80E+05	2.68E+05
08/04/97	186	3.80E+05	2.14E+05	2.85E+05
15/04/97	193	3.20E+05	2.04E+05	2.53E+05
22/04/97	200	2.80E+05	9.50E+05	5.16E+05
29/04/97	207	3.30E+05	6.50E+05	4.63E+05
13/05/97	221	1.46E+06	1.00E+06	1.21E+06
20/05/97	227	2.85E+06	2.40E+06	2.59E+06
30/05/97	238	8.88E+05	8.88E+05	8.80E+05
05/06/97	244	2.60E+06	9.92E+06	4.98E+06
12/06/97	301	1.55E+06	2.10E+07	2.10E+07
19/06/97	308	6.60E+05	5.12E+06	1.84E+06
25/06/97	314	1.46E+05	3.00E+06	6.62E+05

#### 4. Resultados y discusión

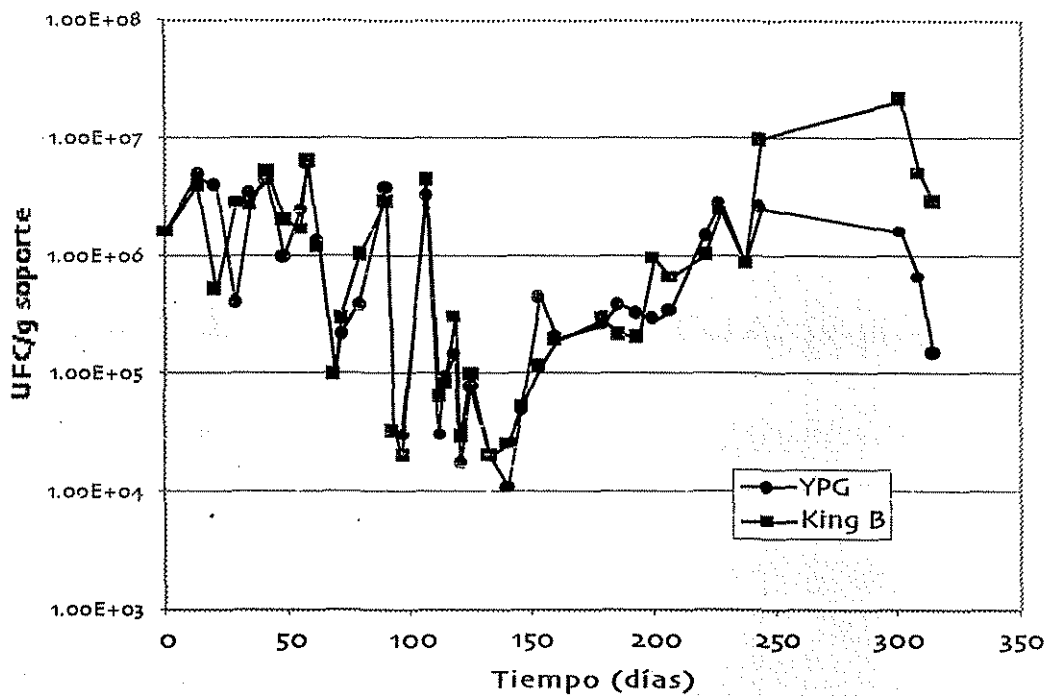


Figura 4.19. Comportamiento de la cantidad de células contenidas en la columna empacada. Cuantificación de la biomasa en medio YPG y King-B.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

4. Resultados y discusión

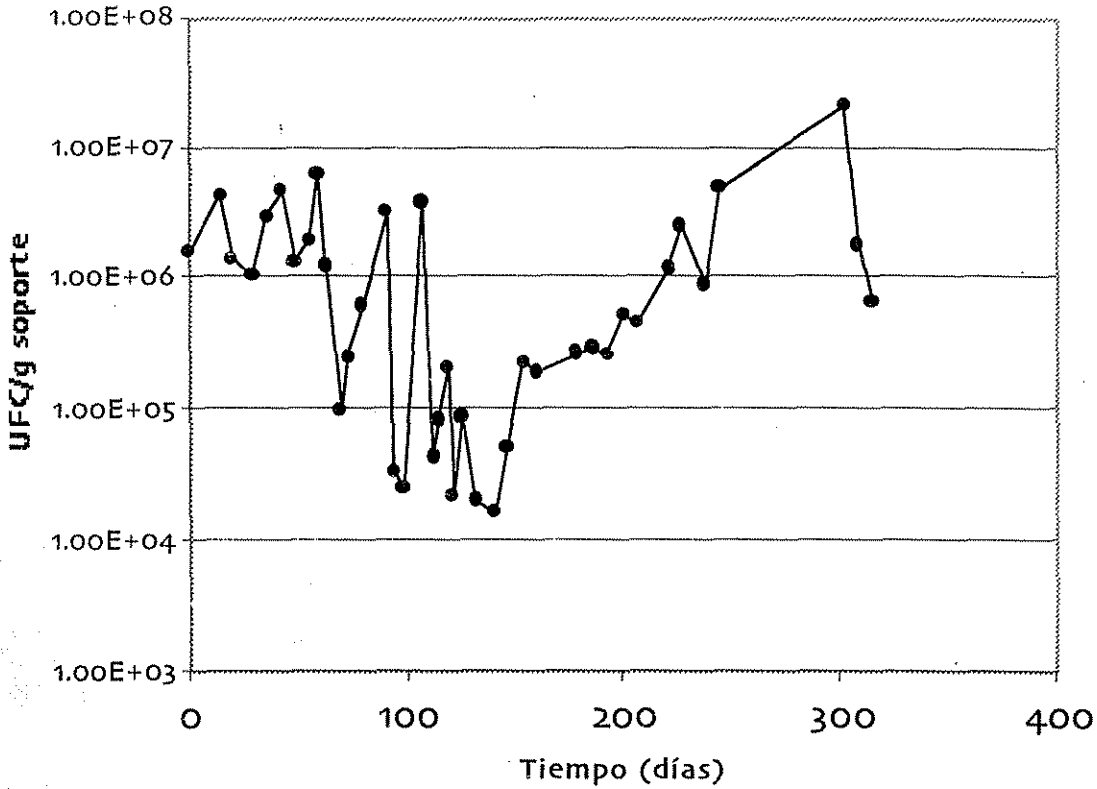


Figura 4.20 Comportamiento de la cantidad de células contenidas en la columna empacada. Cuantificación de la biomasa, promedio geométrico.

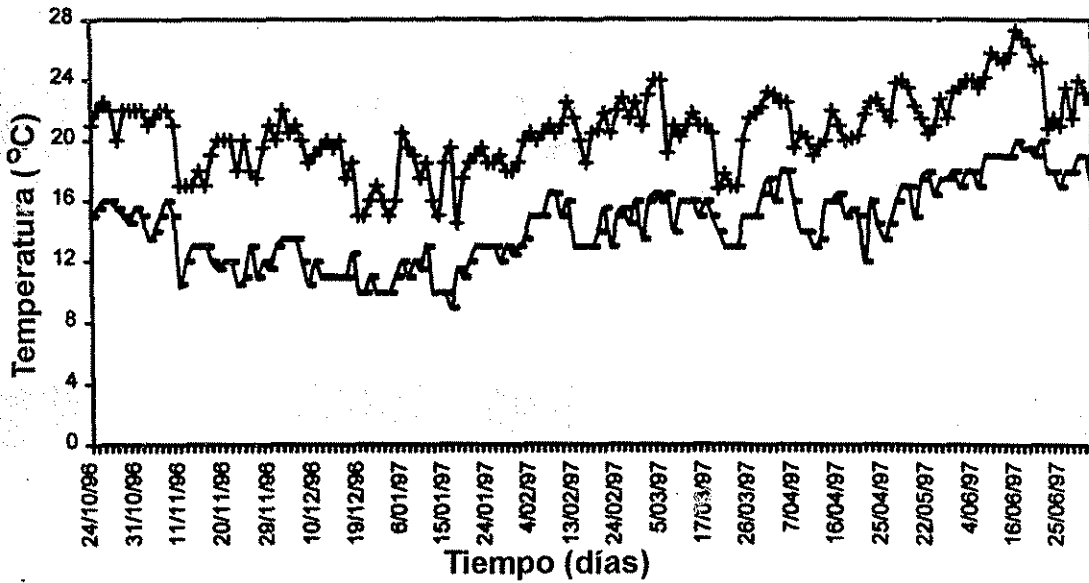


Figura 4.21 Relación de las temperaturas máximas y mínimas durante la operación de la columna empacada.

#### 4. Resultados y discusión

Como se puede apreciar en la figura 4.21, durante la temporada invernal el promedio de la temperatura ambiente disminuyó, y si esta gráfica se compara con los resultados de la cuantificación de biomasa en las mismas fechas, se podrá apreciar como la línea de la tendencia de la cantidad de biomasa se comporta de modo similar a las fluctuaciones de temperatura.

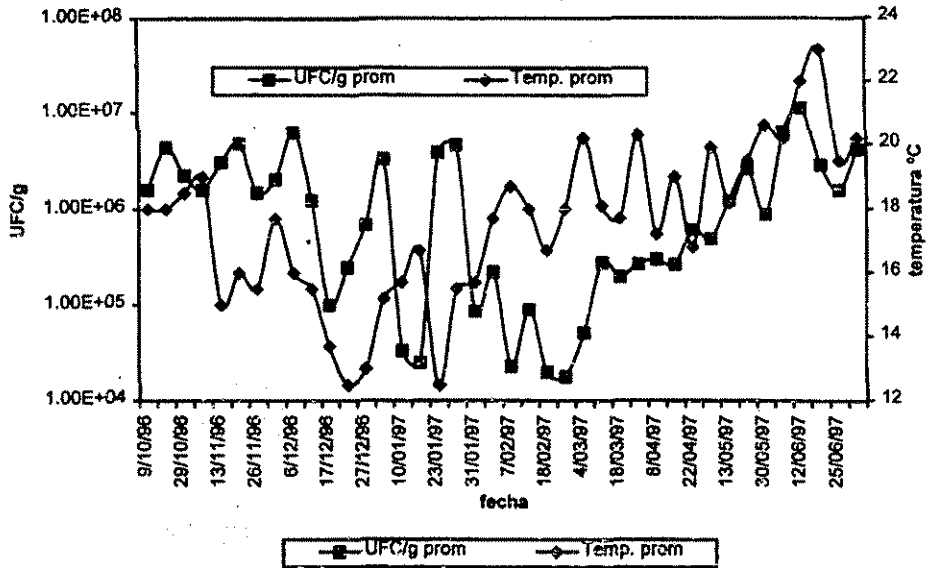


Figura 4.22 Comportamiento de las *Pseudomonas* con respecto a la temperatura.

En la gráfica 4.22 se puede apreciar el comportamiento de las *Pseudomonas* con respecto a la temperatura, y con esto también se deduce que el crecimiento de *Pseudomonas* depende en buena medida de la temperatura y a su vez ésta influye en su desempeño, es decir, en su capacidad de degradación.

#### 4.6.2 Arranque y operación de la columna empacada

La columna empacada con tezontle, previamente inoculada con *Pseudomonas fluorescens*, se operó en una serie de etapas: 35 en total. Cada etapa fue diferente, ya que se varió tanto el compuesto tóxico, la concentración del mismo y el tiempo de residencia. Como se mencionó anteriormente, la temperatura de operación de la columna no se controló, y a raíz de esta



#### 4. Resultados y discusión

situación se pudo observar cómo los cambios de temperatura afectaron la degradación de los clorofenoles alimentados a la columna.

Se inició la operación de la columna con 2,4,6-triclorofenol a diferentes concentraciones variando el tiempo de residencia. Después se introdujo 2-clorofenol a una sola concentración pero a diferentes tiempos de residencia, posteriormente se alimentó 2,4-diclorofenol a una sola concentración y también a diferentes tiempos de residencia, y finalmente pentaclorofenol en iguales condiciones que el 2-clorofenol y el 2,4-diclorofenol. Antes de cada sesión de análisis se esperó tres veces el TRH, para asegurarse de que se establece una condición estable.

Al finalizar estas etapas (22 en total), se procedió a operar ahora con los mismos clorofenoles, excepto el 2-clorofenol, pero mezclados, y a comparar los porcentajes de remoción de los mismos en forma individual con las mezclas. Las etapas 23, 24, 25 y 26 prácticamente fueron de preparación para posteriormente operar la columna con mezclas más complicadas de clorofenoles. Como se observará más adelante, la columna reaccionó mejor a lo esperado con las mezclas complejas. Esto claro, basándose en los resultados de la degradación de las mezclas binaria y ternaria, correspondientes a las etapas de preparación mencionadas anteriormente.

Como se observa en la tabla 4.23, en las primeras once etapas de operación de la columna, no se siguió un orden ascendente o descendente en la concentración del 2,4,6-triclorofenol o del tiempo de residencia, esto con el fin de observar el comportamiento de las *Pseudomonas fluorescens* al ser alimentadas a distintas concentraciones y tiempos de residencia variables. Ya que con el clorofenol con el cual se empezó a trabajar, se inició alimentándolo a 500 mg/l con un tiempo de residencia de 15.5 horas, y se terminó alimentándolo a la misma concentración, pero ahora con un tiempo de residencia de 31.0 horas. En ambos casos se obtuvieron resultados diferentes que se discutirán más adelante cuando se hable del 2,4,6-triclorofenol.

De la etapa 12 a la etapa 16, se operó la columna con 2-clorofenol a 500 mg/l únicamente, sin variar la concentración pero sí el tiempo de residencia, lo cual se realizó en cinco ocasiones. Con la alimentación del clorofenol a la columna, se esperaba un mayor porcentaje de remoción, ya que es menos compuesto tóxico, pues en trabajos previos se reporta que estos microorganismos y otros degradan mejor conforme el fenol tiene menos cloros, y aún mejor sí es solamente fenol.

#### 4. Resultados y discusión

Estos porcentajes de remoción se pueden observar en la misma tabla, pero cabe recordar que como no hubo control de la temperatura de operación, cuando se alimentó el 2-clorofenol a la columna, ya comenzaba la época de temperaturas más bajas (el término del otoño y el principio del invierno), y cuando se acabó de trabajar con este clorofenol, se midieron temperaturas más frías (13 °C en promedio).

Las etapas 17, 18 y 19 corresponden a la operación de la columna alimentada con 2,4-diclorofenol, también a 500 mg/l, a tres diferentes tiempos de residencia. Se observó un porcentaje de degradación mejor que el del 2-clorofenol pero no tan bueno como el observado en el caso de 2,4,6-triclorofenol.

Finalmente, durante las etapas 20; 21 y 22, se alimentó pentaclorofenol, pero a una concentración de 200 mg/l a tres diferentes tiempos de residencia. Se operó con este clorofenol a dicha concentración, debido a que es el más compuesto tóxico de todos los clorofenoles con los que se trabajó, y además porque como aparece reportado en Torres *et al.* (1997b), es la concentración máxima que pudo degradar este tipo de microorganismo.

Después de trabajar con clorofenoles en forma individual, se procedió a trabajar con los mismos clorofenoles, pero utilizando 2,3,4,6-tetraclorofenol en lugar de 2-clorofenol, pues para la técnica de análisis con cromatografía de gases es difícil separar el 2-clorofenol. Como ya se mencionó, las etapas 23, 24, 25 y 26 fueron preparatorias a la operación de las mezclas más complejas. Las mezclas de las etapas de preparación fueron: una binaria constituida por 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol a 400 mg/l, y una ternaria constituida por 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol también a 400 mg/l.

Posteriormente, durante las etapas restantes se alimentó la mezcla cuaternaria constituida por 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol y pentaclorofenol a 400, 600 y 200 mg/l. Cada concentración fue alimentada durante tres etapas, a diferentes tiempos de residencia, los cuales fueron los mismos para estas tres concentraciones. Esta mezcla fue la más compleja que se manejó en la operación de la columna. Además si supusiéramos que la toxicidad de una mezcla es el resultado de la suma de sus componentes, entonces además de ser la mezcla más compleja podría ser la más tóxica.

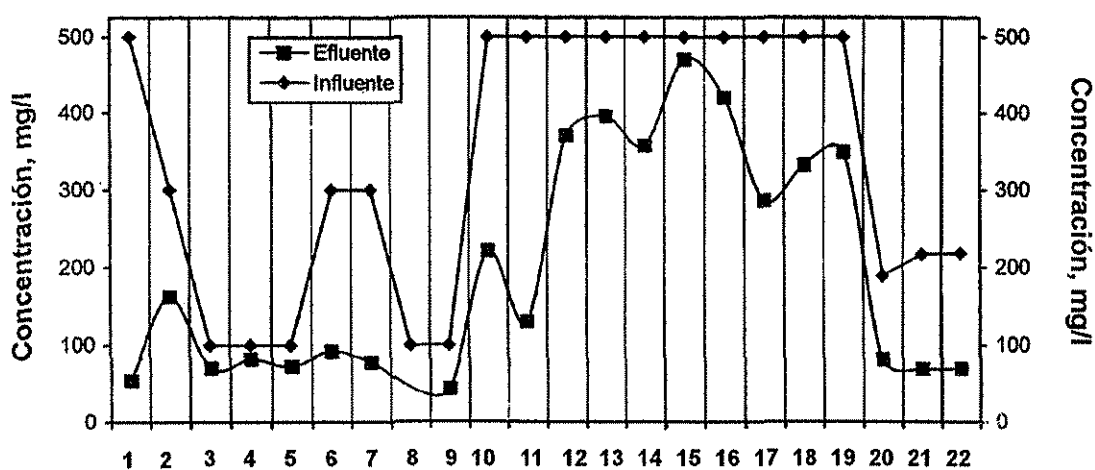
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

La discusión del comportamiento de la columna con cada uno de los clorofenoles y con cada una de las mezclas está dada más adelante.

**Tabla 4.24 Fases de operación de la columna empacada con clorofenoles individuales**

Fase	Clorofenol	Conc. influente	Conc. efluente	TRH (horas)	Remoción (%)
1	2,4,6TCF	500,00	54,00	15,50	89,20
2	2,4,6TCF	300,00	162,00	31,00	46,00
3	2,4,6TCF	100,00	69,90	31,00	30,10
4	2,4,6TCF	100,00	81,50	11,00	18,50
5	2,4,6TCF	100,00	72,70	22,00	27,30
6	2,4,6TCF	300,00	92,10	15,50	69,30
7	2,4,6TCF	300,00	77,70	6,20	74,10
8	2,4,6TCF	100,00	45,70	62,00	54,30
9	2,4,6TCF	100,00	43,70	93,00	56,30
10	2,4,6TCF	500,00	221,00	3,10	55,80
11	2,4,6TCF	500,00	130,50	31,00	73,90
12	2CF	500,00	370,00	12,40	26,00
13	2CF	500,00	395,50	3,10	20,90
14	2CF	500,00	357,25	31,00	28,55
15	2CF	500,00	469,97	15,50	6,01
16	2CF	500,00	420,00	62,00	16,00
17	2,4DCF	500,00	286,35	15,50	42,73
18	2,4DCF	500,00	332,50	62,00	33,50
19	2,4DCF	500,00	348,75	31,00	30,25
20	PCF	200,00	80,77	15,50	57,33
21	PCF	200,00	68,45	62,00	68,40
22	PCF	200,00	69,31	31,00	68,25



**Figura 4.23 Etapas de trabajo de la columna empacada con clorofenoles individuales.**

#### 4. Resultados y discusión

En la tabla 4.23 y la gráfica 4.23 se puede apreciar de forma resumida toda la operación de la columna empacada con 2,4,6-triclorofenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol, alimentados a la columna de forma individual. Los datos de la tabla, están distribuidos en las etapas 1 a la 22, contra las concentraciones de entrada y de salida de cada uno de los clorofenoles dentro de sus etapas correspondientes.

Como se observa en la gráfica, en algunos casos las líneas de influente y efluente están demasiado cercanas, y en otros casos se encuentran lejanas; esto último es lo más deseable que ocurra en la columna. Más adelante se discutirá qué sucedió con cada uno de los clorofenoles al ser alimentados en la columna, incluyendo las condiciones de cada etapa.

**Tabla 4.25. Fases de operación de la columna empacada con clorofenoles mezclados.**

Fase	Clorofenol	Conc. influente	Conc. efluente	TRH (horas)	Remoción (%)
23	DCF+TCF	400,00	284,40	31,00	28,90
24	DCF+TCF	400,00	285,84	15,50	28,54
25	DCF+TCF+PCF	400,00	287,00	15,50	28,25
26	DCF+TCF+PCF	40,00	257,08	31,00	35,73
27	DFC+TCF+TeCF+PCF	400,00	234,80	15,50	79,79
28	DFC+TCF+TeCF+PCF	400,00	188,80	31,00	75,58
29	DFC+TCF+TeCF+PCF	400,00	175,20	62,00	76,51
30	DFC+TCF+TeCF+PCF	600,00	269,40	31,00	86,50
31	DFC+TCF+TeCF+PCF	600,00	372,60	62,00	77,30
32	DFC+TCF+TeCF+PCF	600,00	330,00	15,50	78,01
33	DFC+TCF+TeCF+PCF	200,00	81,20	15,50	58,75
34	DFC+TCF+TeCF+PCF	200,00	84,60	62,00	43,27
35	DFC+TCF+TeCF+PCF	200,00	95,80	31,00	42,72

#### 4. Resultados y discusión

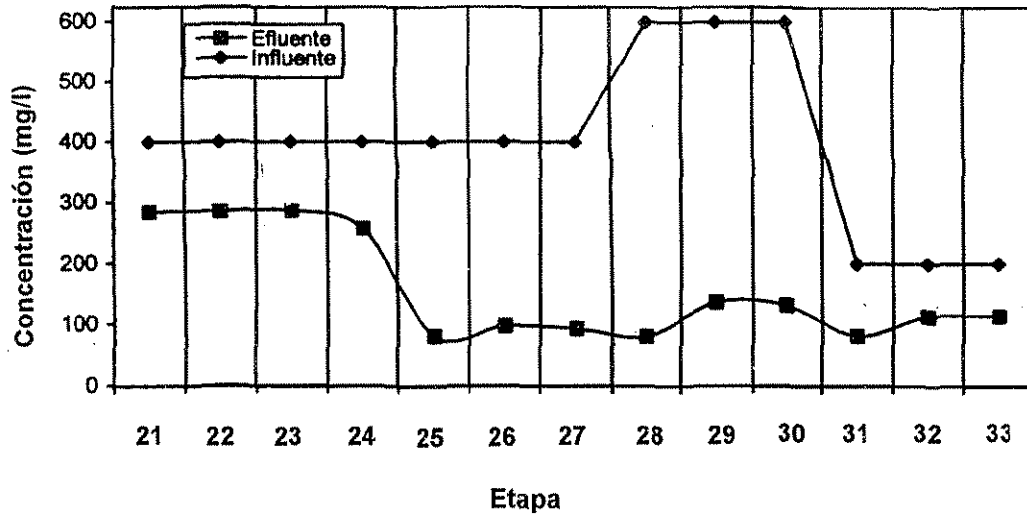


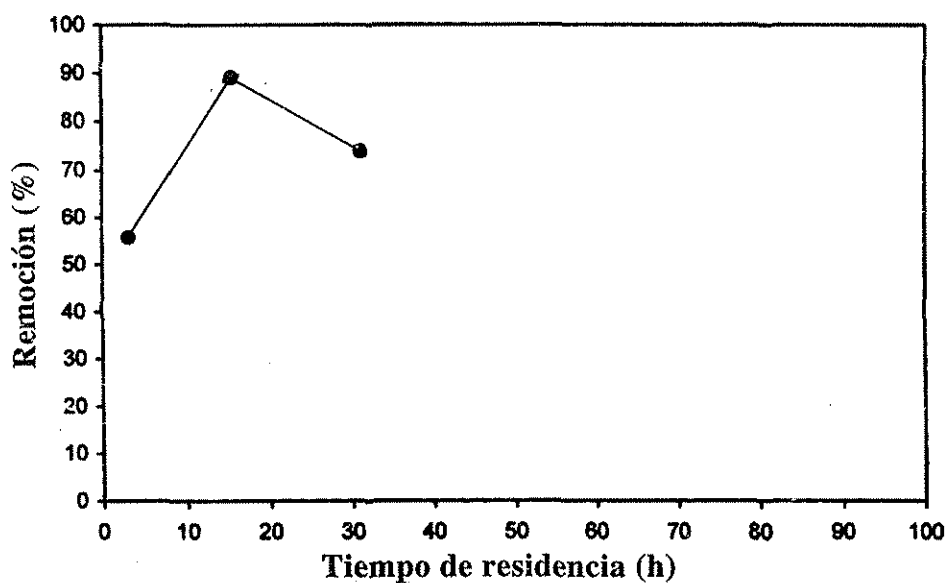
Figura 4.24 Etapas de trabajo de la columna empacada con clorofenoles mezclados.

En la tabla 4.25 y la figura 4.24 están reportados los valores obtenidos de forma resumida en la operación de la columna con las mezclas de los clorofenoles; primeramente con una mezcla binaria y después con una mezcla ternaria, como etapas de preparación antes de alimentar las mezclas cuaternarias que fueron las mezclas de mayor interés y de más importancia dentro de este bloque de mezclas de clorofenoles.

Estas etapas, serán discutidas más adelante; mezcla por mezcla.

### 4.6.3 Biodegradación de 2,4,6-triclorofenol

Se inició trabajando con 2,4,6-triclorofenol a diferentes concentraciones y a diferentes tiempos de residencia. Como se puede apreciar en la siguiente gráfica, al aumentar el tiempo de residencia aumentó también el porcentaje de remoción, pero después de 18 horas decayó la cantidad de compuesto tóxico removido. Al tiempo de residencia de 15.5 horas fue cuando se obtuvo la mayor remoción del compuesto tóxico, casi el 90 %.



**Figura 4.25. Tiempo de residencia hidráulica vs. el porcentaje de remoción del 2,4,6-triclorofenol a 500 mg/l.**

Como se puede observar en la tabla 4.24, la alimentación de 2,4,6-triclorofenol a 500 mg/l no se realizó en etapas seguidas, primero a 15.5 horas en la etapa 1, después a 3.1 horas en la etapa 10 y finalmente en la etapa 11 a 31.0 horas.

En este esquema solamente está graficado el 2,4,6-triclorofenol a 500 mg/l contra el tiempo de residencia elegido aleatoriamente, sin seguir ningún patrón determinado para establecer en que orden se hubiese aumentado o disminuido tanto la concentración del compuesto tóxico como el tiempo de residencia. Aunque los tres puntos mostrados en la gráfica proceden de diferentes etapas a una misma concentración presentan comportamiento distinto, debido a la variación de la temperatura ambiente, al

#### 4. Resultados y discusión

comportamiento de las *Pseudomonas* contenidas en la columna, obviamente al cambio de tiempo de residencia, y quizá a que antes de las etapas 10 y 11 la columna operó con 2,4,6-triclorofenol a concentraciones menores a 500 mg/l (300 y 100 mg/l).

Durante la etapa 1, la temperatura promedio fue de 18 °C, mientras en las etapas 10 y 11 de 15 y 14.5 °C respectivamente. Si relacionamos el tiempo de residencia y la temperatura de estas tres etapas, observamos como influyeron en la degradación del clorofenol. Al descender la temperatura, la degradación también disminuye, igualmente si desciende el tiempo de residencia. Al aumentar, por ejemplo, el tiempo de residencia pero no la temperatura si aumentó la degradación del compuesto tóxico. Eso lo podemos observar en la gráfica comparando las degradaciones obtenidas a un tiempo de residencia de 15.5 y 31.0 horas. Según lo reportado por Torres *et al.* (1994), entre mayor sea el tiempo de residencia mayor es la degradación del clorofenol. Cuando se alimentó el 2,4,6-triclorofenol a 500 mg/l, con un tiempo de residencia de 15.5 horas, éste fue degradado en mayor proporción que cuando el tiempo de residencia se duplicó. En el caso del punto donde el tiempo de residencia fue menor, (3.1 horas) sí está dentro de las expectativas ya que su degradación fue de 55.8, % a una temperatura promedio de 15 °C.

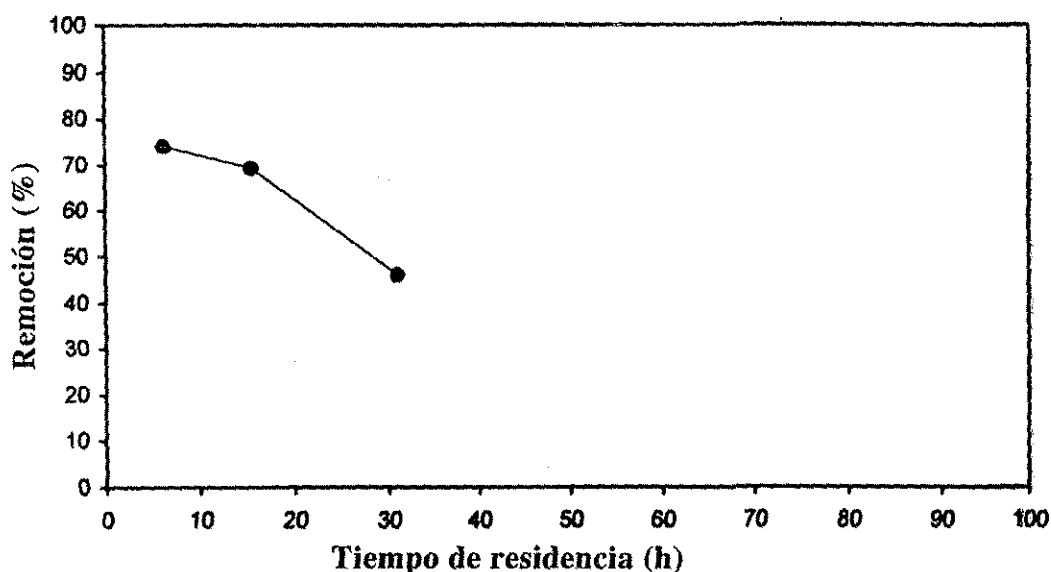


Figura 4.26. Tiempo de residencia hidráulica vs. el porcentaje de remoción del 2,4,6-triclorofenol a 300 mg/l.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

Para el mismo compuesto tóxico, pero con una concentración de 300 mg/l, observamos en la siguiente gráfica que su comportamiento fue totalmente inverso al esperado, es decir, conforme aumentó el tiempo de residencia debía aumentar también la degradación, pero sucedió lo contrario.

El 2,4,6-triclorofenol se alimentó a la columna en las etapas 2, 6 y 7 con tiempos de residencia de 31.0, 15.5 y 6.2 horas respectivamente. Durante la etapa 2 la degradación fue de 46 % (la degradación más baja), pero conforme en las etapas 6 y 7 se disminuyó el tiempo de residencia, la degradación fue en aumento, (69.3 y 74.1 % respectivamente). La temperatura promedio en esas tres etapas fue de aproximadamente 18 °C. La temperatura reportada es la promedio, lo que quiere decir que algunos días la temperatura estaba muy abajo del promedio y otros más arriba, y en ocasiones ocurrió que la diferencia de temperaturas entre la más baja y la más alta fue de hasta 7 °C, y en otros 2 y 3 °C.

Al igual que con la concentración de 500 mg/l, al trabajar con 300 mg/l no se siguió ningún patrón determinado para alimentar el clorofenol a esta concentración y también se operó en forma discontinua como se puede ver en la tabla 4.24.

El tiempo de residencia no tuvo efecto alguno en la degradación del 2,4,6-triclorofenol a 300 mg/l. Esto se debe a que la temperatura jugó un papel más importante en la degradación, dejando a un lado los efectos que hubiera podido causar la variación del tiempo de residencia.

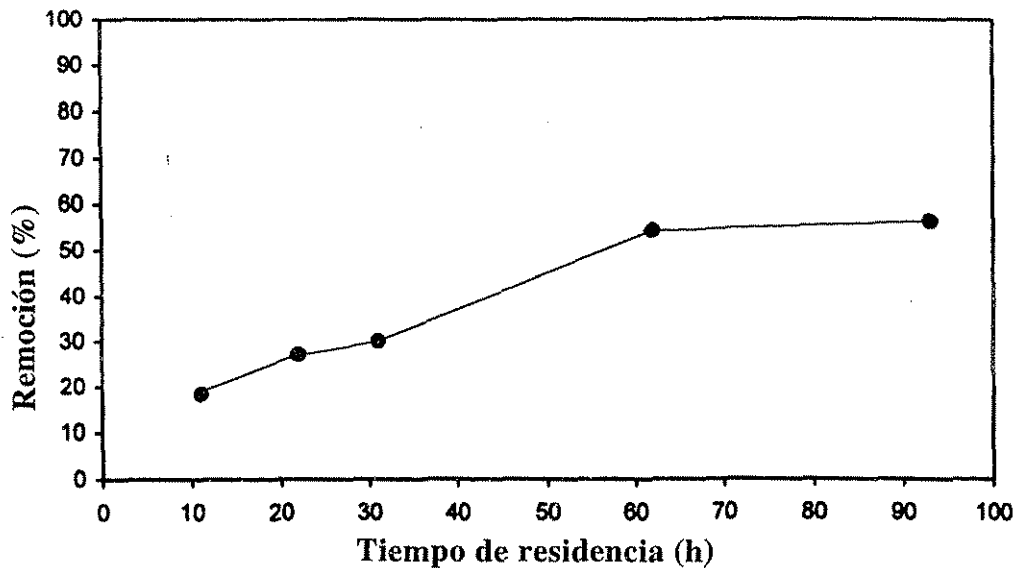
Cuando la columna se operó con el mismo clorofenol pero ahora a una concentración de 100 mg/l, el comportamiento fue el esperado: conforme aumentó el tiempo de residencia también aumentó la degradación. Lo anterior puede apreciarse en la figura 4.30.

Inicialmente se alimentó a esta concentración durante las etapas 3, 4 y 5; a tiempos de residencia de 31.0, 11.0 y 22.0 horas respectivamente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



#### 4. Resultados y discusión



**Figura 4.27** Tiempo de residencia hidráulica *vs.* el porcentaje de remoción del 2,4,6-triclorofenol a 100 mg/l.

Se volvió a alimentar la misma concentración de 100 mg/l durante las etapas 8 y 9, a 62.0 y 93.0 horas de tiempo de residencia respectivamente.

En las primeras tres etapas de trabajo con esta concentración, las temperaturas promedio fueron 17, 18 y 18 °C respectivamente, y en las últimas dos, las temperaturas promedio fueron de 17 y 16 °C respectivamente. Como se observa en esta gráfica, la degradación fue menor que en los casos anteriores, debido primeramente a que entre más compuesto tóxico está presente, mayor actividad tienen las *Pseudomonas*. La degradación máxima obtenida trabajando con esta concentración fue del 56.3 % para el máximo tiempo de residencia (93.0 horas), y la degradación mínima obtenida fue del 18.5 % para el tiempo de residencia mínimo (11.0 horas).

En la figura 4.28 se puede observar el comportamiento del 2,4,6-triclorofenol alimentado a diferentes concentraciones a la columna empacada con distintos tiempos de residencia. Es notable como a una concentración inicial de 500 mg/l tuvo una mejor aceptación por parte de los microorganismos, ya que fue cuando la degradación fue mayor, sobre todo cuando se alimentó a un tiempo de residencia de 15.5 horas.

#### 4. Resultados y discusión

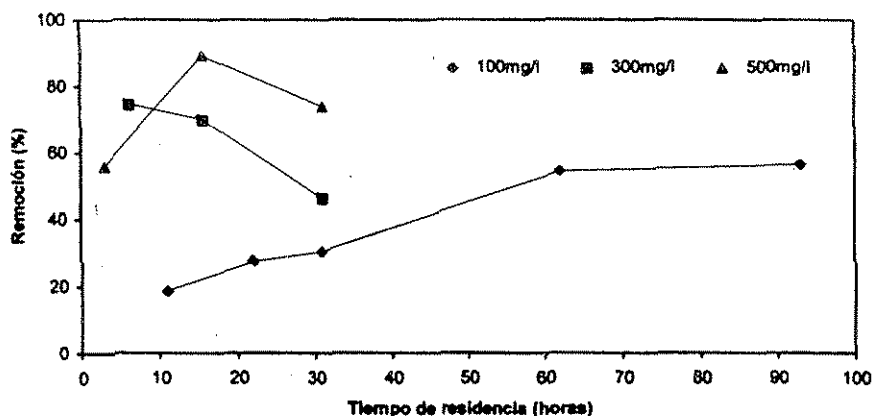


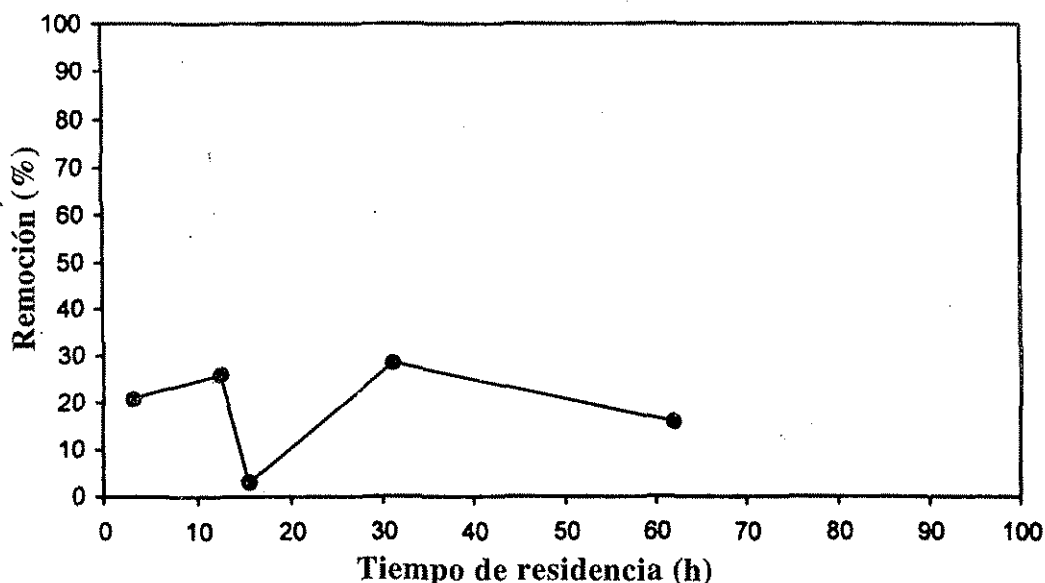
Figura 4.28. Tiempo de residencia hidráulica vs. el porcentaje de remoción del 2,4,6-triclorofenol a diferentes concentraciones.

Como ya se mencionó antes, una mayor concentración representó una mayor degradación, esto debido a que entre mayor cantidad de triclorofenol hay presente en la alimentación, los microorganismos poseen una mayor fuente de carbono y por lo cual tanto su crecimiento como la degradación son mayores. Cuando se hizo lo contrario, es decir, al alimentarse el triclorofenol a concentraciones menores a 500 mg/l, la degradación del compuesto tóxico fue menor, y como ya se observó gráficamente, el triclorofenol a 300 mg/l y a 100 mg/l mostraron un comportamiento inverso con respecto al tiempo de degradación pero si el esperado con respecto a la cantidad degradada debido a la reacción antes comentada de los microorganismos ante las diferentes concentraciones del triclorofenol.

#### 4.6.4 Biodegradación del 2-clorofenol

La alimentación del 2-clorofenol a 500 mg/l, fue el siguiente bloque de cinco etapas consecutivas con el que operó la columna empacada. Las etapas de trabajo fueron desde la 12 hasta la 16. Todas las operaciones llevadas a cabo con este compuesto se realizaron únicamente a la concentración de 500 mg/l, lo único que se varió, fue el tiempo de residencia. Este tiempo de residencia se manejó basándose en los valores anteriormente utilizados en las primeras once etapas. Dichos tiempos de residencia fueron 12.4, 3.1, 31.0, 15.5 y 62.0 horas respectivamente (etapas 12, 13, 14, 15 y 16).

#### 4. Resultados y discusión



**Figura 4.29. Tiempo de residencia hidráulica vs. el porcentaje de remoción del 2-clorofenol a 500 mg/l.**

Como se pudo observar durante el trabajo con 2,4,6-triclorofenol a tres diferentes concentraciones, se decidió solamente alimentar el 2-clorofenol a la mayor concentración utilizada con el triclorofenol, es decir, a 500 mg/l. En las etapas anteriores el 2,4,6-triclorofenol mostró una mayor degradación a esta concentración con respecto a las otras por los motivos previamente discutidos. Como ya se mencionó en los antecedentes, entre más átomos de cloro haya presentes en el anillo bencénico del fenol, mayor es la toxicidad del clorofenol, y al tener una mayor toxicidad, los microorganismos aumentan su actividad de degradación del compuesto tóxico, solamente con los clorofenoles y con un límite para evitar una inhibición de la degradación debido a la alta toxicidad del compuesto alimentado, como determinó Torres (1994) en sus experimentos con compuestos clorados.

En la gráfica 4.29 se puede observar como al ir aumentando el tiempo de residencia, aumenta ligeramente la degradación del 2-clorofenol. Llega un momento en que esa degradación empieza a disminuir, y esto sucede cuando el tiempo de residencia es mayor a 31.0 horas. A partir de 3.1 horas y hasta las 31.0 horas de tiempo de residencia, la actividad de los microorganismos fue ascendiendo, exceptuando el caso del tiempo de residencia de 15.5 horas, donde la degradación fue de apenas un 6 %, durante la etapa 15. Durante las etapas 12 (12.4 horas), 13 (3.1 horas) y 14 (31.0 horas) la

#### 4. Resultados y discusión

degradación del compuesto tóxico estuvo entre el 20 y el 29 %; sólo en el caso del máximo tiempo de residencia (62.0 horas) la degradación disminuyó y fue del 16 %.

Al comparar estos valores con los valores de la degradación del 2,4,6-triclorofenol a 500 mg/l con respecto a los tiempos de residencia de 3.1, 15.5 y 31.0 horas, se observa que son muy bajos, y es bastante notoria la disminución de la actividad de los microorganismos. Por lo anterior, ya no se decidió continuar operando la columna con el 2-clorofenol a 300 y 100 mg/l, ya que la degradación podría haber sido bastante baja, quizá menor al 5 %. Durante la alimentación del 2-clorofenol a la columna empacada, la temperatura ambiente osciló entre 15.5 y 14 °C, y este factor también influyó importantemente en la actividad de los microorganismos. Como ya se discutió anteriormente, la temperatura afecta la actividad de los microorganismos.

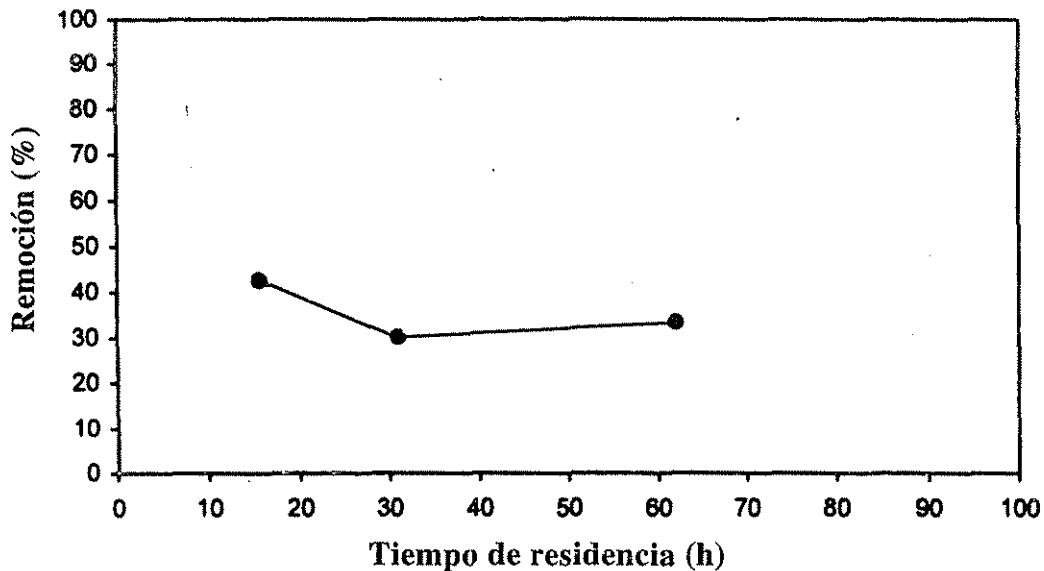
El punto bajo de la gráfica, correspondiente al tiempo de residencia de 15.5 horas, que resulta en una degradación del 6 %, operó con una temperatura promedio de 14.5 °C, y quizá más baja durante la noche. Además se puede agregar que esta temperatura no osciló demasiado, y como es notorio, afectó grandemente la actividad de las *Pseudomonas*, ya que si ese punto se ignorara, y se siguiera la tendencia de la línea, el punto teórico de 15.5 horas sería 27 % de degradación para el clorofenol.

##### 4.6.5 Biodegradación del 2,4-diclorofenol

La alimentación del 2,4-diclorofenol se realizó durante las etapas 17, 18 y 19, a una concentración inicial de 500 mg/l en las tres etapas. Con este clorofenol solamente se operó durante tres etapas a esa única concentración, y la temperatura ambiente osciló entre 13.5 y 14 °C, aún más fría que en las cinco etapas anteriores.

El 2,4-diclorofenol a pesar de ser un compuesto más tóxico que el 2-clorofenol, fue degradado en una proporción un poco mayor que este último. Con un tiempo de residencia menor, 15.5 horas, llevado a cabo durante la etapa 17, la degradación fue del 42.7 %, unas siete veces mayor que la degradación del 2-clorofenol a este mismo tiempo de residencia, pero casi la mitad de la degradación del 2,4,6-triclorofenol a este mismo tiempo de residencia.

#### 4. Resultados y discusión



**Figura 4.30** Tiempo de residencia hidráulica *vs.* el porcentaje de remoción del 2,4-diclorofenol a 500 mg/l.

Como se observa en la gráfica 4.30, al aumentar el tiempo de residencia del 2,4-diclorofenol de 15.5 a 31.0 horas, la degradación del mismo descendió hasta 30.3 %, y al seguir aumentando el tiempo de residencia hasta 62.0 horas, esta degradación ascendió un poco hasta 33.5 %. Cabe decir, que después de alimentar el clorofenol a un tiempo de residencia de 15.5 horas, se procedió a alimentarlo a un tiempo de residencia de 62.0 horas, y finalmente a un tiempo de residencia de 31.0 horas. En la primera etapa de alimentación de 2,4-diclorofenol, la temperatura promedio fue de 14 °C, en la siguiente de 13.5 °C y finalmente otra vez de 14 °C. Nuevamente se nota la influencia de la temperatura sobre la actividad de los microorganismos; ya que al observar la gráfica, el punto de menor actividad es cuando el tiempo de residencia fue de 31.0 horas y, en este punto se presentó la temperatura promedio más baja, 13.5 °C.

Con este clorofenol, también se observa que la temperatura influyó más que el tiempo de residencia sobre la degradación del compuesto tóxico, ya que al disminuir esa en promedio, también disminuyó la degradación aunque el tiempo de residencia se aumentó; pero cuando esa temperatura promedio volvió a ser la misma, fue un poco más notorio la influencia del tiempo de residencia sobre la degradación del compuesto tóxico.

#### 4. Resultados y discusión

Durante este lapso de la operación de la columna con 2,4-diclorofenol, tampoco se trabajó a concentraciones menores a 500 mg/l, solamente con esta última, y únicamente con los tres tiempos de residencia más utilizados en las etapas anteriores. El motivo fue el mismo que en el caso anterior, aunque en éste, las degradaciones fueron un poco mayores.

##### 4.6.6 Biodegradación de pentaclorofenol

El último clorofenol alimentado en forma individual a la columna empacada fue el pentaclorofenol. Este es el clorofenol más compuesto tóxico de todos, y, como su nombre lo indica, el más clorado de todos los clorofenoles. Como ya se mencionó en los antecedentes, este es uno de los clorofenoles más problemáticos de tratar y más peligrosos para el ambiente. También es uno de los más utilizados en México, aunque a veces de forma ilegal, ya que está prohibido.

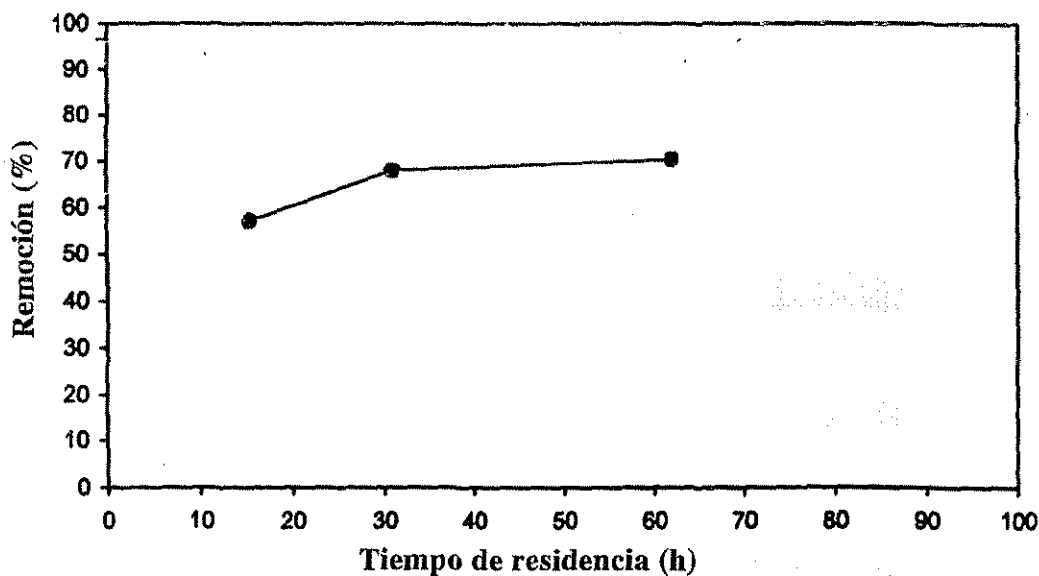


Figura 4.31. Tiempo de residencia hidráulica vs. el porcentaje de remoción del pentaclorofenol a 200 mg/l.

#### 4. Resultados y discusión

Este clorofenol, solamente se alimentó a una concentración máxima inicial de 200 mg/l, debido a su alta toxicidad, a que es menos soluble en agua, además de que en la literatura se reporta que a concentraciones mayores de este clorofenol, las *Pseudomonas* se inhiben y degradan menos.

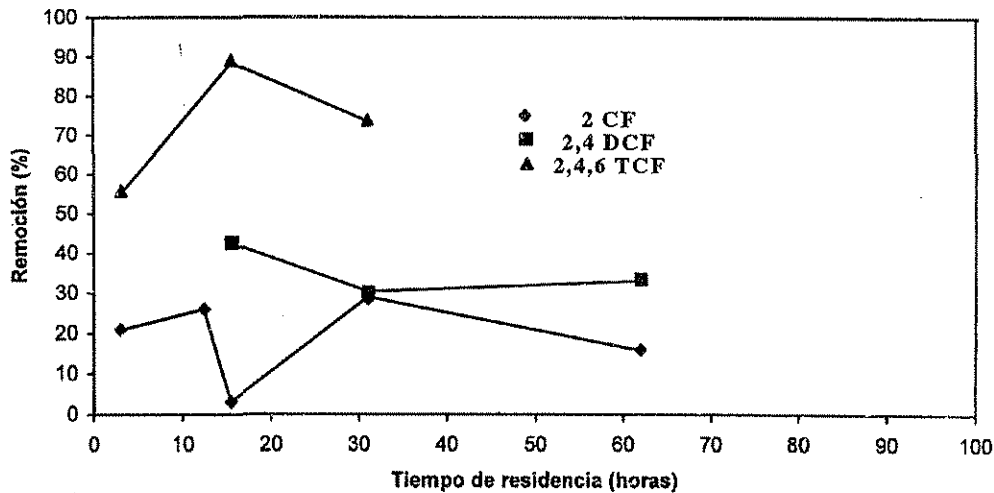
También para este clorofenol, se emplearon los tiempos de residencia de 15.5, 31.0 y 62.0 horas; estas operaciones fueron llevadas a cabo durante las etapas 20, 21 y 22, a 15.5, 62.0 y 31.0 horas de tiempo de residencia, respectivamente.

La degradación de este clorofenol fue mucho mejor que la esperada, ya que en la literatura se menciona que al ser el más compuesto tóxico de todos los clorofenoles y tener un mecanismo de degradación diferente al de los demás clorofenoles, su degradación es lenta y no muy efectiva; pero en este caso, durante estas tres etapas, la degradación estuvo entre 57 y 68%. Durante la etapa 20 la temperatura promedio fue de 16 °C, y en las dos restantes fue de 18 °C; así la influencia negativa de la temperatura sobre el tiempo de residencia no fue tan notable. En la gráfica, se observa una ligera tendencia al aumento de la actividad al aumentar el tiempo de residencia, pero entre 31.0 y 62.0 horas de tiempo de residencia esa tendencia es poco marcada; ya que las degradaciones para esos tiempos de residencia fueron de 68.25 y 68.40 % respectivamente, por lo cual se concluye que al seguir aumentando el tiempo de residencia, no aumentará más la actividad degradadora de los microorganismos.

La degradación del pentaclorofenol quedó situada entre la degradación del 2,4,6-triclorofenol y la del 2,4-diclorofenol. Si teóricamente, se dice que al ser más compuesto tóxico un clorofenol, se presenta una mayor actividad de las *Pseudomonas*, en presencia de una buena temperatura promedio, la degradación del pentaclorofenol debería haber sido la mejor de todos los clorofenoles, pero como ya ha sido mencionado en la literatura, el pentaclorofenol tiene un comportamiento distinto al de los demás clorofenoles. Sobre la base de experimentos ya antes realizados y reportados también en la literatura, estos resultados son bastante satisfactorios.

En la figura 4.32, se encuentran graficados los valores obtenidos de la degradación de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol a una concentración inicial de 500 mg/l. Aquí se pueden observar más claramente las diferencias entre los primeros tres clorofenoles a una misma concentración. Como ya se discutió antes, el 2,4,6-triclorofenol, fue el compuesto tóxico más aceptado y mejor degradado por los microorganismos.

#### 4. Resultados y discusión



**Figura 4.32** Tiempo de residencia hidráulica vs. el porcentaje de remoción del 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol a 500 mg/l.

También se puede notar, que en el tiempo de residencia de 15.5 horas, es en el que se presentó la mejor degradación del 2,4,6-triclorofenol. La degradación del 2,4-diclorofenol fue de casi de la mitad, y además se podría establecer teóricamente que, la degradación del 2-clorofenol puede ser cercana a la del 2,4-diclorofenol, ya que la tendencia de su comportamiento mostró ser casi lineal.

Si se comparan los comportamientos del 2,4-diclorofenol y del 2,4,6-triclorofenol, se observa que son casi contrarios, pero en el caso del primero no tan pronunciada cuando el tiempo de residencia fue de 15.5 horas. Cuando el tiempo de residencia fue menor a 15.5 horas, la degradación del 2,4-diclorofenol se vio favorecida mientras, la del 2,4,6-triclorofenol no se vio favorecida. La biodegradación del 2-clorofenol, se podría considerar como la más baja, y se deduce que, como ya se comentó antes, la variación del tiempo de residencia para este último no fue un factor relevante, aspecto que sí fue claro con los otros dos clorofenoles antes comparados.

Debido a lo mencionado anteriormente, el triclorofenol tuvo más aceptación por parte de los microorganismos, a las tres concentraciones a las que se alimentó, en comparación con el resto de los demás clorofenoles. Esto se puede apreciar muy bien en la figura 4.33, en donde se encuentran graficados los comportamientos de todos los clorofenoles alimentados a la columna.



#### 4. Resultados y discusión

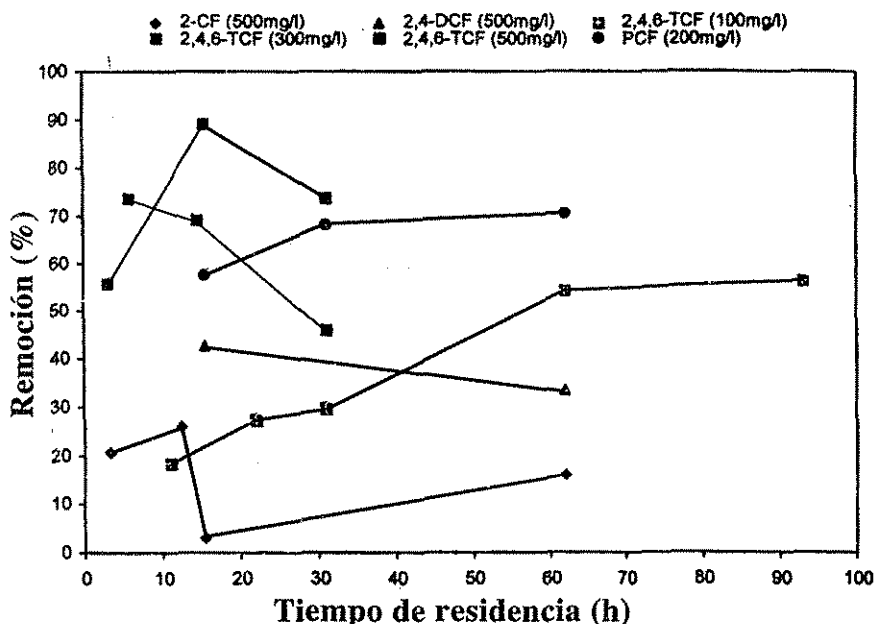


Figura 4.33. Tiempo de residencia hidráulica *vs.* el porcentaje de remoción de los clorofenoles individuales.

En esta figura, es más fácil observar conjuntamente, cómo el tiempo de residencia de 15.5 horas, fue uno de los más empleados en las diferentes etapas; siguiéndolo los tiempos de residencia de 31.0 y 62.0 horas. Cuando se realizó la alimentación de los diferentes clorofenoles al tiempo de residencia de 15.5 horas, se observaron las mayores discrepancias entre las degradaciones de los mismos. El 2,4,6-triclorofenol fue uno de los que mostró un buen comportamiento y un buen porcentaje de degradación a las diferentes concentraciones a las que se adicionó.

Aparentemente, el 2,4,6-triclorofenol mostró menos aceptación a concentraciones iniciales de 300 y 500 mg/l, ya que la degradación disminuyó al aumentar el tiempo de residencia. Cuando se alimentó el 2,4,6-triclorofenol a la concentración de 100 mg/l, el comportamiento fue distinto: al ir aumentando el tiempo de residencia, hubo también un aumento en la degradación del triclorofenol y la influencia de la temperatura no ocasionó los altibajos presentados en los casos del triclorofenol agregado a la columna a 300 y 500 mg/l. En el caso de la concentración de 100 mg/l, la temperatura pudo haber sólo influido de manera general la actividad de los microorganismos, que como ya se

#### 4. Resultados y discusión

discutió, es menor a bajas concentraciones, y ocasionar que únicamente el tiempo de residencia tuviera más relevancia cuando la columna operó con el triclorofenol a la concentración más baja.

Los puntos graficados al tiempo de residencia de 62.0 horas, corresponden en forma descendente al 2,4,6-triclorofenol a 100 mg/l, pentaclorofenol a 200 mg/l, 2,4-diclorofenol a 500 mg/l y 2-clorofenol a 500 mg/l. Es bastante notable que tienden a una línea recta, es decir, a tener un comportamiento lineal. Como ya se comentó anteriormente, el 2,4,6-triclorofenol fue el mejor degradado, seguido del pentaclorofenol. El 2,4,6-triclorofenol a 100 mg/l y el pentaclorofenol a 200 mg/l, alimentados a este tiempo de residencia fueron los únicos en mostrar una tendencia ascendente con respecto a la degradación, en comparación con los tiempos de residencia menores a 62.0 horas. La tendencia del 2,4-diclorofenol se puede considerar que fue descendente y luego ascendente, aunque de manera poco imperceptible. Finalmente, del 2-clorofenol, podría decirse que su comportamiento es lineal, o casi lineal, debido a que, en los tiempo de residencia intermedios, tuvo una pequeña tendencia a aumentar, pero después conforme este tiempo de residencia iba en aumento, entonces esa tendencia volvió a ser casi la inicial.

##### 4.6.7 Biodegradación de la mezcla binaria

A partir de la etapa 23, se comenzó a alimentar a la columna empacada las mezclas de clorofenoles. Primeramente, durante las etapas 23 y 24, se introdujo a la columna una mezcla binaria, compuesta por 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol a una concentración de 200 mg/l. Esta mezcla, con una concentración total de fenoles de 400 mg/l, se alimentó a dos tiempos de residencia diferentes: 15.5 y 31.0 horas. Durante estos tiempos de residencia, la degradación de esta mezcla fue casi la misma, es decir, no hubo influencia alguna del tiempo de residencia, ni tampoco por parte de la temperatura ambiente, ya que para ese entonces la temperatura en promedio ya oscilaba dentro de los mismos rangos, que en un principio se presentaron al inicio de la operación de la columna, 17-18°C.

El 2,4-diclorofenol en lo individual presentó una mejor degradación que la mezcla binaria. A partir de estos resultados, se decidió no llevar a cabo la alimentación de la mezcla a un tiempo de residencia de 62.0 horas, ya que como la degradación durante 15.5 y 31.0 horas de tiempo de residencia, fue de 28.54 y 28.90 %, se consideró necesario aumentar el tiempo de residencia.

#### 4. Resultados y discusión

También se puede concluir que los microorganismos se comportan de manera distinta cuando reciben a los clorofenoles de forma individual o mezclados, como fue en este caso; la determinación de la concentración de las muestras de salida, se realizó conforme a lo ya descrito y citado en los Métodos Estándar (APHA, AWWA y WPCF,1989), es decir, el método colorimétrico. Pudiera ser, que uno de ambos clorofenoles haya sido mejor degradado que el otro, pero por medio de este método, eso no puede determinarse; sólo se pudo determinar la concentración total de fenoles.

##### 4.6.8 Biodegradación de la mezcla ternaria

Con esta mezcla, se operó bajo las mismas condiciones que con la binaria, y basándose en los resultados obtenidos de esta última, se decidió también alimentarla solamente con dos tiempos de residencia diferentes: 15.5 y 31.0 horas.

Esta mezcla también se manejó a una concentración total inicial de 400 mg/l, pero ahora añadiendo pentaclorofenol, quedando finalmente 133.33 mg/l de cada clorofenol en la mezcla.

La alimentación de esta mezcla se realizó durante las etapas 25 y 26. Durante la etapa 25 (con un tiempo de residencia de 15.5 horas), se obtuvo una remoción de la mezcla del 28.25 %, se podría decir que la misma que para la mezcla binaria a este mismo tiempo de residencia. Cuando la alimentación fue llevada a cabo a 31.0 horas de tiempo de residencia, la degradación fue de 35.7%, es decir, que para esta mezcla si hubo una influencia notable del tiempo de residencia sobre la remoción.

Sobre la base de los resultados obtenidos de la operación de la columna empacada con la mezcla binaria, no se realizó la alimentación de la mezcla ternaria a 62.0 horas de tiempo de residencia.

#### 4.7 DEGRADACION DE MEZCLAS DE FENOLES EN OPERACIÓN CONTINUA

##### 4.7.1 Resultados de biodegradación de las mezclas de 200, 400 y 600 mg/l como clorofenoles totales en la columna de 5 litros.

La primera mezcla de clorofenoles evaluada fue la de 400 mg/l (100 mg/l de cada uno de los clorofenoles), seguida de la de 600 mg/l y finalmente la de 200 mg/l. Cada solución fue tratada durante

#### 4. Resultados y discusión

2-3 tiempos de residencia al menos. Se tomaron tres muestras (por la mañana, al medio día y en la tarde) del influente y el efluente.

La remoción de clorofenoles resultó ser una función del TRH para las soluciones con 200 mg/l. En cuanto a todos los clorofenoles individuales (excepto el 2,3,4,6TeCF) a mayor TRH, menor la degradación del compuesto. Parece ser que el 2,3,4,6TeCF fue mejor degradado a un TRH de 62 horas que a 31 horas. En la figura 4.36. Se muestra la remoción de los clorofenoles específicos y totales en función del TRH aplicado. La remoción de clorofenoles fue muy similar para los diferentes compuestos y el promedio de la mezcla, excepto el caso del 2,4,6TCF. Las remociones fueron del orden del 36, 5.6 y 5% para TRH de 15.5, 31 y 62 horas, respectivamente.

Con respecto a la mezcla de 400 mg/l, se puede decir que la remoción de fenoles fue poco dependiente del TRH. En la figura 4.37 se muestran las tendencias encontradas. Como observación general se puede decir que las remociones más altas fueron encontradas a un TRH equivalente a 15.5 horas para los diferentes compuestos evaluados. La remoción de 2,4,6TCF fue claramente menor en comparación con los otros fenoles o la mezcla total. Las remociones logradas fueron mayores (75.6-79.8%) que las obtenidas en el caso de la experiencia con las mezclas de 200 mg/ (42.7-58.7%). Es interesante comparar el comportamiento del 2,4,6TCF para estas dos concentraciones en estudio, el cual es completamente diferente.

Las remociones alcanzadas al trabajar con la mezcla de 600 mg/l, fueron ligeramente mayores que las obtenidas en las dos experiencias anteriores (77.3-86.6%). De hecho, las tendencias observadas para la remoción de clorofenoles específicos y totales en el caso de la mezcla de 600 mg/l son muy similares a las encontradas en el caso de la mezcla de 400 mg/l (ver figura 4.38).

4. Resultados y discusión

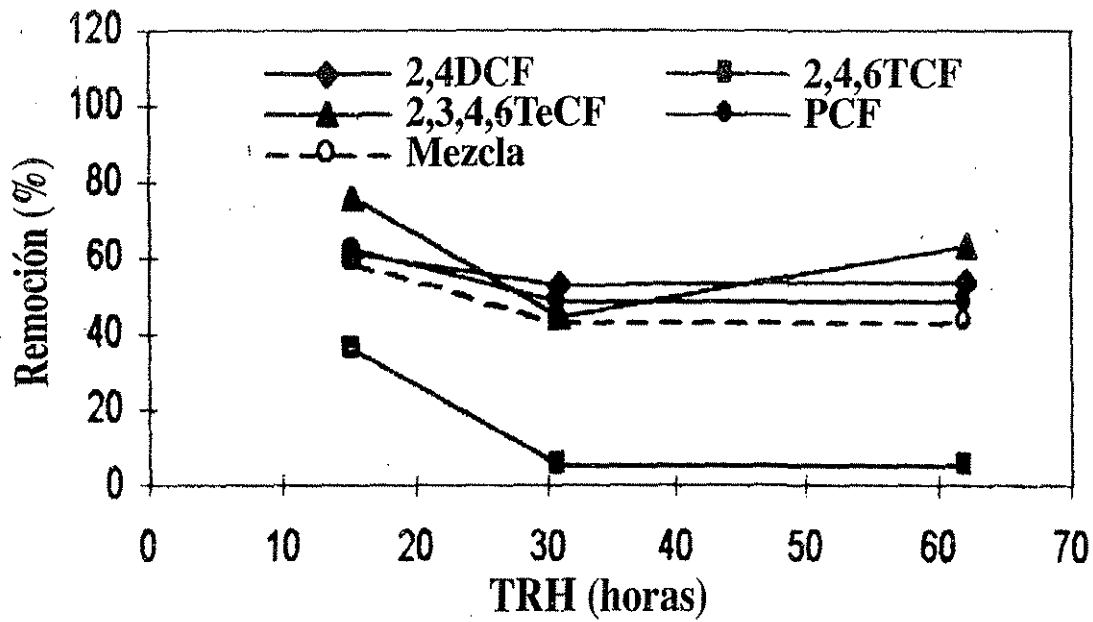


Figura 4.34 Remoción de clorofenoles específicos en función del TRH para una mezcla de 200 mg/l.

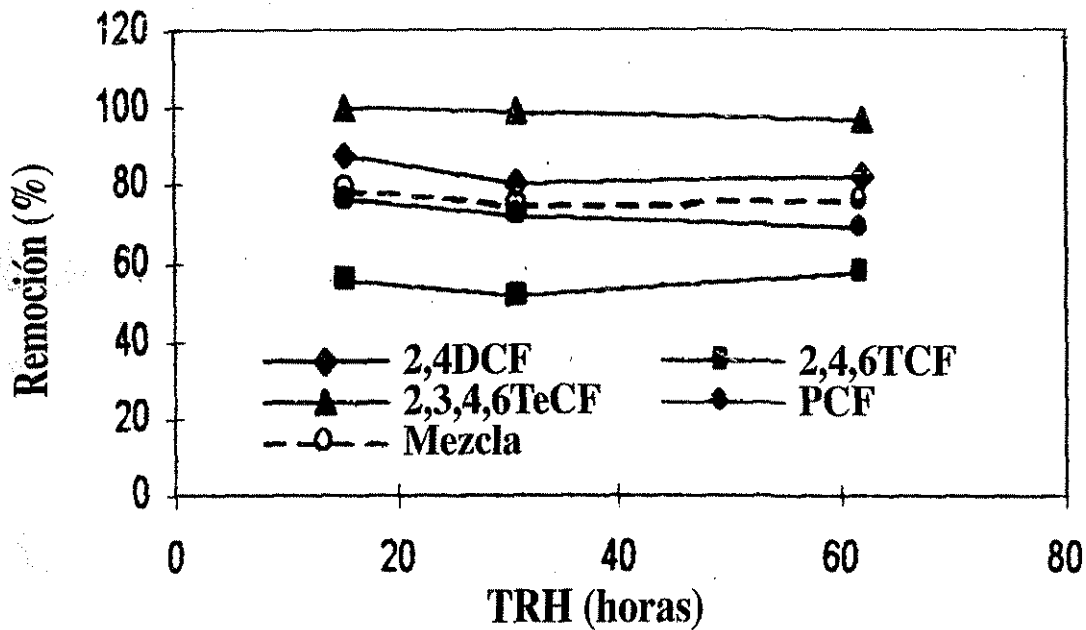


Figura 4.35 Remoción de clorofenoles específicos en función del TRH para una mezcla de 400 mg/l.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 4. Resultados y discusión

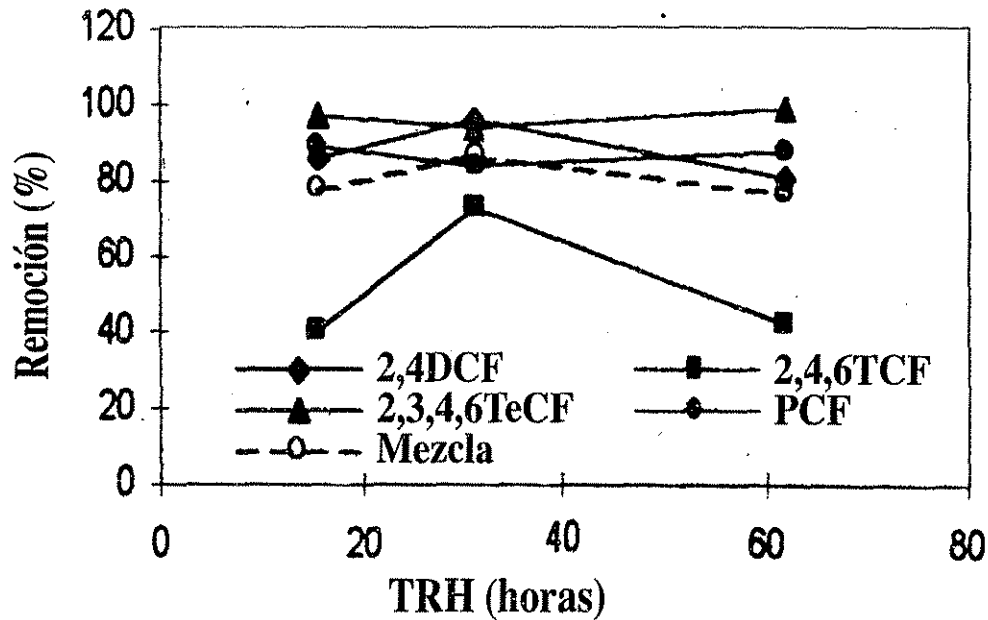


Figura 4.36 Remoción de clorofenoles específicos en función del TRH para una mezcla de 600 mg/l.

En la tabla 4.26 se resumen los valores de las remociones totales de clorofenoles y COT, así como las cargas celulares promedio de la columna y las temperaturas promedio para las diferentes pruebas de degradación. Para las pruebas con el influente de concentración 200, 400 y 600 mg/l, las remociones fueron del 56, 50 y 46%, respectivamente. Este hecho indica que las concentraciones menores de clorofenoles permitieron las más altas remociones de COT. Excepto para el caso de los experimentos con 200 mg/l, las remociones de COT fueron algo menores que las remociones totales de clorofenoles (1.4-2 veces). Estos valores demuestran la capacidad de *Pseudomonas fluorescens* de mineralizar los compuestos clorofenólicos.

#### 4. Resultados y discusión

Tabla 4.26. Resultados de las pruebas de degradación de mezclas de clorofenoles en continuo.

Conc. FT (mg/l)	TRH (horas)	Remoción (%)					
		2,4DCF	2,4,6TCF	2,3,4,6TeCF	PCF	Mezcla	Promedio total
200	15.5	54.73	28.93	88.07	70.47	60.55	
200	15.5	59.15	15.91	68.25	54.91	49.55	56.25
200	15.5	69.88	32.76	7+134	60.61	58.65	
200	31.0	42.27	0.00	73.39	52.98	42.16	
200	31.0	46.45	0.00	67.71	43.15	39.33	43.27
200	31.0	51.29	3.26	68.48	48.57	42.90	
200	31.0	72.01	19.08	56.12	47.56	48.69	
200	62.0	66.84	11.87	58.45	46.24	45.85	
200	62.0	47.51	2.87	70.30	56.72	44.35	42.72
200	62.0	46.72	0.00	62.11	42.98	37.95	
400	15.5	91.46	57.80	100.00	65.97	78.61	
400	15.5	74.45	50.81	100.00	69.31	73.64	79.76
400	15.5	96.84	57.15	99.55	93.77	86.83	
400	31.0	76.01	41.62	99.44	60.08	69.29	
400	31.0	69.37	54.21	100.00	75.73	74.83	75.58
400	31.0	79.29	49.02	98.63	61.66	72.15	
400	31.0	94.87	60.01	98.64	90.63	86.04	
400	62.0	83.41	54.89	97.10	65.69	75.27	
400	62.0	75.62	59.60	99.41	77.02	77.91	76.52
400	62.0	88.73	57.54	95.46	63.72	76.36	
600	15.5	80.85	36.77	100.00	97.03	78.66	
600	15.5	95.07	47.70	90.34	82.05	78.79	78.01
600	15.5	81.73	35.81	100.00	88.75	76.57	
600	31.0	96.28	83.09	92.38	87.22	89.74	
600	31.0	93.76	74.49	89.49	82.64	85.10	86.57
600	31.0	97.22	60.08	100.00	82.21	84.88	
600	62.0	86.84	37.26	96.61	70.27	72.75	
600	62.0	76.67	46.04	100.00	98.68	80.10	77.30
600	62.0	79.43	42.65	100.00	94.20	79.07	

Con respecto a la carga celular de la columna, medida como UFC/g<sub>soporte</sub>, es evidente que este valor se mantuvo a niveles muy cercanos (alrededor de  $1.95-2.97 \times 10^5$  UFC/g<sub>soporte</sub>). Este hecho es importante cuando se comparan los desempeños de la columna utilizando diferentes concentraciones y tiempos de residencia TRH. Las temperaturas promedio de las pruebas estuvieron en el intervalo de 17 a 21°C durante las horas de trabajo (no se registraron las temperaturas durante la noche). Este es un

#### 4. Resultados y discusión

hecho importante, ya que se sabe que muchos procesos degradativos son dependientes de la temperatura.

**Tabla 4.27. Resultados de las corridas de biodegradación, con respecto a la degradación de clorofenoles totales y COT. Los resultados son un promedio de tres réplicas.**

TRH (horas)	Conc. inicial de fenoles (mg/l)	Remoción de COT (%)	Remoción de F totales (%)	Carga celular (UFC/g <small>soporte</small> x10 <sup>5</sup> )	Temperatura (°C)
15.5	200	59.5	58.8	2.97	21.0
31	200	52.1	43.3	2.97	17.0
62	200	57.7	42.7	2.97	17.5
15.5	400	41.3	79.8	2.77	19.0
31	400	52.8	75.6	1.95	18.5
62	400	56.2	76.5	1.95	17.5
15.5	600	45.0	78.0	2.68	20.0
31	600	55.1	86.6	2.68	18.0
62	600	37.9	77.3	2.68	19.2

Con el fin de comparar los resultados de la remoción alcanzada en las pruebas descritas anteriormente y otras experiencias, se decidió convertir los resultados a velocidades de biodegradación VBD, en mg/l.día, tomando en cuenta la cantidad de compuesto removido, y el tiempo de proceso para cada caso. En la tabla 4.28., se muestran las VBD de los clorofenoles y sus respectivas mezclas. Se han incluido los resultados de las pruebas en lote y en continuo, probando clorofenol por clorofenol y mezclas de 4 componentes. Hay que recordar que las experiencias antes descritas presentan algunas diferencias importantes de recordar :

- a) los experimentos en lote fueron llevados a cabo en columnas de 27 y 54 ml, mientras que las experiencias en continuo corresponden a la columna de 5 litros,
- b) las temperaturas de las experiencias en lote fueron siempre fijadas a 28°C, mientras que en la columna en continuo se operó entre 17 y 23°C.



#### 4. Resultados y discusión

Tabla 4.28. Velocidades de biodegradación para los diferentes clorofenoles, concentraciones y sistemas de operación.

Fenol	Conc. mg/l	Operación por lote		Operación continua, mezclas a TRH =		
		Solos**	Mezclas*	62 h	31 h	15 h
2CF	50	43	-	-	-	-
	100	73	-	-	-	-
	200	688	-	-	-	-
	400	1,779	-	-	-	-
	500	1,638	-	-	-	-
2,4DCF	50	45	9.7	7.7	15.3	35.3
	100	69	34.5	23.8	46	100.1
	150	-	40.4	46.4	100.3	197.8
	200	656	4.6	-	-	-
	400	1,388	-	-	-	-
	500	1,669	-	-	-	-
2,4,6TCF	50	52	0.7	1.6	20.7	-
	100	83	37.3	16.5	29.5	53.6
	150	-	40.1	24.2	83.6	92.3
	200	770	1.7	-	-	-
	400	1,765	-	-	-	-
	600	1,983	-	-	-	-
2,3,4,6TeCF	50	-	7.6	9.1	19.1	43.7
	100	-	35.7	28	57.1	115
	150	-	38.3	57	108.2	223
	200	-	2.3	-	-	-
PCF	50	16	7.6	7	13.8	35.7
	100	16	35.4	19.8	41.5	87.9
	150	-	38	50.5	96.7	205.7
	200	204	0	-	-	-
	300	100	-	-	-	-
Como fenoles totales	200	-	33.9	24.6	49.8	135.3
	400	-	145.9	88.1	174.1	376.7
	600	-	157	178	367.7	718.9
	800	-	8.6	-	-	-

Nota: de \*Torres *et al.*, 1997 a. \*\* Torres *et al.*, 1997 b.

Como se muestra en la tabla 4.28., las VBD fueron más altas para el 2,3,4TCF > PCF > 2,4DCF > 2,4,6TCF. Con respecto a los TRH, es claro que los mejores VBD's se obtuvieron a bajos TRH (15 horas). El comportamiento de la mezcla de clorofenoles es considerado

#### 4. Resultados y discusión

bastante bueno. Las VBD estuvieron entre 135 y 719 mg/l.día cuando los TRH se fijaron en 15.5 horas. En el caso de los TRH de 31 horas, las VBD oscilaron entre 50 y 367 mg/l.día. Finalmente, para los mayores tiempos de residencia (62 horas), las VBD fueron de entre 25 y 178 mg/l.día.

Si los valores de VBD (específicamente los obtenidos a TRH=15.5 horas) son comparados con los valores obtenidos en la operación por lote de las mismas mezclas, se concluye que las VBD se incrementaron en un 140-580% debido al proceso en continuo. Por el otro lado, es interesante comparar los valores alcanzados con aquellos obtenidos en operación por lote de los compuestos individuales. Como se observa en la tabla, los valores obtenidos en las experiencias anteriores alcanzan cifras de casi 2,00 mg/l.día, para las concentraciones más altas de los clorofenoles (400-600 mg/l.día.)

#### 4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ALGUNOS DE LOS EXPERIMENTOS EN CONTINUO

Algunos de los experimentos realizados anteriormente (aquellos en los que se realizaron duplicados o triplicados) se analizan en esta sección, con el fin de investigar el efecto de los diversos parámetros manejados, sobre la biodegradación de clorofenoles.

##### 4.8.1 Caso I. Diferentes compuestos, variando el TRH

###### 4.8.1.1 Descripción

Se trata de un diseño multifactorial. El experimento consistió en tratar una corriente que contiene 2CF, 2,4DCF o 2,4,6TCF en el reactor empacado. Se fijó la concentración de los compuestos en 500 mg/l y se variaron los tiempos de residencia y el tipo de compuesto. Se midió el porcentaje de compuesto removido por la técnica colorimétrica. Se hicieron duplicados de los experimentos (ver tabla 4.14).

###### 4.8.1.2 Modelo a utilizar

El modelo a utilizar es un modelo estadístico lineal:

#### 4. Resultados y discusión

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \tau_k + \varepsilon_{ijk} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2 \dots a \\ j = 1, 2 \dots b \\ k = 1, 2 \dots n \end{array} \quad (1)$$

donde:

i: efecto del tipo de compuesto

j: efecto del tiempo de residencia hidráulica

k: efecto de la interacción de ambos parámetros

##### 4.8.1.3 Hipótesis

Las hipótesis a probar son las siguientes:

a) Con respecto al tipo de compuesto

Ho: MC1 = MC2 = MC3

H1: MC1  $\neq$  MC2  $\neq$  MC3

b) Con respecto al tiempo de residencia hidráulica

Ho: MTRH1 = MTRH2 = MTRH3

H1: MTRH1  $\neq$  MTRH2  $\neq$  MTRH3

c) En relación a la combinación de ambas variables

Ho: Mij = M22 = M33

H1: Mij  $\neq$  M22  $\neq$  M33

Para descartar las hipótesis se utilizará el siguiente criterio:

Si  $F_T$  (teórica) >  $F_o$  (calculada), la hipótesis se acepta

Si  $F_T$  (teórica) <  $F_o$  (calculada), la hipótesis se rechaza.

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.8.1.4 Datos

**Tabla 29. Eficiencias de remoción alcanzadas (%) para los diferentes compuestos, en función del TRH.**

*	Tiempo de residencia hidráulica (horas)		
	3.1	15.5	31
Compuesto			
2CF	19,326	18,29,9	25,831,3
2,4DCF	60,60	40,744,9	25,34
2,4,6TCF	48,52,8	85,55,94,19	67,89,2

Después de los cálculos correspondientes se llega al siguiente

##### 4.8.1.5 Resumen

**Tabla 4.30. Resultados del análisis estadístico.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F <sub>0</sub>
Compuesto	8,899,9	(a-1) = 2	4,449,95	1,2144
TRH	727,41	(b-1) = 2	363,70	0,0992
Interacción	-29,934,41	(a-1)/(b-1) = 1	29,934,41	8,1693
Error	32,978,29	Ab(n-1) = 9	3,664,25	-
Total	12,671,19	14	-	-

##### 4.8.1.6 Interpretación

Para un nivel de significancia de 0.05 ( $\alpha = 0.05$ ):

De Montgomery (1991),  $F_{1,9} = 5.12$  y  $F_{2,9} = 4.26$ .

- a) Ya que  $F_0 < F_{1,9}$ , se rechaza la hipótesis, lo que significa que el compuesto en cuestión no es determinante sobre la biodegradación alcanzada en el sistema en continuo.

#### 4. Resultados y discusión

b) Por otro lado,  $F_0 < F_{1,9}$ , por lo que tampoco se puede considerar que el TRH por si solo sea el que determina el porcentaje de biodegradación a alcanzar en la columna en continuo.

c) Finalmente, ya que  $F_0 > F_{2,9}$ , se puede concluir que la combinación de ambos parámetros (tipo de compuesto y TRH) si afecta el desempeño del reactor de lecho fijo.

#### 4.8.2 Caso II. Diferentes concentraciones en la mezcla, variando el TRH

##### 4.8.2.1 Descripción

Se trata de un diseño multifactorial. El experimento consistió en tratar una corriente que contiene 2CF, 2,4,6 TCF, 2,3,4,6TeCF y PCF en el reactor empacado. Se fijó la mezcla de compuestos y se variaron la concentración de los compuestos y los tiempos de residencia. Se midió el porcentaje de compuesto removido por la técnica colorimétrica. Se hicieron triplicados de los experimentos (ver tabla 4.24).

##### 4.8.2.2 Modelo a utilizar

El modelo a utilizar, es un modelo estadístico lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \tau_k + \epsilon_{ijk} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2 \dots a \\ j = 1, 2 \dots b \\ k = 1, 2 \dots n \end{array} \quad (1)$$

donde:

i: efecto de la concentración total de la mezcla.

j: efecto del tiempo de residencia hidráulica

k: efecto de la interacción de ambos parámetros

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.8.2.3 Hipótesis

Las hipótesis a probar son las siguientes:

d) Con respecto a la concentración total de la mezcla

$$H_0: MC1 = MC2 = MC3$$

$$H_1: MC1 \neq MC2 \neq MC3$$

e) Con respecto al tiempo de residencia hidráulica

$$H_0: MTRH1 = MTRH2 = MTRH3$$

$$H_1: MTRH1 \neq MTRH2 \neq MTRH3$$

f) En relación a la combinación de ambas variables

$$H_0: M_{ij} = M_{22} = M_{33}$$

$$H_1: M_{ij} \neq M_{22} \neq M_{33}$$

Para descartar las hipótesis se utilizará el siguiente criterio:

Si  $F_T$  (teórica) >  $F_0$  (calculada), la hipótesis se acepta.

Si  $F_T$  (teórica) <  $F_0$  (calculada), la hipótesis se rechaza.

##### 4.8.2.4 Datos

**Tabla 4.31 Eficiencias de remoción alcanzadas (%) para los diferentes compuestos, en función del TRH.**

Concentración (mg/l)	Tiempo de residencia hidráulica (horas)		
	15,5	31	62
200	60,55, 49,55, 58,65	42,16, 42,90, 48,69	45,85, 44,35, 37,95
400	78,81, 73,64, 86,83	69,29, 72,15, 86,04	75,27, 77,91, 76,36
600	78,66, 78,79, 76,57	89,14, 85,10, 84,88	72,75, 80,10, 79,07

#### 4. Resultados y discusión

Después de los cálculos correspondientes se llega al siguiente

##### 4.8.2.5 Resumen

Tabla 4.32. Resultados del análisis estadístico.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Concentración	5,821,24	(a-1) = 2	2,910,62	11,87
TRH	153,50	(b-1) = 2	76,75	0,0135
Interacción	5,667,64	(a-1)/(b-1) = 1	5,667,64	22,75
Error	4,482,75	Ab(n-1) = 18	249,04	-
Total	7,159,73	23	-	-

##### 4.8.2.6 Interpretación

Para un nivel de significancia de 0.05 ( $\alpha = 0.05$ ):

De Montgomery (1991),  $F_{1,18} = 4.41$  y  $F_{2,18} = 3.55$ .

a) Ya que  $F_o > F_{2,18}$ , se acepta la hipótesis, lo que significa que la concentración de la mezcla es determinante sobre la biodegradación alcanzada en el sistema en continuo.

b) Por otro lado,  $F_o < F_{2,18}$ , por lo que se rechaza la hipótesis. Esto significa que el TRH por si solo no determina el porcentaje de biodegradación a alcanzar en la columna en continuo.

c) Finalmente, ya que  $F_o > F_{1,18}$ , se puede concluir que la combinación de ambos parámetros (concentración de la mezcla y TRH) si afecta el desempeño del reactor de lecho fijo.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusión general

Se comprueba que la bacteria *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada en el soporte adecuado es capaz de tratar corrientes acuosas que contienen clorofenoles o mezclas de ellos, aún en altas concentraciones (en el orden de cientos de miligramos por litro), con eficiencias muy variables, dependiendo del sistema empleado.

En particular, se concluye que para tratar una mezcla de clorofenoles o fenol solo se recomienda emplear un reactor de biomasa fija, con el fin de disponer de una alta concentración de células por unidad de volumen, además de minimizar los efectos tóxicos de la corriente por tratar. Se sugiere utilizar como empaque tezontle (mallas 12, 14 y 16), por ser un material económico ( $\$/m^3$ ), altamente poroso, de fácil disponibilidad y resistencia mecánica mayor a la de otros empaques probados.

En caso de ser posible y sobre todo rentable, operar a 28°C, que es el valor óptimo para el crecimiento y actividad de *Pseudomonas fluorescens*. Habrá que adicionar la cantidad de nitrógeno y fósforo necesarios para la óptima actividad del microorganismo, semejante a las reportadas en el medio de Dapaah (0.488 1.59 mg/l de sulfato de amonio y fosfatos de potasio, mono y dibásicos, respectivamente).

Para un reactor en operación por lote se recomienda recircular la corriente a tratar el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación cercana o superior al 95%. Esto es factible para los clorofenoles en concentraciones no mayores de 600-700 mg/l (excepto el caso del clorofenol, que puede ser tratado en concentraciones de hasta 200 mg/l). Para el caso de las mezclas se recomienda no exceder una concentración total de 600 mg/l.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

Para un reactor en operación continua, se recomienda permitir que la corriente a tratar y los microorganismos estén en contacto entre 15 y 30 horas, para alcanzar las máximas eficiencias de remoción. El análisis estadístico aplicado a las pruebas realizadas en un reactor continuo demostró que el TRH por sí solo no determina el nivel de degradación de las mezclas, sino que una combinación del tipo de compuesto, concentración total de clorofenoles y el TRH, son quienes determinan el grado de degradación de los clorofenoles presentes. De esta manera se obtendrán degradaciones de entre 43 y 87% y niveles de mineralización (remoción de materia orgánica medida como COT), de entre 41 y 60%.

### 5.2 Conclusiones específicas.

#### 5.2.1 Aspectos bioquímicos y microbiológicos de *Pseudomonas fluorescens*

5.2.1.1 La bacteria elegida para el estudio presentó una gran capacidad metabólica para transformar/mineralizar el fenol y a algunos cloro, metil y nitrofenoles, así como el ácido 2,4 diclorofenoxi acético, que son considerados como compuestos tóxicos.

5.2.1.2 Las velocidades de biodegradación del 2CF, 2,4 DCF, 2,4,6TCF y PCF, cuando se emplearon las células libres, son del orden de 4.6, 7.1, 3.9 y 3.3 mg/l.día respectivamente, para concentraciones iniciales de 100, 100, 100 y 50 mg/l. Cuando estos mismos compuestos fueron tratados con las células inmovilizadas en tezontle y empacadas en una columna operando en lote, las velocidades máximas fueron de 1,779, 1,669, 1,765 y 204 mg/l (para concentraciones de 400, 500, 400 y 200 mg/l), respectivamente. Si se comparan las velocidades a concentraciones iniciales iguales, se observa que las velocidades se multiplican por factores de 16, 10, 21 y 5 aproximadamente.

5.2.1.3 Se determinó que el mecanismo de degradación de los CF es la dechloración del intermediario alifático después de la ruptura del anillo aromático (para el 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF) como ha sido sugerido por Uotila(1993) para la dechloración de mono y diclorofenoles por los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Rhodococcus*. En cuanto al mecanismo de degradación del PCF, el mecanismo evidentemente es otro, quizás la dehidroxilación, como lo revisa Uotila (1993) para la degradación de fenoles policlorados por los géneros *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* y *Flavobacterium*.

### 5.2.2 Soporte más adecuado para la inmovilización

5.2.2.1 Cuatro soportes fueron caracterizados en cuanto a su capacidad para retener a *Pseudomonas fluorescens*. Los resultados se expresan como UFC/g soporte. La arena (con una porosidad de aproximadamente 52%) fue capaz de retener  $8.43 \times 10^4$  UFC/g soporte. Por su parte, el tezontle (con una porosidad del 65 %) retuvo hasta  $1.39 \times 10^{11}$  UFC/g soporte. El carbón activado (con una porosidad del 68% y conocida capacidad de adsorción) fué capaz de retener hasta  $4.7 \times 10^{15}$  UFC/g soporte. Finalmente, por medio del proceso de atrapamiento, las esferas de alginato de calcio retuvieron hasta  $3.85 \times 10^{14}$  UFC/g soporte. Aunque para este material no se puede calcular la porosidad, se reporta que la fracción de vacíos (equivalente a la porosidad) resultó de 0.74.

Por lo anterior se puede decir que el mejor soporte para inmovilizar a la bacteria *P. fluorescens* es el tezontle con tamaño de mallas 12, 14 y 16.

El desarrollo del catalizador de alginato de calcio demostró amplias posibilidades de aplicación, pero éste tiene limitaciones que presenta debido a la baja resistencia física de las partículas producidas.

### 5.2.3 Condiciones para la producción masiva de *P. fluorescens*

5.2.3.1 En este trabajo se presentan además las condiciones para producir masivamente células de *Pseudomonas fluorescens*. Un cultivo de 24 horas en medio YPG puede desarrollar hasta alrededor de 1 g/l de células (alrededor de  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml medio). Con 30 litros de este cultivo es suficiente para inocular la columna empacada con tezontle con capacidad de 5 litros, situación que en la práctica podría ser de sumo interés, ya que una de las grandes limitantes de los procesos biológicos frente a los fisicoquímicos es el tiempo de arranque.

5.3.2.2 Las cuentas celulares desarrolladas en cajas con medio YPG (adecuado para toda bacteria heterótrofa) y medio King B (específico para bacterias fluorescentes) tuvieron valores muy cercanos a  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml medio, lo que demuestra que la mayor parte de las bacterias cultivadas son *Pseudomonas fluorescens*. El mismo comportamiento fue observado en la columna empacada durante

## 5. Conclusiones y recomendaciones

los 10 meses que se mantuvo en operación. Este procedimiento de cuenta en placa puede ser el método a emplear para la operación de la columna en escala real.

### 5.2.4 Tratamiento de los compuestos por separado en una columna empacada operando en lote

5.2.4.1 La columna empacada con las esferas de alginato de calcio-*Pseudomonas fluorescens*, fue capaz de tratar efluentes conteniendo F, 2CF, 2,4DCF y 2,4,6TCF en concentraciones de 1000, 500, 400 y 100 mg/l, respectivamente con eficiencias de remoción de 98, 95, 98 y 97%. Las VBD para este caso fueron de 669, 346, 191 y 38 mg/l.día, respectivamente. Las velocidades específicas de remoción fueron 58.4, 3.31, 3.86 y 55.3 mg/UFC.día, para dichos compuestos.

5.2.4.2 En operación por lote (para la columna empacada con tezontle), los compuestos fueron degradados exitosamente (alrededor del 95% de eficiencia) en concentraciones de hasta 1000mg/l (F), 600 mg/l (2CF y 2,4DCF), 700 mg/l (2,4,6TCF) y 300 mg/l (PCF). Las velocidades de biodegradación máximas fueron del orden de 413, 1780, 1,670, 2,190 y 200 mg/l.día, respectivamente. Las eficiencias de degradación fueron mayores o iguales a 95%.

5.2.4.3 La relación C/N tuvo un importante efecto sobre la actividad de la columna empacada con tezontle, operando en lotes. A mayor relación C/N, menor fue la actividad de la columna como mg/l.día para el intervalo C/N de 0.5 a 2. El nivel óptimo de nitrógeno resultó ser el que resulta en una relación C/N=0.5.

5.2.4.4 Los compuestos tratados por éste método fueron mineralizados en diferentes proporciones. Por ejemplo, al tratar CF, DCF, TCF y PCF a concentraciones de 300 mg/l, se alcanzaron degradaciones del 86, 89, 94 y 59% a las 24 horas, mientras que la disminución de COT alcanzó valores de 63, 47, 71 y 14%, respectivamente.

### 5.2.5 Tratamiento de mezclas en la columna empacada operando en lote

5.2.5.1 Cuando 4 de los clorofenoles (2,4DCF, 2,4,6-TCF, 2,3,4,6TeCF y PCF) fueron mezclados y alimentados a la columna en operación por lote, dependiendo de la concentración de la mezcla de

## 5. Conclusiones y recomendaciones

clorofenoles, los valores de la velocidad de biodegradación se vieron reducidos importantemente (entre 1/2 y 1/450 del valor correspondiente a los 68, 79 y 2%, respectivamente).

5.2.5.2 Las mezclas de 200, 400 y 600 mg/l alcanzaron remociones totales de hasta 87, 97, y 99%, respectivamente. La mezcla con concentración total de 800 mg/l no pudo ser tratada debido a un fuerte efecto tóxico. También se observó un alto valor de mineralización total para las mezclas de 400 y 600 mg/l (70-80%).

5.2.5.3 En cuanto a la toxicidad de las mezclas de DCF, TCF TeCF y PCF expresadas como concentraciones totales de 400, 600 y 800 mg/l, se obtuvo que la toxicidad es de 41, 52 y 358 mg/l, como EC50 (dosis letal media). Al finalizar el proceso de biodegradación en la columna empacada con tezontle, las toxicidades llegaron a niveles de 21, 12 y 278. mg/l (como EC50), lo que significa que hubo una disminución de 48, 77 y 22% en la toxicidad, respectivamente.

### 5.2.6 Tratamiento de los compuestos por separado en la columna empacada operando en continuo

5.2.6.1 La concentración de células durante la operación de la columna (10 meses) fué de entre  $10^4$  y  $10^7$  UFC/g<sub>soporte</sub>, dependiendo del compuesto/mezcla inyectada a la columna y el tiempo de residencia hidráulica utilizado, valores que muestran la afinidad de *Pseudomonas* por los sustratos, en alguna forma.

5.2.6.2 Cuando se empleó una columna de 5 litros de capacidad, en operación continua (a temperatura ambiente) para tratar a los clorofenoles por separado, se encontró que los valores de la velocidad de biodegradación se incrementaron con respecto a aquellos obtenidos para las células libres, pero no son mayores que los encontrados al tratar a los compuestos específicos en un sistema inmovilizado trabajando por lotes. Estos valores son dependientes del tipo de tóxico, de la concentración del mismo y del tiempo de residencia hidráulica, por lo que quizá en la práctica valga la pena trabajar en reactores por lote para tener procesos menos complejos de operar y un mayor control sobre el reactor.

5.2.6.3 Cuando se alimentan clorofenoles por separado a una concentración única, se encontró que al compuesto en cuestión no es determinante sobre la biodegradación alcanzada en el sistema.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

Tampoco el TRH por si solo determina el porcentaje de biodegradación a alcanzar en la columna, y es la combinación de ambos parámetros el que ajusta el desempeño del reactor de lecho fijo.

### 5.2.7 Tratamiento de las mezclas en la columna empacada operando en continuo

5.2.7.1 La tasa de biodegradación de los clorofenoles en una mezcla de 200, 400, 600 y 800 mg/l alcanzaron valores de 9 a 146 mg/l.día. Las eficiencias de remoción para las mezclas de clorofenoles fueron de entre 43 y 86 %. Los valores de mineralización total fueron de entre 38 y 60 %.

5.2.7.2 Si se considera bajo el mismo régimen de operación la degradación del total de clorofenoles presente, las velocidades de degradación son importantes comparadas con las anteriores. En la mezcla de 200 mg/l la degradación fue de 24 a 135 mg/l.día, mientras que para la mezcla de 400 mg/l los valores oscilaron entre 88 y 376 mg/l.día. Finalmente, los valores para la mezcla de 600 mg/l fueron de 178 a 720 mg/l.día.

5.2.7.3 La mineralización alcanzada para las mezclas de clorofenoles fue de entre 38 y 58%, dependiendo del TRH y la concentración total como clorofenoles.

5.2.7.3 Cuando se alimentó una mezcla de clorofenoles de igual naturaleza, modificando la concentración total y el TRH se encontró que la concentración de la mezcla es determinante sobre la degradación alcanzada en el sistema en continuo. El TRH por sí solo no determinó el porcentaje de biodegradación alcanzado en la columna, pero una combinación de ambos factores si afecta el desempeño del reactor de lecho fijo.

Cabe aclarar que es difícil comparar todos los resultados anteriores con lo reportado en la literatura, pues hay pocos trabajos en los que se traten corrientes que contienen clorofenoles en altas concentraciones, y aún menos en los que se traten mezclas de cuatro clorofenoles simultáneamente. La aportación de este trabajo reside precisamente en que es la primera vez en que se reporta la degradación de altas concentraciones de derivados mono-, di-, tri-, tetra- y pentaclorados del fenol, por medio de una bacteria inmovilizada en un soporte tan sencillo y económico como lo es el tezontle. Sí existen, por supuesto, trabajos en los que se ha reportado aisladamente la degradación de di-, tri y pentaclorofenol, bajo condiciones muy distintas a las utilizadas en este trabajo.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

Otra aportación fundamental es que la bacteria empleada no requiere de largos procesos de aclimatación como en otros trabajos se ha reportado, y que al inmovilizarla en el soporte descrito se cuenta con un sistema estable, que no se contamina con otros microorganismos, a pesar de no utilizar un sistema estéril.

Otro aspecto relevante del trabajo es que no se consideró el suministro de aire u oxígeno adicional al disuelto en la corriente de entrada, con tal de no aumentar el costo y complejidad de la operación. Tampoco se requiere de un equipo costoso y sofisticado.

Por lo anterior, se hacen las siguientes

# RECOMENDACIONES

Las recomendaciones que se desprenden después de concluir este trabajo son las siguientes:

a) Completar el estudio de la biodegradación de compuestos tóxicos desde el punto de vista de las rutas metabólicas. Específicamente es necesario estudiar la complejidad de las reacciones que se llevan a cabo cuando una mezcla de compuestos son puestos en contacto con una sola bacteria. De esta manera se explicarán más ampliamente las degradaciones alcanzadas al tratar las mezclas de clorofenoles en la columna empacada con tezontle.

b) Llevar a cabo estudios de degradación de mezclas de clorofenoles en una columna en continuo a temperatura controlada. Estudiar el efecto de la adición de oxígeno (aire) al sistema, si se quiere estudiar el efecto que la temperatura ejerce sobre la capacidad de biodegradación de las bacterias. Por supuesto que es poco práctico pensar en un sistema a escala real, trabajando con un efluente al que se le modifica la temperatura antes de tratarlo, sin embargo el interés sería científico.

c) Aspectos de ingeniería, tales como las transferencia de masa en la columna empacada, deben ser investigados y aplicados al diseño del sistema en escala piloto. Conforme el tamaño de la columna empacada aumenta, los problemas de transferencia de masa se harán más evidentes y complicarán la operación de la columna empacada.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

d) Es importante plantear un modelo matemático que describa la operación de la columna empacada en el tratamiento de clorofenoles o mezclas. En este trabajo no se consideró diseñar los experimentos con el fin de plantear un modelo matemático, puesto que es un estudio para ver la aplicabilidad de la cepa bacteriana en diferentes condiciones.

e) Convendría iniciar estudios relativos a la degradación de compuestos tóxicos utilizando un par de microorganismos que se complementen en tal actividad metabólica, quizás de esa manera se podrían complementar la degradación de los compuestos y su mineralización.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 6. REFERENCIAS

Anselmo A.M. y J.M. Novais (1992) Degradation of phenol by immobilized mycelium of *Fusarium flocciferum* in continuous culture. **Water Science and Technology**. **25**(1): 161-168.

APHA, AWWA, WPCF (1989) Standard methods for the examination of water and wastewater. 17<sup>th</sup> Edition. Washington D.C., U.S.A.

Arvin E. (1991) Biodegradation kinetics of chlorinated aliphatic hydrocarbons with methane oxidizing bacteria in an aerobic fixed biopelícula reactor. **Water Research**. **25**(7):873-881

Armenante P.M., G. Lewandowski and I.I. Haq (1992) Mineralization of 2-chlorophenol by *Phanerochaete* using different reactor designs. **Hazardous Waste and Hazardous Materials**. **9** (3):213-229.

Bae H.S. J.M. Lee and S-T. Lee (1997) Biodegradation of the mixture of 2,4,6-trichlorophenol, 4-chlorophenol and phenol by a defined mixed culture. **Journal of Genetics and Applied Microbiology**. **43**: 97-103.

Belfanz J. y H.J. Rehm (1991) Biodegradation of 4-chlorophenol by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**. **35**: 662-668.

Beltran N, B.E. Jiménez y L.G. Torres (1997) Uso de biocatalizadores para el tratamiento de tóxicos en aguas residuales. **Gyros**. **4**(5) :38-39.



## 6. Referencias

Bettman H. y H.J. Rehm (1985) continuous degradation of phenol(s) by *Pseudomonas putida* P8 entrapped in polyacrilamide-hydracide. **Applied Microbiology and Biotechnology**. **22**:389-393.

Blum D.J.W y R.E. Specee (1991) A data base of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. **Research Journal Water Pollution Control Federation**. **63**(3): 198-207.

Cabello (1999) Biodegradación aerobia de fenoles por medio de *Pseudomonas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Chetman P.S.J. y C Brucke (1984) Immobilization of microbial cells and their use in wastewater treatment. **Microbial methods for environmental biotechnology**. J.M. Grainer y J.M. Lynch (Edit) **Society for Applied Bacteriology. Technical series 19**. Academic Press. USA.

Dapaah S.Y. y G.A. Hill (1992) Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomonas putida*. **Biotechnology and Bioengineering**. **40**: 1353-1358.

Deront M., N. Adler, M. Bokhamy, J.P. Kradolfer, A. Zufferey and P. Peringer. (1997) Experimental study of biofilm formation on different carriers in sodium anthraquinone sulphonate biodegradation.

Ehrardt H.M. y H.J. Rehm (1985) Phenol degradation by microorganisms adsorbed on activated carbon. **Applied Microbiology and Biotechnology**. **21**: 32-36.

Ehrardt H.M. y H.J. Rehm (1989) Semicontinuous and continuous degradation of phenol by *Psseudomonas putida* P8 adsorbed on activated carbon. **Applied Microbiology and Biotechnology**. **30**: 312-317.

## 6. Referencias

Eckenfelder W.W. (1991) Strategies for toxicity reduction in industrial waste-waters. **Water Science and Technology**. 24(7):185-193.

Fava F., F. Baldoni, L. Marchetti and G. Quattroni (1996) A bioreactor system for the mineralization of low-chlorinated biphenyls. **Process Biochemistry**. 31(7):659-667.

Field J.A., A.J.M. Stams, M. Kato y G. Schraa (1995) Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. **Antoine van Leeuwenhoek**. 67: 47-77.

García M. R. (1992) Contaminantes tóxicos prioritarios en agua. **Universidad Autónoma de Chapingo**. México.

Hagblom y Salkinojia (1991) Biodegradability of chlorinated organic compounds in pulp bleaching effluents. **Water Science and Technology**. 24(3/4): 161-170.

Hannote M., F. Flores, L. Torres y E. Galindo (1991) Apparent yield stress estimation in xanthan gum solutions and fermentation broths using a low-cost viscometer. **The Chemical Engineering Journal**. 45: B49-B56.

Hendriksen H, S. Larsen, y B. Ahring (1991) Anaerobic degradation of PCP and phenol in fixed-film reactors: the influence of an additional substrate. **Water Science and Technology**. 24(3/4):431-436.

Holt J., entre otros autores (1994) Bergy's Manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins /Edits) Baltimore, USA.

## 6. Referencias

Ibarra M. y R Rodríguez (1993) Biodegradación de compuestos clorofenólicos. **Memorias del 5to. Congreso de Biotecnología y Bioingeniería**. Puerto Vallarta, México. Septiembre de 1993.

INEGI (1995) La industria química en México. Instituto Nacional de Estadística , Geografía e Informática. México.

Karel S.F., S.B. Shari and C.R. Robertson (1985) The immobilization of whole cells: engineering principles. **Chemical Engineering Science**. **40(8)**:1321-1354.

Kewelo H., H.J. Heipierper and H.J. Rehm (1989) Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium-alginate. **Applied Microbiology and Biotechnology** **31**: 383-389.

Khlevnikov A. and P. Péringer. (1996) Biodegradation of p-toluensulphonic acid by *Comamonas testosteroni* in an aerobic counter-current structured packing reactor. **Proceedings of the second international conference on microorganisms in activated sludge and biopelícula process**. Berkeley, California. Julio 21-23, 1997.

Klein J. y H. Ziehr (1990) Immobilization of microbial cells by adsorption. **Journal of Biotechnology**. **16**: 1-6.

Lee C.M, C.J. Lu and M.S. Chuang (1994) Effects of immobilized cells on the biodegradation of chlorinated phenols. **Water Science and Technology**. **30(9)**: 87-90.

McAllister K., H. Lee y J.T. Trevors (1996) Microbial degradation of pentachlorophenol. **Biodegradation**. **7**: 1-40.

## 6. Referencias

Morsen A. y H.J. Rehm (1987) Degradation of phenol by a mixed culture of *Pseudomona* and *Cryptococcus elinonii* adsorbed on activated carbon. **Applied Microbiology and Biotechnology**. **26**: 283-288.

Morsen y Rehm (1990) Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass. **Applied Microbiology and Biotechnology**. **33**: 206-212.

Nemerow N.I. (1987) Industrial water pollution: Origin, characteristics and treatment. **Addison-Wiley Publishing Co.** New York, N.Y. USA.

PEMEX (1997) Estadísticas PEMEX: producción de petróleo y gas natural. Red Internet <http://pemex.com>

Puhakka J., E. Melin, K. Jarvinen, T. Tuhkanen y W. Sieh (1991) Oxidic fluidized-bed treatment of dichlorophenols. **Water Science and Technology**. **24**(3/4): 171-177.

Puhakka J., W. Sieh, K. Jarvinen y E. Melin (1992) Chlorophenol degradation under oxidic and anoxic conditions. **Water Science and Technology**. **25** (3/4): 147-152.

Puhakka, J.A., E. S. Melin, K. Jarvinen, P. M. Koro, J.A. Rintala, P. Hartikainen, W.K. Shieh and J. F. Ferguson (1995). Fluidized biofilms for chlorophenol mineralization. **Water Science and Technology**. **31**(1):227-235.

Quirazco M.(1994) Producción y caracterización de un biocatalizador con actividad glucosil transferasa. Tesis de maestría. UACPy/CCH/UNAM. México

Rochkind-Dubinsky M.L., G.S. Saylor, y J.W. Blackburn (1987) Microbial decomposition of chlorinated aromatic compounds. Microbiology series Volume 18. Marcel Dekker Inc. USA.

## 6. Referencias

RREL (1994) Risk reduction Engineering Laboratory. Base de datos, software. USEPA. Cincinnati, Ohio. USA.

Sánchez de la Vega A. (1996) Diseño de un biocatalizador para la remoción de clorofenoles en agua. Facultad de Química UNAM. Tesis de Licenciatura.

Seigneur Ch., V. Mottier, C. Pulgarin, N. Adler and P. Péringer. Biodegradation of xenobiotics in a fixed bed reactor (1993). **Environmental Progress**. **12**(4):306-311.

Shwu ling P., H. Yu-lan, Ch. Nyuk-Min, S. Ching-Sen y Ch. Cheishiang (1995) Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus sp.* Immobilized on granular activated carbon and Calcium alginate. **Bioresource Biotechnology**. **51**: 37-42.

Silva E. y J. Campos (1996) Biological phenol degradation by immobilized-cells of *Pseudomonas putida* in a three phase fluidized bioreactor. **Memorias del Congreso de la AIDIS. Ciudad de México**, febrero de 1996.

Singer P.C., K.F. Pfaender, J. Chinchilli y C.J. Lamb (1977) Composition and biodegradability of organics in coal conversion wastewaters. **Symposium Proceedings. Environmental aspects of Fuel Conversion Technology III**: Hollywood, Fla. USA: 461-486.

Singer P.C. y C.H. Yen (1980) Adsorption of alkyl phenols by activated carbon. En: **Activated carbon adsorption of organics from aqueous phase. Vol 1**. Sufet y Mcguire (Edits) Michigan, USA: 168-189.

Sung H.B., J. M. Lee and S.T. Lee (1997) Biodegradation of the mixture of 2,4,6-trichlorophenol, 4-chlorophenol and phenol by a defined mixed culture. **Journal of General and Applied microbiology**. **43**:97-103.

## 6. Referencias

Song J.J. y Y.H. Kwon (1996) **Memorias de la 18va. Conferencia Internacional del IAWQ**. Singapur, Asia. Junio de 1996.

Tyagi R.D. y K. Vembu (1990) Wastewater treatment by immobilized cells. **CRC Press**. USA.

Torres L.G. (1994) Remoción de fenol y clorofenoles en agua por medio de microorganismos inmovilizados. **Biotecnología**. 4(2): 49-65.

Torres L.G., M. Hernández, E.R. Bandala, Y. Pica, V. Albiter y B.E. Jiménez (1997a) Degradation of di-, tri-, tetra-, and pentachlorophenol mixtures in an aerobic biofilter. **Applied Microbiology and biotechnology**. Sometido.

Torres L.G., V. Albiter y B. Jiménez (1997b) Removal of chlorophenols including pentachlorophenol at high concentrations from contaminated waters. **In situ and on-site bioremediation**. New Orleans. Abril-mayo 1997. USA.

Torres L.G. , P. Mijaylova y G. Moler (1997) Uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos. **Ingeniería Hidráulica en México**. 12(3): 15-25.

Torres L.G., A. Sánchez-de-la-Vega, N. Beltrán and B. Jiménez (1998) Production and characterization of a Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol and chlorophenols from wastewaters. **Process Biochemistry**. 33: (6)625-634.

Uotila J. (1993) Dehalogenase for polyhalogenated aromatic compounds in *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Mycobacterium fortuitum* CG-2. PH D Thesis. Univesrity of Helsinky, Finland.

## 6. Referencias

Vidic R.D., M.T. Suidan, G.A. Sorial y R.C. Brenner (1992) Molecular Oxygen adsorption of phenols. Effect of functional groups. In: **Industrial Wastewater Treatment Digest. Water Environmental Federation Digest Series.** WEF (ed.) USA: 307-319

Volskay V.T. y C.P. Grady (1988) Toxicity of selected RCRA compounds to activate sludge microorganisms. **Journal WPCF.** 60 (10):1850-1856.

Westmeier F. y J. Rehm (1985) Biodegradation of 4-chlorophenol by entrapped *Alcaligenes sp* A 7-2. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 22: 301-305.

Westmeier F. y J. Rehm (1987) Degradation of 4-chlorophenol in municipal wastewater by adsorptive immobilized *Alcaligenes sp* A7-2. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 26: 78-83.

Zache G. y H.J. Rehm (1989) Degradation of phenol by a coimmobilized entrapped mixed culture. **Applied Microbial and Biotechnology.** 30:426-432.

## ANEXO A

### Metabolismo bacteriano de algunos clorofenoles

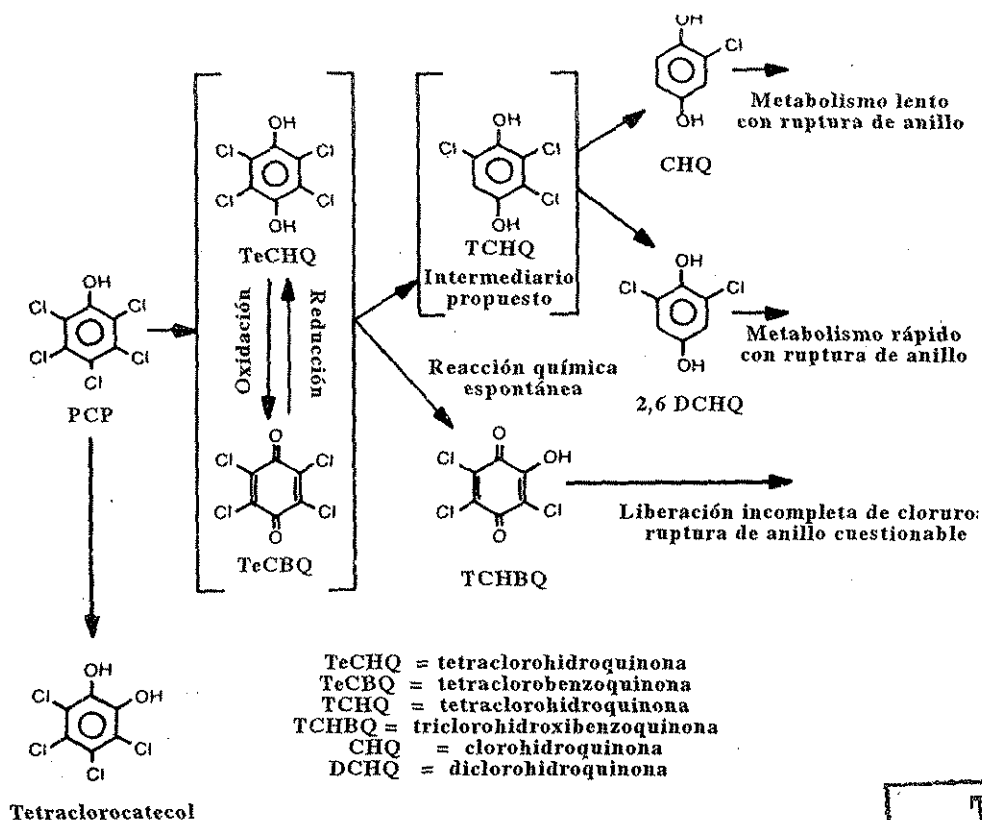
(Adaptado de Rockind-Dubinsky *et al.*, 1987)

#### A.1. Metabolismo bacteriano de los clorofenoles (excepto el pentaclorofenol)

Estudios con *Arthrobacter spp.* han confirmado que el mecanismo que emplea esta bacteria es la metilación. Se ha demostrado la conversión del 2,4,6-triclorofenol a 2,4,6-tricloroanisol. La metilación es también el mecanismo dominante en la conversión de guayacoles (o-metoxifenol) a veratroles (1,2-dimetoxibenceno) por *Arthrobacter spp.* También han sido localizadas pequeñas concentraciones de catecoles en el medio de cultivo. En la figura A.1 se muestran algunos ejemplos de este mecanismo.

Un mecanismo alternativo al antes descrito es la formación de catecoles a partir de clorofenoles. Células de *Nocardia sp.* crecidas en fenol son capaces de metabolizar 2-clorofenol a 3-clorocatecol, 3-clorofenol a 4-clorocatecol y 4-clorofenol a 4-clorocatecol. De la misma manera, células de *Pseudomonas sp. B13* o *Alcaligenes eutrophus* crecidas en fenol son capaces de metabolizar 2-clorofenol a 3-clorocatecol y 4-clorofenol a 4-clorocatecol. *Pseudomonas sp. B13* puede utilizar 4-clorofeno como única fuente de carbón y energía y con este sustrato puede cometabolizar completamente 2-clorofenol y 3-clorofenol sin acumulación de metabolitos.





TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura A.1 Metaboismo de degradación para el PCF propuesto para *Pseudomonas sp.*

Una cepa de *Arthrobacter sp.* que degrada fenilcarbamato también metaboliza 4-clorofenol a 4-clorocatecol. Mientras que la misma cantidad de enzima inicial es utilizada para el primer paso de la degradación de fenol y 4-clorofenol, las células crecidas en fenol contienen una enzima muconato-lactonante que presenta poca actividad hacia el ácido 3-cloromucónico, el metabolito del 4-clorofenol.

Suspensiones celulares de *Achromobacter sp.* metabolizan 4-clorocatecol al semialdehído 4-cloro-2-hidroximucónico y 3,5-diclorocatecol a semialdehído 3,5-dicloro-2-hidroximucónico utilizando la misma catecol 1,6-oxigenasa, que difiere de la catecol 2,3-oxigenasa más común. Ninguno de los productos son metabolizados más allá de este nivel.

*Pseudomonas putida* metaboliza 4-clorofenol a 4-clorocatecol, empleando la ruta de ruptura en posición meta de la catecol 2,3-dioxigenasa para producir semialdehído 2-hidroxi-5-

cloromucónico, el cual se acumula al 10% del sustrato inicial. El 85% del cloro inicial se recupera como cloro libre, aunque el mecanismo de liberación del cloro aún no ha sido elucidado.

Dos especies de bacterias fueron utilizadas para producir una cepa construida genéticamente con la capacidad alterada de metabolizar compuestos aromáticos. Una de ellas es *Pseudomonas sp.* B 13, que tiene la habilidad de metabolizar clorofenoles. Otra es *Alcaligenes sp.* A7, la cual degrada fenol por la opción meta y no presenta actividad hacia los clorofenoles y fue combinada para producir una mutante, la cual utiliza fenol por la opción orto y también metaboliza 2-, 3-, y 4- clorofenol así como ácido 3-clorobenzoico. Tres enzimas fueron aisladas: la pirocatecasa II y la cicloisomerasa las cuales tienen actividad para sustratos halogenados y una tercera enzima, que funciona exclusivamente con el metabolismo cloroaromático para llevar a cabo la dehalogenación-cicloisomeración de los ácidos cloromucónicos (ver figura A.2).

La cepa de *P. cepacia* AC1100 que degrada ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, puede dechlorar una amplia variedad de clorofenoles. Suspensiones celulares de esta cepa dechloran en tres horas una concentración del sustrato a concentración 0.1 mM de los siguientes clorofenoles: 2,3-, 2,4- y 2,5-diclorofenol, 2,3,4- y 2,4,5-triclorofenol, 2,3,4,6- y 2,3,5,6-tetraclorofenol y pentaclorofenol. La cepa presentó menor actividad en el caso del 2,4,6-triclorofenol y 2,3,4,5-tetraclorofenol y metabolizó muy pobremente 2,6- y 3,5-diclorofenol y 2,3,5-, 2,3,6- y 3,4,5-triclorofenol.

El mecanismo que los hongos utilizan para la degradación de los clorofenoles involucra la metilación, de manera análoga al mecanismo que emplean algunas bacterias. Un estudio sobre 116 aislados reveló que el 59% de ellos produce 2,3,4,6-tetracloroanisol a partir de 2,3,4,6-tetraclorofenol con eficiencias del 1 al 83%. Algunos hongos que presentan estas habilidades son: *Paecilomices spp.*, *Penicillium spp.* y *Scopulariopsis spp.* También algunas cepas de hongos metabolizan 2,3,4,6-tetraclorofenol sin la formación del correspondiente anisol, lo que sugiere un mecanismo alterno para el metabolismo de clorofenoles. La levadura *Rhodotorula glutinis* crecida en fenol convierte 3-clorofenol en 4-clorocatecol. Existe poca información disponible sobre el metabolismo de clorofenoles en hongos, aunque hay evidencias que indican que *Penicillium sp.* produce 2,4-diclorofenol como metabolito natural.

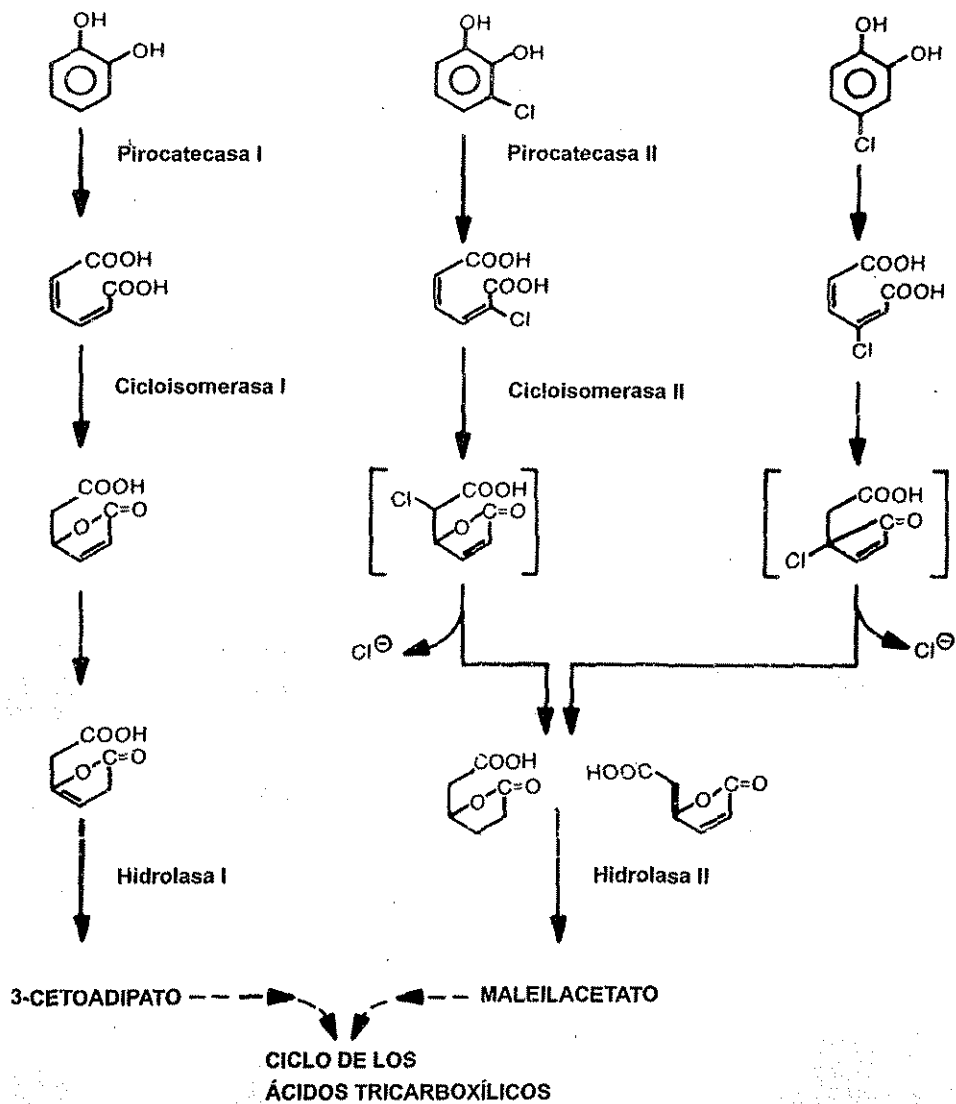
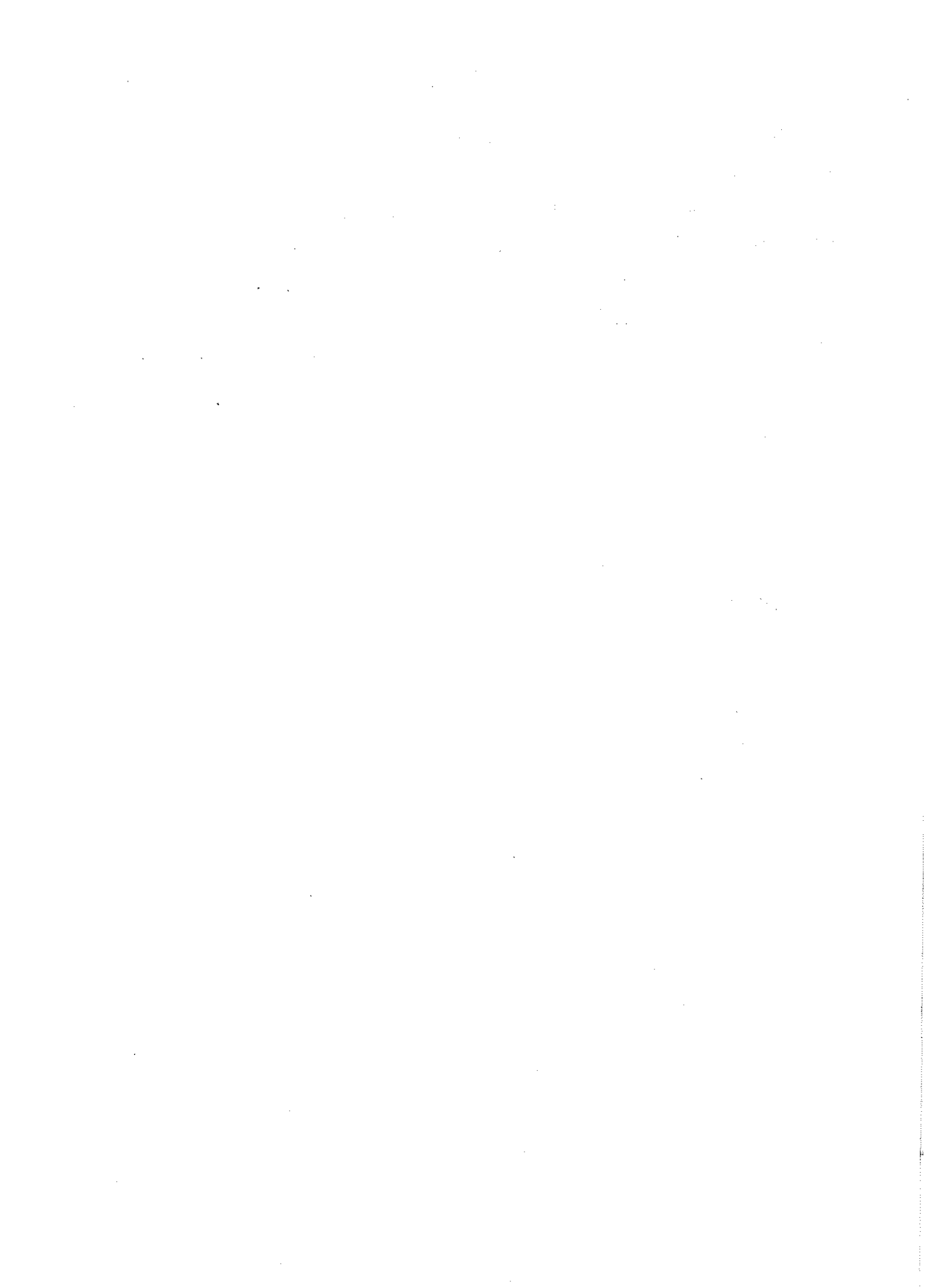


Figura A.2 Degradación de cloroaromáticos por las enzimas de *P. putida*.

## A.2 Metabolismo bacteriano del pentaclorofenol

A pesar de que el pentaclorofenol PCP se utiliza como bactericida y fungicida, se ha reportado que varios microorganismos metabolizan PCP.

Cultivos de *Pseudomonas spp.* producen tetraclorofenol y tetrahydroquinona a partir de PCP (figura A.3) que son metabolizados rápidamente después de producidos. No hay evidencia de la metilación del PCP para formar pentacloroanisol. El pentaclorofenol es metabolizado por





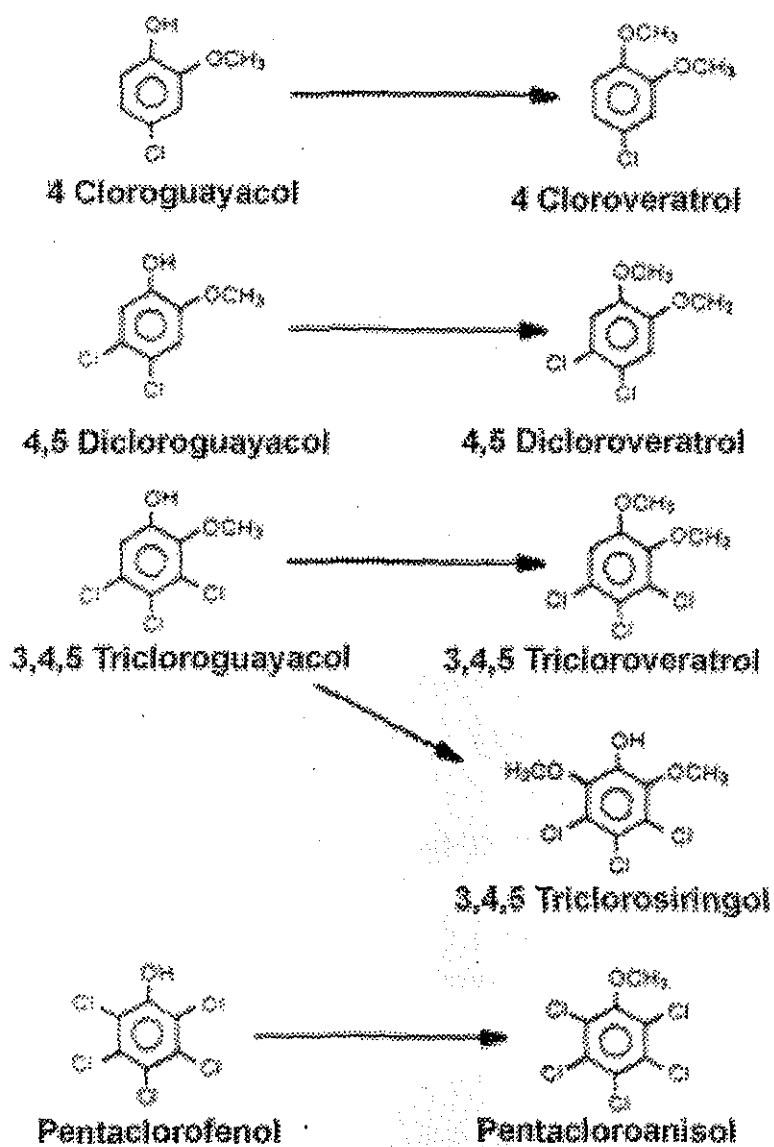


Figura A3. Metilación de clorofenoles por *Arthobacter* spp.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANEXO B

### Publicaciones internacionales basadas en el trabajo de Tesis

B.1 Production and characterization of a Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol and chlorophenols from wastewater. Luis G. Torres, Alicia Sánchez-de-la-Vega, Norma A. Beltrán and Blanca E. Jiménez. **Process Biochemistry** : 33 (4) 473-482.

B.2 Removal of chlorophenols including pentachlorophenol at high concentrations from contaminated waters. Luis G. Torres, Verónica Albíter and Blanca Jiménez. **In situ and on site Bioremediation 4 (2). PCBs and chlorinated aromatics.** 447-452.

B.3. Removal of di-, tri-, tetra-, and pentachlorophenol mixtures in a 5 L continuous aerobic packed column. Luis G. Torres, Alejandro Salinas, Blanca Jiménez and Erick R. Bandala. **First International Conference on Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds.** Pag 7-12.

B.4 Start-up and operation of an aerobic biofilter for the treatment of synthetic wastewaters containing chlorophenols and their mixtures. Luis G. Torres, A. Salinas, B.E. Jiménez and E.R. Bandala. **Waste minimization and end of pipe treatment in chemical and petrochemical industries.** IAWQ. Mérida, Yucatán. México. Noviembre 14-18 de 1999. Pags. 577-580.

B.5 Toxicity reduction of chlorophenols in an aerobic biofilter. E.R. Bandala and L.G. Torres. **Waste minimization and end of pipe treatment in chemical and petrochemical industries.** IAWQ. Mérida, Yucatán. México. Noviembre 14-18 de 1999. Pags. 371-375.

# Production and characterization of a Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol and chlorophenols from wastewaters

Luis G. Torres\*, Alicia Sánchez-de-la-Vega, Norma A. Beltrán and Blanca E. Jiménez

Instituto de Ingeniería, Coordinación de Ingeniería Ambiental, Grupo Tratamiento y Reúso, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-472, Coyoacán 04510, México D.F, México

(Received 28 August 1997; revised version received 23 January 1998; accepted 1 February 1998)

## Abstract

The production of a Ca-alginate/*Pseudomonas fluorescens* biocatalyst, for the removal of phenol, chlorophenol, dichlorophenol, and trichlorophenol from wastewaters was studied. Rheological characterization (before and after heat treatment) of the Na-alginate solution was carried out. The effect of some operational parameters of production including air pressure, alginate solution concentration, feed rate, and alginate/cells ratio, on the size and quality of the spheres was evaluated. In addition, a study of the biocatalyst including the quantity of cells entrapped into the alginate spheres, the apparent and real catalyst densities, the humidity and the  $\epsilon$  void fraction was carried out together with a kinetic characterization of the Ca-alginate spheres through a first order expression. Finally, an assessment of the catalyst in the biodegradation of phenol, mono, di-, and trichlorophenol at medium-high concentrations (1000, 500, 400 and 100 mg l<sup>-1</sup>) is presented and discussed. © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

**Keywords:** Calcium alginate, Chlorophenols, Immobilized cells, Phenol, Wastewater treatment.

## Introduction

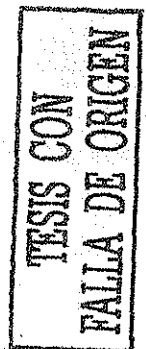
Phenol and chlorophenols are toxic compounds very often found in industrial effluents such as those generated by the pulp and paper, timber products, plastics and synthetic polymers, pharmaceutical products, pesticides, oil and petrochemistry and textile industries. Microbial enzymes are a potentially effective means of degrading pollutants, and immobilized cells have advantages over the use of freely suspended cells [1], such as the capability of re-use, and the ease with which the cells can be separated from the reaction mixture.

Other advantages include the possibility of the minimization of the diffusional restrictions on the rates of reaction, the minimization of product inhibition (especially for packed columns) and the possibility of fully continuous processes. There are many inert sup-

ports or polymeric matrices in which to immobilize cells and all present both desirable and undesirable features, in aspects such as strength, cost, affinity with the substrates, ease of handling, and the capability of entrapment/adsorption of cells [2-5]. With respect to the option of entrapping cells into a polymeric matrix, some polymers have been more frequently reported, such as k-carrageenin, DEAE, polyhydric acid, alginate, agar, and bone char [1].

The aim of this work is to provide information concerning the production of a Ca-alginate/*Pseudomonas fluorescens* biocatalyst for the removal of phenol, chlorophenol, dichlorophenol, and trichlorophenol from wastewaters. Tests such as the rheological characterization of the Na-alginate solutions (before and after heat treatment) were carried out. The effect of some of the production operational parameters (i.e. air pressure, alginate solution concentration, feed rate, and alginate/cells ratio, among others) on the size and quality of the spheres was also evaluated. In addition, a

\*Corresponding author. E-mail: ltb@pumas.iingen.unam.mx





characterization comprising the quantity of cells (as  $\text{FCU } g_{\text{support}}^{-1}$ ) entrapped into the alginate spheres, the apparent and real catalyst densities, the humidity, and the void fraction of the biocatalyst was developed. Finally, a kinetic characterization of the Ca-alginate spheres through a first order expression, as well as the assessment of the catalyst in the biodegradation of phenol (Ph), mono (2CPh), di- (2,4DCPh), and trichlorophenol (2,4,6TCPh) at high concentrations (1000, 500, 400 and  $100 \text{ mg l}^{-1}$ ) is presented and discussed.

## Materials and methods

### Strain, cultural conditions and harvesting procedure

A *Pseudomonas fluorescens* strain obtained from sea sediments was employed in this work. This strain showed interesting capabilities in the degradation of chloro-, nitro-, and methylphenols, as well as phenyl acetic and 2,4 dichlorophenoxyacetic acids [6]. Details concerning the general characteristics, cultural conditions, and biodegradation capabilities of the bacteria have been discussed previously [6]. Cells were harvested after growing in YPG medium (yeast extract, peptone of caseine and glucose), using a mini-centrifuge (Eppendorf 5415C, USA) at 11000 rpm (9880 relative centrifugal force RCF) for 20 min. The cells were rinsed with phosphate buffer (pH 7) and centrifuged again.

### Na-alginate solutions preparation and characterization

Alginate solutions (Burmester Pharmatrade, Hamburg, Germany) were prepared in concentrations between 0.5 and 4%. Alginate powder was added to deionized water and mixed thoroughly (700 rpm) until the suspension became homogeneous. Some of the suspensions contained 0.067% *Pseudomonas fluorescens* with different proportions of Na-alginate. Some suspensions were characterized before and after a heat treatment (consisting of 10 min at  $100^\circ\text{C}$  in an autoclave) by means of a Brookfield DV-1 viscometer (spindles 1 and 4). The rheological indices  $K$  and  $n$  were statistically evaluated from the Brookfield raw data according to the procedure detailed by Hannote *et al.* [7].

### Biocatalyst production

The production of the Ca-alginate spheres and the Ca-alginate/cell spheres was as follows: a solution or mixture was extruded through a needle placed into a concentric cylinder, fed with filter air (at different pressures) in order to control the particle diameter (see Fig. 1). The drops extruded were received in a flask containing 0.1 M calcium chloride solution and cured for 1 h. The parameters controlled during the process were the air pressure (in  $\text{kg cm}^{-2}$ ), the alginate feed

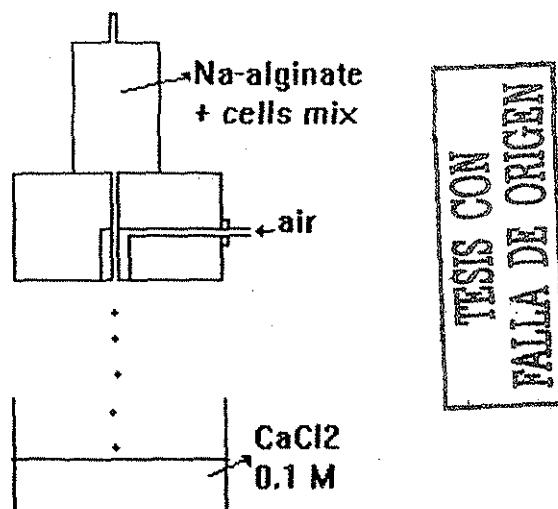


Fig. 1. System for the production of Ca-alginate spheres.

rate (in  $\text{ml min}^{-1}$ ), and the height between the end of the pipe and the surface of the calcium chloride solution (in cm).

The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  consumed in the alginate gelation process (with and without cells entrapped), was determined by means of the measurement of the initial and final Ca concentration in the gelation process according to Standard Methods [8]. In addition, the  $g_{\text{spheres}} g_{\text{alginate}}^{-1}$  and  $g_{\text{spheres}} g_{\text{alginate solution}}^{-1}$  yields were calculated owing to their importance in the economics of biocatalyst production.

### Physical and kinetic characterization of the biocatalyst

The size distribution of the spheres produced was evaluated in two ways. 30–50 spheres were manually measured by means of a vernier, the measurements were averaged and the standard deviation calculated. As an alternative, the spheres were sieved through a sequence of stainless steel meshes (10, 12, 16, 18, 20 and 30, corresponding to 1.68, 1.41, 1.13, 0.96, 0.8, and 0.59 mm, respectively). No significant differences were found between the results of the two methods, and the most frequent diameter is reported, unless otherwise indicated. The sphericity of the biocatalyst was evaluated by measuring the major and minor diameters of the particles (i.e.  $D_A$  and  $D_B$ ) in order to determine  $\text{sphericity} = D_A D_B^{-1}$ . The apparent density was evaluated by putting a number of spheres in a 50 ml glass cylinder, and the real density by a water displacement method (using diluted Dapaah medium). Humidity was evaluated in duplicate using a thermobalance (Ohaus, USA). The void fraction was evaluated using the method reported by Buchholz [9], consisting of dehydration of the biocatalyst until the critical humidity (from a humidity versus water loss rate plot, the point between b and c zones, Fig. 4) followed by a reconsti-

tution of the particle in a 0.1 M calcium chloride solution.

The colony forming units per gram of support, CFU  $g_{\text{support}}^{-1}$  were measured as detailed in Torres *et al.* [6]. A quantity of spheres was weighted, mashed and dissolved in a  $2 g l^{-1}$  EDTA, and  $20 g l^{-1}$  NaCl solution. When the catalyst was completely dissolved, the solution was diluted and the procedure was continued.

10 g of biocatalyst (previously put on a paper in order to avoid excessive water) were placed in a 500 ml Erlenmeyer flasks, with 150 ml of Dapaah medium [10] diluted 1/10, along with the corresponding concentration of 2CPh, 2,4DCPh or 2,4,6TCPPh. The flasks were agitated at 200 rpm, with temperature controlled at 35°C. The flasks were aerated by means of an air pump with air flow of  $1.9 \pm 0.72 l \text{ min}^{-1}$ . Runs without aeration were done in order to avoid the effect of the desorption process. Samples (100  $\mu$ l) were taken every 15 min for 2 h, and every 30 min during the next 2 h. The samples were analysed for specific phenols according to the Standard Methods [8], using a calibration curve for each chlorophenol. Data were fitted to an expression in the form:

$$C = C_0 \exp(-kt) \quad (1)$$

where  $C$  and  $C_0$  are the phenol concentrations (in  $mg l^{-1}$ ) at any given time and zero time,  $k$  is the kinetic parameter (in  $h^{-1}$ ) and  $t$  the process time (hours).  $r$  is the correlation factor which indicates the suitability of the fitting process.

#### Assessment of biodegradation capability

A 0.027 ml glass column, similar to that used in a previous work [5] was employed in order to assess the biodegradation capability of the biocatalyst. Approximately 22.5 g of biocatalyst was placed in the column. Temperature was fixed by means of water recirculation through the external jacket. All experiments were carried out as batch processes. 100 ml of each chlorophenol in Dapaah diluted medium were circulated through the column for a time which was long enough to achieve a chlorophenol removal value of around 95%, which was measured using the 4-aminoantipirine method [8]. For other details see Ref. [5].

## Results and discussion

### Alginate solutions and mixtures characterization

Raw data from the Brookfield viscometer measurements were processed as detailed by Hannote *et al.* [7] in order to calculate statistically the flow index,  $n$ , and the consistency index,  $K$ , from the power law:

$$\mu = K\gamma^{n-1} \quad (2)$$

where  $\mu$  is the apparent viscosity in mPa,  $K$  is the consistency index in  $N s^n m^{-2}$ ,  $\gamma$  is the shear rate in  $s^{-1}$ , and  $n$  is the index flow (dimensionless) The values of  $n$  and  $K$ , as well as the correlation coefficients ( $r$ ) for the different Na-alginate solutions before and after heat treatment (without cells) are shown at Table 1. For repeatability purposes, the number of the spindle used is reported in the same table.

In the case of the solutions before heat treatment, all the fluids showed a pseudoplastic or rheofluidizing behaviour ( $n < 1$ ) in the range of 0.67–0.95  $n$  values. With respect to the consistency index,  $K$ , there exists a clear relationship between the Na-alginate concentration and the  $K$  value (which had values between 0.04 and  $16.9 N s^n m^{-2}$ ). It is worth noting that  $r$  values were always greater or equal to 0.94, which confirms the suitability of the power law equation in modelling the experimental data. In terms of viscosities, the solutions had values from 31 to 13619 cp (since it is a non-Newtonian fluid, an apparent viscosity can be defined for every shear rate value, in this case for a shear rate of 30 rpm).

After heat treatment, the solutions undergo important changes. The sterilization process caused a drastic decrease in the solution's viscosity [1]. The Na-alginate solutions were in general more pseudoplastic ( $0.73 \leq n \leq 0.9$ ) and less viscous. The consistency indexes were in the range  $0.02$ – $2.75 N s^n m^{-2}$  (the higher the polymer concentration, the higher the  $K$  value) and the viscosities between 12 and 1724 cp (for a shear rate of 30 rpm). This means a reduction between 50 and 600%. Again, the  $r$  values were quite high (0.94–0.99), indicative of a good applicability of the power law.

This reduction in viscosity due to the sterilization

Table 1. Rheological characterization of the Na-alginate solutions without cells, before and after heat treatment

Na-alginate (%)	Before heat treatment					After heat treatment				
	Spindle number	$n$ (-)	$K$ ( $N s^n m^{-2}$ )	$\mu$ (cp)	$r$ (-)	Spindle number	$n$ (-)	$K$ ( $N s^n m^{-2}$ )	$\mu$ (cp)	$r$ (-)
4	4	0.88	16.99	13619	0.99	4	0.77	2.75	1724	0.97
3	4	0.86	6.65	5131	0.99	4	0.73	1.15	644	0.94
2	4	0.67	1.31	633	0.94	1	0.90	0.26	149.7	0.99
1	1	0.95	0.19	175.3	0.99	1	0.84	0.06	49.0	0.99
0.5	1	0.83	0.04	31.7	0.98	1	0.75	0.02	12.2	0.97

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

process could be beneficial to process economy, since lower viscosities mean lower pump sizes and the avoidance of some tubing and fitting problems if, and only if no gelling problems (i.e. weak gels, long gelation times) are encountered.

0.067% *Pseudomonas fluorescens* solutions were mixed with 1–4% Na-alginate, and the rheological characteristics were evaluated. The alginate/cells ratio varied between 15 and 60 (Table 2). These solutions showed pseudoplastic behaviour ( $0.7 \leq n \leq 0.96$ ), but had different values when compared with solutions with an equal polymer concentration (lower  $n$  values as a general rule). The  $K$  values were always higher for the mixtures in comparison with those found for the Na-alginate solutions, but the more relevant differences were for the 2 and 3% alginate solutions. The  $r$  values were excellent (0.97–0.99), better than those reported for the solutions at equal Na-alginate concentrations.

A rheogram shear rate–viscosity for the alginate/cells mixtures is shown in Fig. 2 in which solid lines correspond to the power law equation. As shown, good

agreement between data and the theoretical expression was found. The viscosities of the alginate/cells mixtures with ratios 60 and 45 were quite similar (specially at low shear rates), not significantly different in statistical terms, while the viscosities for the mixtures with ratios 30 and 15 were clearly different.

#### Production of the biocatalyst

Different biocatalyst batches were produced using different operational parameters: air pressures, alginate concentrations, feed rates and height from the curing solution surface to the end of the tube where the spherical alginate particles were extruded. Different size distributions were obtained when the operational parameters were controlled at different values. As an example, in Fig. 3 the percentage of material retained in every mesh (from 0.42 to 2.38 mm) for alginate concentrations of 1–4% are displayed. For every polymer concentration, a typical size distribution was observed, i.e. the more frequent sizes were 1.41, 1.13, 0.96, and 0.59 mm for the 4, 3, 2, and 1% of Na-alginate. These

Table 2. Rheological characterization of Na-alginate/*Pseudomonas fluorescens* mixtures

Na-alginate (%)	Spindle number	Alginate/cells ratio	$n$ (-)	$K$ ( $N s^a m^{-2}$ )	$r$ (-)
4	4	60	0.84	18.22	0.99
3	4	45	0.76	17.00	0.99
2	4	30	0.70	4.02	0.97
1	1	15	0.96	0.34	0.99

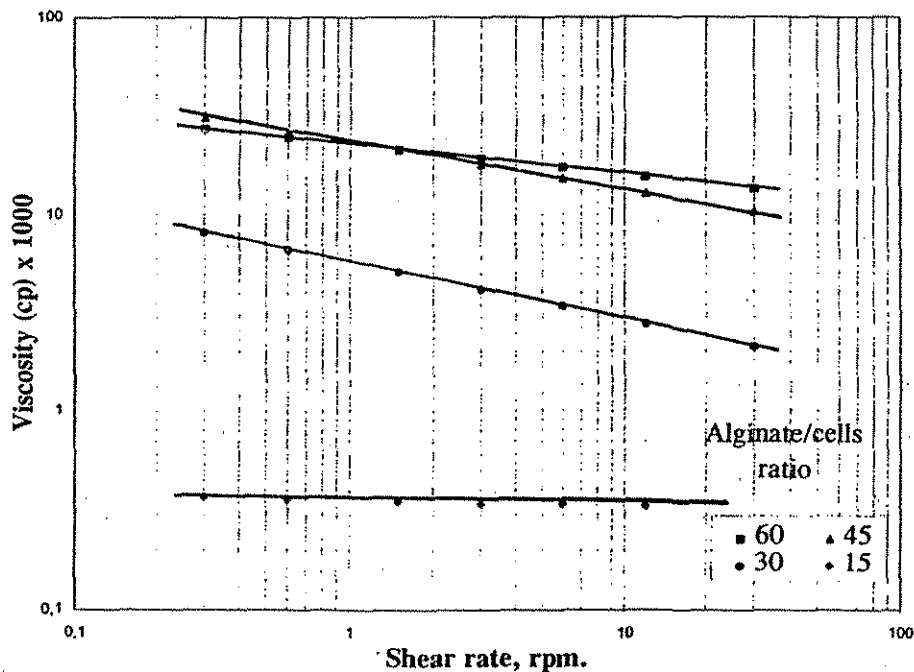


Fig. 2. Shear rate vs. viscosity rheogram for different alginate/cells ratios.

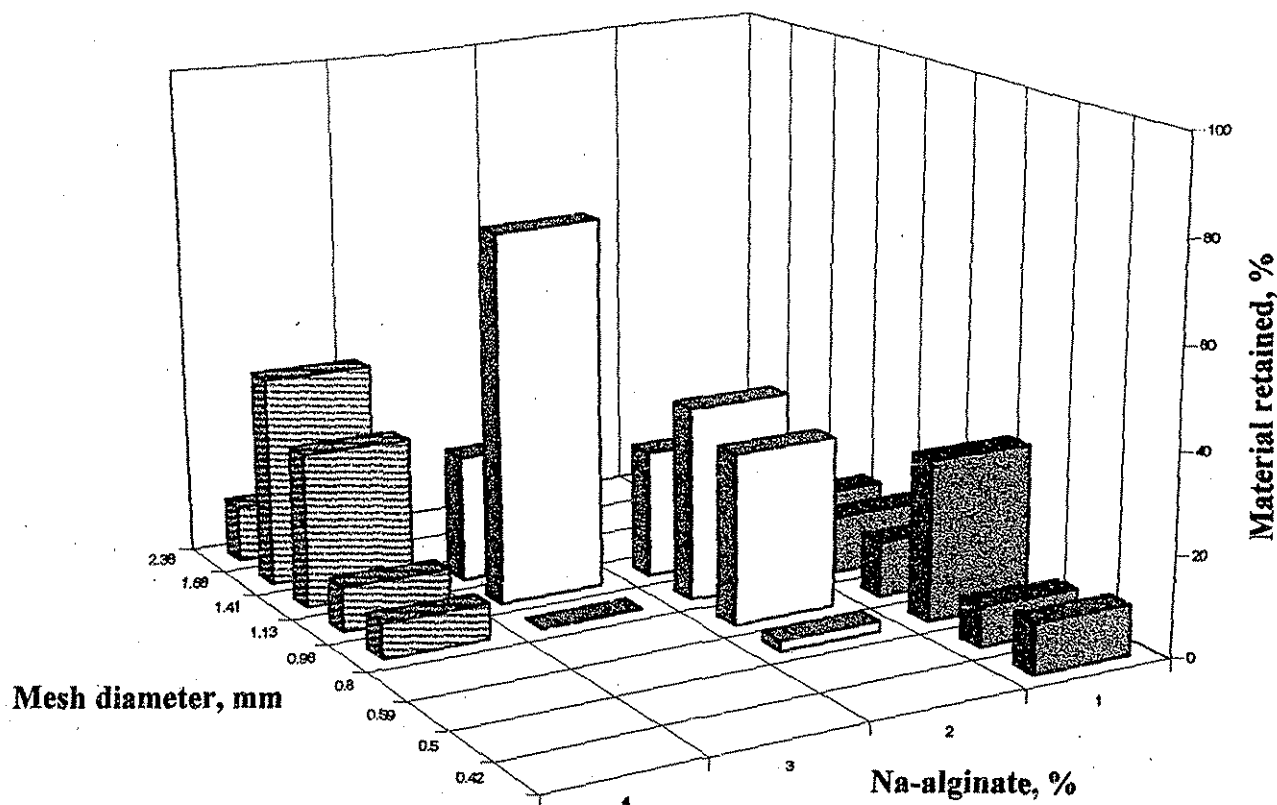


Fig. 3. Size distribution of the catalyst produced under different conditions.

tests were developed at a fixed air pressure ( $3 \text{ kg cm}^{-2}$ ). The results using the vernier were very similar (data not shown).

If the particles with diameter around 1.5 mm are the goal (in order to minimize mass transfer problems), the best alginate concentration to use was 3%, since 74% of the material showed a diameter around 1.13 mm, 2.54% a diameter of 1.41 mm, and only 1% a diameter of 0.96 mm.

In the case of the different air pressures assessed (for a 3% alginate solution), the most frequent diameters for the 0, 1, 2, and  $3 \text{ kg cm}^{-2}$  were 3.35, 2.38, 1.41, 1, and 1.13 mm (with abundances of 98.5, 86.5, 86.8, and 74.5%, respectively), as shown on Table 3.

The feed rate did not influence the most frequent diameter of the particles. Feed rates from  $1.1$  to  $325 \text{ ml min}^{-1}$  always gave an average diameter of 1.13 mm (when a 3% alginate solution was fed with an air pressure of  $3 \text{ kg cm}^{-2}$ ).

Finally, the height from the  $\text{CaCl}_2$  surface to the end of the pipe where the alginate drops are produced did not affect the size distribution itself, although it did affect the sphericity of the particles. The best catalyst was produced at a height of 80 cm (perfect polymer spheres with sphericity value of around 1.0). In the case of the lower heights, elongated biocatalysts were obtained (sphericity values of 2.61 and 1.74).

In conclusion, the best operational conditions were

Table 3. Production of Na-alginate spheres

Air pressure ( $\text{kg cm}^{-2}$ )	Diameter (mm)	Alginate conc. (%)	Diameter (mm)	Feed rate ( $\text{ml min}^{-1}$ )	Diameter (mm)	Height (m)	Sphericity $D_s/D_B$ (-)
0	3.35	1	0.59	1.1	1.13	20	$2.61 \pm 0.71$
1	2.38	2	0.96	30	1.13	40	$1.74 \pm 0.67$
2	1.41	3	1.13	150	1.13	80	$1.0 \pm 0.00$
3	1.13	4	1.41	325	1.13	-	-

an air pressure of  $3 \text{ kg cm}^{-2}$ , an alginate concentration of 3%, a feed rate as high as possible ( $325 \text{ ml min}^{-1}$  or more), and a height of 80 cm approximately.

#### Biocatalyst physical characterization

The real densities of the biocatalyst produced with different alginate/cells ratios were  $1.0066 \text{ g ml}^{-1} \pm 0.136\%$ . The apparent densities ranged between  $0.5673$  and  $0.9542 \text{ g ml}^{-1}$ , as an effect of the different cell concentrations and in part because of the particle size distributions.

The different alginate/cell ratios gave obviously different CFU  $\text{g}_{\text{support}}^{-1}$  values (data not shown), but some of the combinations resulted in very weak gels. On the basis of a very gross observation, a fairly good alginate/cell ratio is  $2.54/18.8$ , giving a cell load of about  $3.85 \times 10^{14} \text{ CFU g}_{\text{support}}^{-1}$ , which is reasonable when compared with other polymer catalysts.

Some tests were developed in order to determine the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  required for the gelation process. The alginate concentration was obviously a factor in determining the Ca requirements, but the  $\text{mg Ca}^{2+} \text{ mg alginate}^{-1}$  ratio was different for different alginate concentrations. When no cells were present, for alginate concentrations of 0.5, 1, 2, and 3% the ratios were 2.07, 1.079, 0.835, and 0.78, i.e. the higher the alginate concentration, the lower the  $\text{mg Ca}^{2+} \text{ mg alginate}^{-1}$  ratio. When different cell concentrations were added, the  $\text{mg Ca}^{2+} \text{ mg alginate}^{-1}$  ratios were slightly higher (data not shown). These facts are related to the diffusion of the  $\text{Ca}^{2+}$  ions into the Ca-alginate and Ca-alginate/cells catalysts.

Finally, a typical 3% alginate production batch gave yields of  $22.7 \text{ g}_{\text{spheres}} \text{ g}_{\text{alginate}}^{-1}$  and  $566 \text{ g}_{\text{spheres}} \text{ l}_{\text{alginate solution}}^{-1}$ , which are important figures for the calculation of the unit costs of the process.

#### Void fraction and humidity of the catalyst

The void fraction is an important parameter in biocatalyst packed column design, since it affects the pressure drop and the residence time. For example, the residence time for a continuously operated packed column will be

$$\Theta = V\varepsilon Q^{-1} \quad (3)$$

where  $\Theta$  is the residence time (in hours),  $\varepsilon$  is the void fraction (dimensionless),  $V$  is the column active volume (in litres), and  $Q$  the feed rate (in  $\text{l h}^{-1}$ ).

In order to estimate  $\varepsilon$ , it is necessary to know the critical humidity, as a measurement of the free water in the gel hydration. The drying curve for a 3% alginate biocatalyst (1.13 mm of diameter) is displayed in Fig. 4. The total humidity was plotted against the  $dH/dt$  rate (the total humidity loss in respect to the elapsed time). The curve is represented by three sections: a, where a high evaporation rate occurs, b, where an equilibrium between the heat transfer rate and the mass transfer rate occurs, and c, where drying rate drastically diminishes. When the catalyst reaches the critical humidity (the point between b and c, see Fig. 4), it is dehydrated in  $\text{CaCl}_2$  0.1 M solution. By volume difference, the void fraction is calculated, since  $\varepsilon$  is the relationship between the intraparticle and interparticle volumes over the total volume.

The void fractions and humidities for catalysts prepared under different conditions are shown in Table 4. First, the effect of the alginate concentration was tested (for spheres with 1.13 mm of diameter). An average  $\varepsilon$  value of  $0.6842 \pm 1.3\%$  was found as well as humidity values between 92 and 96% for the 3–1 alginate concentrations (the spheres with 4% alginate were not evaluated).

When a 3% alginate solution was used, and spheres with diameters between 1.13 and 3.35 mm were pro-

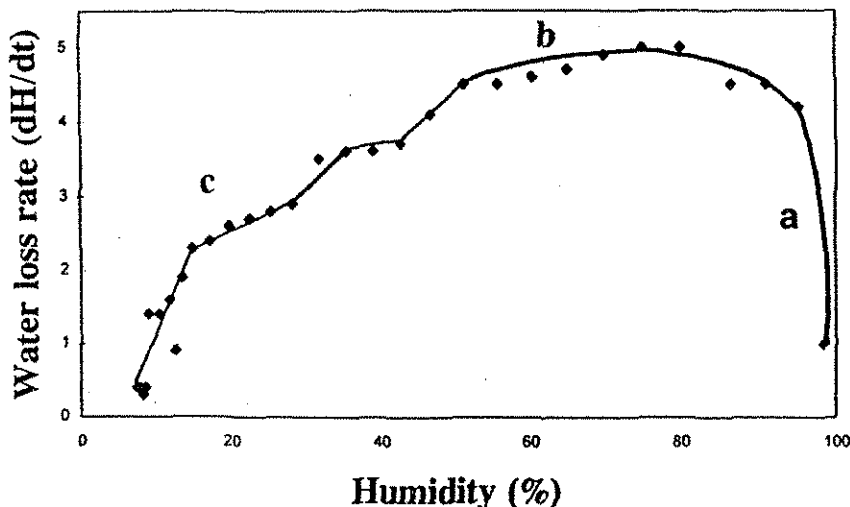


Fig. 4. Drying curve for the 3% alginate, 1.13 m diameter biocatalyst.

Table 4. Effect of some parameters over the void fraction and humidity for alginate spheres

Diameter = 1.13 mm			Ca-alginate 3%			Diameter = 1.13 mm		
Na-alginate (%)	$\epsilon$ (-)	Humidity (%)	Diameter (mm)	$\epsilon$ (-)	Humidity (%)	Alginate/cells ratio	$\epsilon$ (-)	Humidity (%)
4	ND	92.0	3.35	0.6875	93.0	60	0.5833	83.0
3	0.6862	93.0	2.38	0.6938	93.0	45	0.5777	84.5
2	0.6734	95.0	1.41	0.6346	93.0	30	0.6354	85.5
1	0.6930	96.0	1.13	0.6862	93.0	15	0.6428	87.0

ND, not determined.

duced, the void fraction value varied between 0.634 and 0.694 (maximum differences around 10%). The humidity in all cases was around 93%.

Finally, spheres with diameter 1.13 mm and alginate/cells ratios between 15 and 60 were produced and characterized. The void fractions values ranged from 0.578 and 0.643 with humidities between 83 and 87%. This seems to be the more remarkable effect observed and practical applications need to be taken into account.

#### Kinetic characterization

Table 5 shows the kinetic constants for 2CPh, 2,4DCPh and 2,4,6TCPh biodegradation tests. The parameters reported are  $C_0$ ,  $k$ , and the correlation coefficient ( $r$ ). As a general trend, it is noteworthy that for the experiments with initial concentrations 25–1000 mg l<sup>-1</sup>, the values of  $C_0$  were similar to the real initial concentrations, as measured with the 4-aminoantipirine method. The worst cases were those of the 2,4,6TCPh assessments. Secondly, no very clear relationships were found between chlorophenol initial concentration and the  $k$  value. In the case of the 2CPh, it varied between 0.0724 and 0.326. For the 2,4DCPh and 2,4,6TCPh tests, the ranges were 0.129–0.236 and 0.048–0.1583, respectively. It is important to observe that the experi-

ments with 2,4,6TCPh were carried out with initial concentrations up to 300 mg l<sup>-1</sup> only.

The trend of the  $k$  values was not clear. If the  $k$  values are compared at the same initial concentrations for the three different compounds, it can be observed that for the lowest concentration, the higher value of  $k$  corresponded to the 2,4,6TCPh, followed by 2,4DCPh and finally 2CPh. This trend was not the same for other concentrations. In the case of the 50, 100 and 1000 mg l<sup>-1</sup> the best value of  $k$  was for 2,4DCPh, while for 70, 300, 500 and 700 mg l<sup>-1</sup> the best  $k$  values were for 2CPh.

Another interesting value is  $t_{1/2}$ , reported in Table 5 for the different phenolic compounds and concentrations. This parameter means the time required in order to produce 50% of the initial toxic concentration as defined by the equation:

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (4)$$

As can be seen, at some concentrations anomalous values were obtained, maybe as a result of the fitting process. The  $t_{1/2}$  values for 2CPh were 9.57, 6.93, 2.85, 7.13 (too high), 3.25, 3.28, and 3.07 h. For the 2,4DCPh the half-lives were as high as 4.88, 4.64, 5.37 (too high), 4.52, 3.53, 3.53, and 2.76. Finally, for the 2,4,6TCPh the values were as follows: 4.37, 14.4, 5.45, 7.24, and 7.60 h.

It is important to mention that  $r$  values were high

Table 5. Kinetic constants for the 2CPh, 2,4DCPh, and 2,4,6TCPh degradation with the biocatalyst

Phenolic	Parameter	Concentration (mg l <sup>-1</sup> )							
		25	50	70	100	300	500	700	1000
2CPh	$C_0$ (mg l <sup>-1</sup> )	23.83	50.30	62.83	92.02	287.78	462.31	760.14	1004.7
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	0.0724	0.0999	0.2424	0.0972	0.2132	0.2140	0.3257	0.2256
	$t_{1/2}$ (h)	9.57	6.93	2.85	7.13	3.25	3.28	2.12	3.07
	$r$ (-)	0.89	0.89	0.98	0.89	0.99	0.98	0.98	0.99
2,4DCPh	$C_0$ (mg l <sup>-1</sup> )	20.73	51.96	65.97	79.04	314.16	530.19	602.43	979.08
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	0.142	0.1492	0.129	0.1533	0.1961	0.1963	0.2365	0.2512
	$t_{1/2}$ (h)	4.88	4.64	5.37	4.52	3.53	3.53	2.93	2.76
	$r$ (-)	0.91	0.98	0.95	0.9	0.97	0.98	0.98	0.99
2,4,6TCPh	$C_0$ (mg l <sup>-1</sup> )	12.5	43.55	68.56	60.18	287.27	ND	ND	ND
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	4.37	14.4	5.45	7.24	7.60	ND	ND	ND
	$t_{1/2}$ (h)	8.76	28.76	10.9	14.48	15.2	ND	ND	ND
	$r$ (-)	0.62	0.51	0.91	0.51	0.89	ND	ND	ND

ND, not determined.

enough for the 2CPh and 2,4DCPh experiments (between 0.89 and 0.99), but not for all the 2,4,6TCPPh experiments (0.51–0.91). This means that 2,4,6TCPPh degradation with this biocatalyst was not well modelled by a first-order expression, like the one mentioned earlier. The specific biodegradation rate (BDR), in contrast, did not follow a clear trend. The values for Ph and 2,4,6TCPPh were similar, while the values for the mono and dichlorophenol are also close.

#### Biodegradation assessment

The biodegradation assessment of the biocatalyst was carried out with the spheres packed into the 0.027 l glass column as previously described. The biodegradation curves for the Ph, 2CPh, 2,4DCPh and 2,4,6TCPPh are shown as a function of time in Fig. 5. The solid lines represents eqn (1). In Table 6, the main characteristics of the tests and the main results are displayed. For the experiment with 1000 mg l<sup>-1</sup> of Ph, the operation time was 120 h, sufficient to reach a 98% removal value, while for the 2CPh (500 mg l<sup>-1</sup>), 2,4DCPh (400 mg l<sup>-1</sup>), and 2,4,6TCPPh (100 mg l<sup>-1</sup>) the opera-

tion times and removal values were 109, 160.5, and 210 h, and 95, 98 and 97%, respectively.

These operation times and compound degradation, in combination with the removal efficiencies, give different BDR and specific BDR, if the average CFU  $\mu_{\text{support}}^{-1}$  (average of the initial and final conditions) is taken into account. It is noteworthy that BDR ranged from around 38 to 670 mg l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, for the tri<di<mono<phenol tests, which is congruent with their toxicities of 1.9, 2.0, 18.0, and 18.0 mg l<sup>-1</sup>, as EC50 measured by means of the Microtox system [11].

Dapaah and Hill [10] assessed the biodegradation of a mixture of phenol and 4-chlorophenol with *Pseudomonas putida* free cells. They reached BDR as high as 64 mg l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for 500 mg l<sup>-1</sup> of phenol and 13 mg l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for 100 mg l<sup>-1</sup> of 4-chlorophenol. Westmeier and Rehm [2] employed *Alcaligenes sp.* entrapped in Ca-alginate spheres for the degradation of 4-chlorophenol. They reported activities in the range of 269–514 mg l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for 0.25–0.5 mg l<sup>-1</sup> of chlorophenol.

Lee et al. [3] studied the use of a mixture of six identified microorganisms immobilized in Ca-alginate

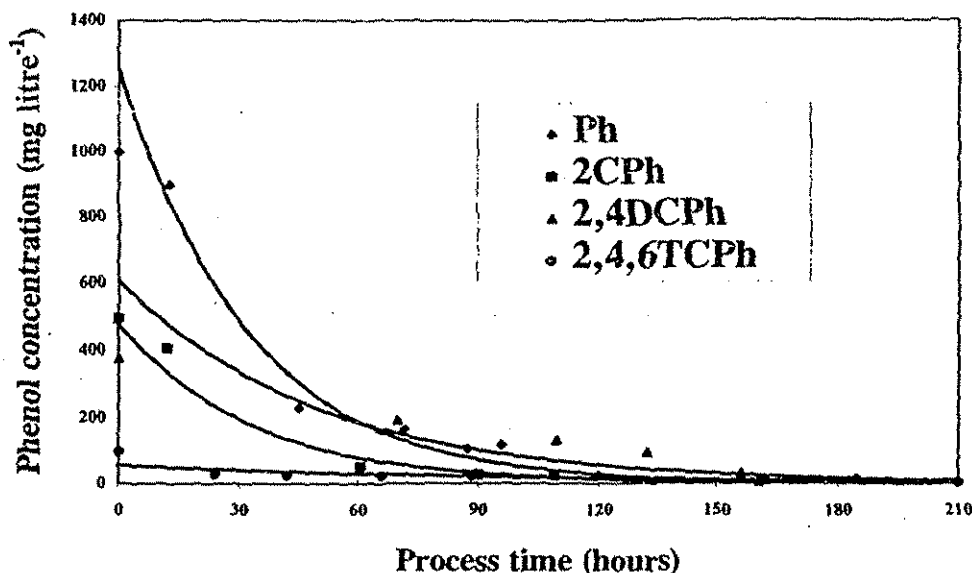


Fig. 5. Biodegradation curves for Ph, 2CPh, 2,4DCPh and 2,4,6 TCPPh with the Ca-alginate/*P. fluorescens* biocatalyst.

Table 6. Results of the packed column biodegradation tests

Compound	Concentration (mg l <sup>-1</sup> )	CFU $\mu_{\text{support}}^{-1}$	Operation time (h)	Removal (%)	BDR (mg l <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	Specific BDR (mg CFU <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> ) ( $\times 10^{-10}$ )
Ph	1000	$1.41 \times 10^8$	120	98.0	669.2	58.4
2CPh	500	$1.4 \times 10^9$	109	95.0	354.9	3.31
2,4DCPh	400	$6.9 \times 10^6$	160.5	98.0	190.7	3.86
2,4,6TCPPh	100	$9.6 \times 10^6$	210	97.0	37.9	55.3

for the biodegradation of phenol, 2-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol. They observed activities of  $181\text{--}1000\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$  for  $200\text{--}500\text{ mg l}^{-1}$  of phenol,  $10\text{--}12.96\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$  for  $10\text{--}35\text{ mg l}^{-1}$  2-chlorophenol, and  $40\text{--}80\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$  for  $20\text{--}40\text{ mg l}^{-1}$  of 2,4-dichlorophenol.

Shwu-Ling *et al.* [4] immobilized *Rhodococcus sp.* on granular activated carbon and in calcium alginate for the continuous degradation of phenol. They assessed the system in the treatment of  $500\text{--}1500\text{ mg l}^{-1}$ . They found that the activated carbon system reached BDR as high as  $2910\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$ , while under the same conditions the Ca-alginate system presented a BDR of  $2100\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$ . It is worth noting that their system took 10 days before the effluent concentration was lower than the influent concentration (acclimation period).

### Conclusions

Many aspects, not very often considered when characterizing the production of a natural-polymer biocatalyst, have been described here. The rheological characterization of the Na-alginate mixtures before and after heat treatment, showed that the material suffers drastic changes due to the re-organization of the long alginate molecules. The rheological behaviour of the mixture is complex, since it is the product of the alginate-alginate and the cells-alginate interactions. This fact is in accord with the compromise existing between biocatalyst strength and biocatalyst efficiency.

Among the different parameter evaluated in the production of the Ca-alginate spheres, the air pressure fed together with the alginate solution in order to obtain the right size distribution profile was the most remarkable one. For a given Na-alginate concentration, the air pressure required in order to obtain a mean diameter around  $1.0\text{ mm}$ , was  $3.0\text{ kg cm}^{-2}$ . Fortunately, the feed rate was not dependent on the size distribution or the sphericity of the biocatalysts.

The parameter which affected the value of the void fraction more markedly was the alginate/cells ratio. This fact has not been published before and has a crucial importance regarding the biocatalyst design and operation.

The BDR and specific BDR values obtained with the Ca-alginate biocatalysts, when degrading phenol, 2CPh, 2,4DCPh and 2,4,6TCPPh were sufficient high when compared with those published for other similar biocatalysts. Typical values of  $37.9\text{--}669.2\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$  for 2,4,6TCPPh and Ph were obtained. Regarding to the specific BDR values, a range of  $3.31\text{--}58.4 \times 10^{-10}$  [10]  $\text{mg CFU}^{-1}\text{ day}^{-1}$ , were reached. The removal efficiencies reported were between 95 and 98%, for toxic concentrations of  $100\text{--}1000\text{ mg l}^{-1}$ .

Finally a kinetic characterization of the degradation of chlorophenols, showed that the expression  $C = C_0 \exp(-kt)$  represents the biodegradation profiles

fairly in the case of the mono, and dichlorophenols, but not very fairly for the trichlorophenol experiences.

Further studies on the use of a 54 ml glass column packed with Ca-alginate/*P. fluorescens*-cells biocatalyst are in progress. The effect of parameters such as spheres size, cells load, pH and dissolved oxygen concentration over the BDR and specific BDR, are the subject of study.

### Acknowledgements

This work was financially supported by DGAPA/UNAM (Grant IN503895). The English style revision is acknowledge with tanks to Manuel de la Torre. The authors thank Maricarmen Quirazco and Fany Iturbe (Facultad de Química/UNAM) for their help in the development of certain techniques, and for the permission to use a thermobalance, respectively. To I. Monje due to his useful comments regarding the manuscript. N. Beltrán thanks to CONACyT, México, for a Master Degree scholarship.

### References

1. Cheetham P. S. J. and Bucke C., Immobilization of microbial cells and their use in wastewater treatment. In: J. M. Grainger and J. M. Lynch (Eds.), *Microbial Methods for Environmental Biotechnology*. Society for Applied Bacteriology, Technical Series 19. Academic Press, New York, 1984.
2. Westmeier, F. and Rehm, J., Biodegradation of 4-chlorophenol by entrapped *Alcaligenes sp.* A 7-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1985, 22, 301-305.
3. Lee, C. M., Lu, C. J. and Chuang, M. S., Effects of immobilized cells on the biodegradation of chlorinated phenols. *Water Science and Technology* 1994, 30(9), 87-90.
4. Shwu-Ling, P., Yu-Lan, H., Nyuk-Min, Ch., Ching-Sen, S. and Cheishiang, Ch., Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus sp.* immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. *Bioresource Technology* 1995, 51, 37-42.
5. Torres, L. G., Albiter, V. and Jiménez, B., Removal of chlorophenols including pentachlorophenol at high concentrations from contaminated waters. In: *Proceedings of the in situ and on-site Bioremediation Symposium*, Battle, New Orleans, LA, April-May 1997, pp. 447-452.
6. Torres, L. G., Bandala, E., Albiter, V., Cabello, M., Sánchez-de-la-Vega, A. and Jiménez, B., Biodegradation of some chloro-, nitro-, and methylphenols by *Pseudomonas fluorescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, submitted.
7. Hannote, M., Flores, F., Torres, L. and Galindo, E., Apparent yield stress estimation in xanthan gum solutions and fermentation broths using a low-cost viscometer. *The Chemical Engineering Journal* 1991, 45, B49-B56.



8. APHA, AWWA and WPCF, Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17th ed., USA, 1989.
9. Buchholz, K., Characterization of Immobilized Biocatalysts, Vol. 84. Dechema, Frankfurt, 1979, pp. 73-94 and 127-135.
10. Dapaah, S. Y. and Hill, G. A., Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering* 1992, **40**, 1353-1358.
11. Blum, D. J. W. and Speece, R. E., A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparison and correlations. *Research Journal WPCF* 1991, **63**(3), 198-207.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 2

Explosives and Nitroaromatics  
Composting of Contaminated Soils and Sludges  
Natural Attenuation of Recalcitrant Compounds  
Landfarming  
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons  
Pesticides and Herbicides  
Field Methods and Process Monitoring  
PCBs and Chlorinated Aromatics  
Fungal Technologies  
Surfactant-Aided Bioremediation

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Papers from the Fourth International  
In Situ and On-Site Bioremediation Symposium  
New Orleans, April 28 — May 1, 1997

### *Symposium Chairs*

Bruce C. Alleman and Andrea Leeson  
*Battelle, Columbus, Ohio*



BATTELLE PRESS

Columbus, Ohio

152

## REMOVAL OF CHLOROPHENOLS INCLUDING PENTACHLOROPHENOL AT HIGH CONCENTRATIONS FROM CONTAMINATED WATERS

Luis G. Torres, Verónica Albiter and Blanca Jiménez  
(Instituto de Ingeniería. Coordinación de Ambiental.  
Universidad Nacional Autónoma de México. MÉXICO)

**ABSTRACT:** A *tezonite*-packed column previously characterized was employed for treatment of highly concentrated phenol (Ph), 2-chlorophenol (2CPh), 2,4-dichlorophenol (2,4DCPh), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6TCPh), and pentachlorophenol (PCPh) streams. *Pseudomonas fluorescens* was the monoculture immobilized on the packing. The system was capable of removing 90 to 100% of the initial phenol and chlorophenol concentrations. The maximum toxic concentrations tested were 1000, 600, 600, 700 and 300 mg/L for Ph, 2CPh, 2,4DCPh, 2,4,6TCPh and PCPh, respectively. Activities as high as 413, 1780, 1670, 2194 and 204 mg/L per day were found for Ph, 2CPh, 2,4DCPh, 2,4,6TCPh and PCPh respectively. The carbon/nitrogen (C/N) rate had a noticeable effect over the biocatalyst activity: the lower the C/N rate, the higher the activity. With respect to the mono-, di- and trichlorophenol biodegradation mechanism, the results suggest a dechlorination of the aliphatic intermediate, after the aromatic ring fission. The system proved to be a low-cost, high-efficiency option in the bioremediation of phenol, and chlorophenols-contaminated groundwaters.

### INTRODUCTION

Toxic aromatic compounds found in high concentrations in industrial wastes and contaminated water can potentially be eliminated by low-cost bioremediation systems. There are many sources of anthropogenic aromatics. Regarding to the chlorophenols and dioxins, these are pesticides, pulp bleaching effluents and wood preservation. Phenol and chlorophenols concentrations in waters are regulated by the Mexican legislation, the United States Environmental Protection Agency (USEPA), the International Commission for the River Rhin Protection (ICPR) and the World Health Organization (WHO), among others. Only a few efficient systems for treating this kind of toxics at high concentrations have been reported. Among them, the use of immobilized specific strains has been recommended (Lee *et al.*, 1994; Westmeier and Rehm, 1985; Torres *et al.*, 1996 and 1997). These systems could be mainly trickling and submerged filters or biofilm reactors (*i.e.* rotating discs, concentric cylinders bio-reactors)

**Objective.** The aim of this work was to demonstrate the feasibility of phenol, chloro-, dichloro-, trichloro- and pentachlorophenol biodegradation (at high concentrations) by means of a submerged filter, packed with *tezonite* and

inoculated with *Pseudomonas fluorescens*, and its usefulness as an on site bioremediation tool.

## MATERIALS AND METHODS

Aspects regarding the employed *Pseudomonas fluorescens* strain and its culture conditions are detailed elsewhere (Torres *et al.*, 1997). Twenty-nine mL glass columns were employed. These columns were held at 28±1 °C by means of water recirculation. The columns were packed with *tezontle*, (a red basaltic scoria from the central México) at equal proportions of mesh 12, 14 and 16 (diameters between 1.13 and 1.41 mm), apparent density of 0.77g/mL and porosity of about 65%. Other packing supports and operation characteristics are described elsewhere (Torres *et al.*, 1997). The columns were inoculated passing a cell culture with a fixed cellular content (*i.e.* optical density *ca.* 0.250) through the column during 24 hours. The colony forming units per gram of support (CFU/g<sub>support</sub>) were measured as described by Torres *et al.*, 1996. Total Organic Carbon TOC was measured using a Shimadzu equipment. Phenol and chlorophenols were measured according to Standard Methods (APHA, AWWA, WPCF, 1981), developing a calibration curve for every single compound.

## RESULTS AND DISCUSSION

The packed column was capable of removing 90 to 100% of the initial phenol or chlorophenol concentration. The maximum phenol concentrations assessed were 1000, 600, 600, 700 and 300 mg/L for Ph, 2CPh, 2,4DCPh, 2,4,6TCPPh and PCPh, respectively. Biodegradation time was quite dependent on the toxics' nature and concentration.

A typical profile of toxic concentration *versus* time is shown at figure 1. In this case, biodegradation of 2,4,6TCPPh against process time is reported. As observed, most of the material is removed in the initial 24 hours, but the process was stopped when 95% removal was reached, as a general rule. The solid lines show the biodegradation data adjusted to the form  $C_{phenol} = C_{phenol_0} e^{-kt}$ , where

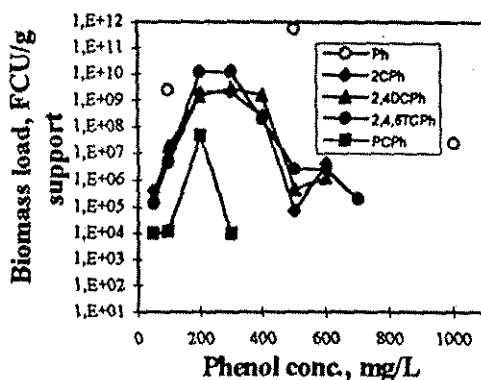
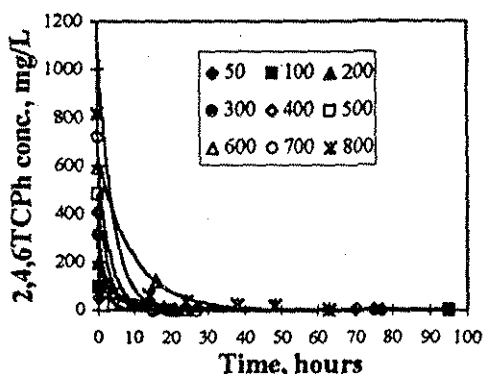


FIGURE 1. 2,4,6TCPPh concentrations against process time.

FIGURE 2. Biomass load as a function of phenols' concentration.

$C_{\text{phenol } 0}$  is the initial  $C_{\text{phenol}}$  value,  $k_1$  is the kinetic constant and  $t$ , the process time. It becomes evident that the higher the toxic concentration, the lower the proportional process time for values between 50 and 600 mg/L. For the 700 mg/L experiment a slight longer removal time was observed. This behavior was the same for the rest of the phenols.

**Packed column removal activities.** The column removal activity takes into account the amount of material degraded, the actual volume and the process time. These activities were calculated for all the experiments carried out with the different phenols and are summarized on table 1. As a general procedure, every compound concentration was increased at the end of every successful biodegradation process, until a diminution on the column activity was observed. The only one exception was phenol, which was tested at 100, 500 and 1000 mg/L but no column activity decrease was observed. Dapaah and Hill (1992) assessed *Pseudomonas putida* free cells in the biodegradation of a mixture of phenol and 4-chlorophenol. They reached cell activities as high as 64 mg/L.day for 500 mg/l of phenol and 13 mg/L.day for 100 mg/L of 4-chlorophenol. Westmeier and Rehm (1985) employed *Alcaligenes sp.* entrapped in Ca-alginate spheres for the degradation of 4-chlorophenol. They reported activities in the range of 269-514 mg/L.day for 0.25-0.5 mg/L of chlorophenol. At the other hand, Lee *et al.* (1994), studied the use of a mixture of six identified microorganisms immobilized in Ca-alginate in the biodegradation of phenol, 2-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol. They observed activities of 181-1000 mg/L.day for 200-500 mg/L of phenol, 10-12.96 mg/L.day for 10-35 mg/L 2-chlorophenol and 40-80 mg/L.day for 20-40 mg/L of 2,4-dichlorophenol. For pentachlorophenol there is no available information on any specific system activity, but an excellent review on microbial degradation of pentachlorophenol has been published by McAllister *et al.*, 1996

 TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

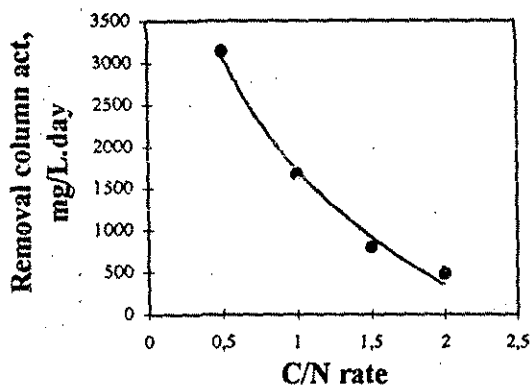
**TABLE 1. Tezontle packed column removal activities in  $\text{mg}_{\text{phenol}}/\text{L}\cdot\text{day}$**

Conc., mg/L	Ph	2CPh	2,4DCPh	2,4,6TCPH	PCPh
50	-	43.35	45.14	51.87	16.58
100	81.94	73.15	69.46	83.34	15.94
200	-	688.20	656.59	769.76	203.63
300	-	1,038.42	986.22	1,731.4	100.06
400	-	1,779.05	1,387.63	1,765.07	-
500	131.81	1,638.21	1,669.58	1,983.09	-
600	-	71.95	728.75	2,043.00	-
700	-	-	-	2,193.56	-
1000	413.18	-	-	-	-

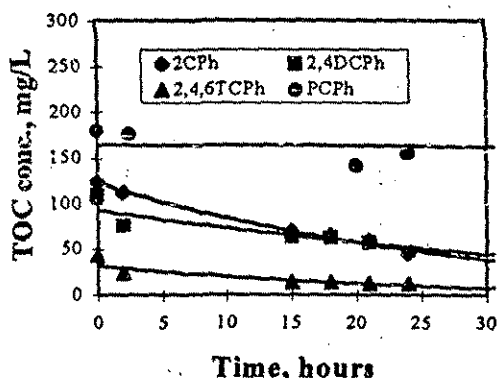
**Column biomass loads.** It is necessary to remark that these column activities are related in some way to the biomass load. At figure 2, the  $\text{CFU}/\text{g}_{\text{support}}$  for every column is shown. The CFU values for the columns feed with 2CPh, 2,4DCPh and 2,4,6TCPH were quite similar.

biodegradation until  $10^9$ - $10^{10}$  CFU/g<sub>support</sub> for the 200-300 mg/L phenols concentration. From this value, a decrease on the biomass load was observed until  $10^5$ - $10^6$  was reached for a toxic concentration of 500 mg/L. A significant cell growing for toxic concentration above 500 mg/L was observed. For the PCPh, the initial biomass content was  $10^4$  CFU/g<sub>support</sub>, when the compound concentration was 200 mg/L, the CFU was higher than  $10^7$ . Finally, values of around  $10^4$  were measured for the highest PCPh concentration (300 mg/L). The column treating only phenol started with  $10^9$  CFU/g<sub>support</sub> and reached  $10^{12}$  for the 500 mg/L test. For the 100 mg/L test, a  $10^7$  biomass load was observed.

**Effect of the C/N rate over microbial activity.** The removal experiments were conducted employing the Dapaah medium (Dapaah and Hill, 1992) with different amounts of the N-source.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The C/N rate was fixed at values between 0.5 and 2 for 2CPH, 2,4DCPh and 2,4,6TCPh., at 300 mg/L. The column activities were then calculated and plotted against the C/N rates. At figure 3, the behaviour of the 2,4,6TCPh is analyzed. As the figure shows clearly, there is an inverse function between the column activity and the C/N rate. This is true for the other two compounds. This fact has profound implications for the column operation.



**FIGURE 3.** Packed column activity as a function of the C/N rate.



**FIGURE 4.** TOC values as a function of biodegradation times.

**Phenol and TOC degradations.** Figure 4 shows the TOC values along the 2CPH, 2,4DCPh, 2,4,6TCPh and PCPh biodegradation. It is noticeable that while the mono-, di- and tri substituted phenol TOC values decreased substantially, the TOC values for the PCPh were practically constant for the same period. In fact, for the PCPh, the experiment was continued for more than 100 hours and no significant TOC changes were observed. The solid lines show the biodegradation data adjusted to  $\text{TOC} = \text{TOC}_0 \cdot e^{-k_2 t}$ , being  $\text{TOC}_0$  the initial TOC value,  $k_2$  the kinetic constant, and  $t$  the process time. The  $k_2$  values and the related discussion will be published later.

At table 2, some interesting details of the TOC biodegradation experiments are remarked. At 24 hours time (when most of the initial 2CPH, 2,4DCPh and

2,4,6TCPPh concentrations had been removed) the TOC removal values were about 63.5, 47.4, 70.8 and 14% for initial 2CPh, 2,4DCPh and 2,4,6TCPPh and PCPh, respectively. These TOC removal values represent the 73.5, 53.4, 75 and 23.6% of the phenol removal reached for every phenol. It is interesting to note that the higher value corresponds to the 2,4,6TCPPh (the best compound in terms of the column removal activities) followed by the 2CPh (the second best column removal activities) and the 2,4DCPh (the third position regarding to the column activities). The lowest value is associated to pentachlorophenol, a third and a half of the values for the other substituted chlorophenols. At the other hand, all the experiments were carried out at fixed initial pH value of 7.0, and this variable was sustained throughout the entire process. At 24 hours, the pH values were about 5.9, 6.1, 6.1 and 6.9, respectively. Again, it is remarkable that the pH value for the PCPh test is quite different from the rest of the group. The observation of the different phenols, TOC and pH value profiles as a function of time (not all data are shown), suggest that a dechlorination of an aliphatic intermediate occurs after the aromatic ring fission, in the case of the mono-, di- and trisubstituted compounds, as reviewed by Uotila (1993) for the dechlorination of mono- and dichlorophenols by *Pseudomonas*, *Arthrobacter* and *Rhodococcus* genera. Concerning to the PCPh, the biodegradation mechanism is evidently different, maybe dehydroxylation, as reviewed by Uotila (1993) for polychlorinated phenols by *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* and *Flavobacterium* genera.

 TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLE 2. Phenol and TOC removals for a given process time (ca. 24 hours), phenols concentration 300 mg/L.**

Feature :	2CPh	2,4DCPh	2,4,6TCPPh	PCPh
Ph removal,%	86.40	88.70	94.30	59.29
TOC removal,%	63.54	47.40	70.81	13.99
Ph/TOC rate, %	73.55	53.44	75.09	23.59
pH	5.88	6.14	6.14	6.95

## CONCLUSIONS

The system was capable of removing 90 to 100% of the initial phenol and chlorophenol concentrations. The maximum toxic concentrations tested were 1000, 600, 600, 700 and 300 mg/L of Ph, 2CPh, 2,4DCPh, 2,4,6TCPPh and PCPh, respectively. Activities as high as 413 (at 1000 mg/L), 1780 (at 400 mg/L), 1670 (at 500 mg/L), 2194 (at 700 mg/L) and 204 (at 200 mg/L) mg/L per day were reached for Ph, 2CPh, 2,4DCPh, 2,4,6TCPPh and PCPh, respectively. The C/N rate had a noticeable effect over the biocatalyst activity: the lower the C/N rate, the higher the activity for the mono-, di- and trichlorophenols, but presumably also for phenol and pentachlorophenol. With respect to the mono-, di- and trichlorophenol biodegradation mechanism, the results suggest a dechlorination of the aliphatic intermediate, after the aromatic ring fission, previously proposed for the

biodegradation mechanism is evidently different, maybe dehydroxylation. The system proved to be a low-cost, high-efficiency option in the bioremediation of phenol, and chlorophenols-contaminated groundwaters. Currently, our group is working on the operational characteristics of a 5 L *tezontle* packed continuous column treating single and mixed chlorophenols.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was founded by Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM, Grant IN503895. The text revision by M. de la Torre is acknowledged with thanks.

## REFERENCES

- APHA, AWWA, WPCF (Eds). 1981. *Standard methods for the examination of Water and Wastewater*. 15<sup>th</sup> ed. Washington, D.C. USA.
- Dapaah S.Y. and G.A. Hill. 1992 "Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomonas putida*". *Biotechnology and Bioengineering*. 40: 1353-1358.
- Lee C.M., C.J. Lu and M.S. Chuang. 1994. "Effects of immobilized cells on the biodegradation of chlorinated phenols". *Water Science and Technology*. 30(9): 87-90.
- MacAllister K, H. Lee and J.T. Trevors. 1996. "Microbial degradation of pentachlorophenol". *Biodegradation*. 7: 1-40.
- Uotila J. 1993. "Dehalogenases for polyhalogenated aromatic compounds in *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Mycobacterium fortuitum* CG-2". PhD Thesis. University of Helsinki, Finland.
- Torres L.G., D. Rosas and B. Jiménez. 1996. "Phenol and chlorophenols removal from wastewater in a *tezontle* biocatalyst". *Biodegradation*. Submitted.
- Torres L.G., D. Rosas, A. Sánchez-de-la-Vega and B. Jiménez. 1997. "Submerged filters packed with different supports for phenol and chlorophenols removal" *Journal of Environmental Engineering*. Submitted.
- Westmeier F. and J. Rehm. 1985. "Biodegradation of 4-chlorophenol by entrapped *Alcaligenes sp A 7-2*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 22: 301-305.



# Bioremediation and Phytoremediation

## Chlorinated and Recalcitrant Compounds

Editors

Godage B. Wickramanayake  
*Battelle*

Robert E. Hincbee  
*Parsons Engineering Science, Inc.*

The First International Conference  
on Remediation of Chlorinated and  
Recalcitrant Compounds

Monterey, California, May 18-21, 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



BATTELLE PRESS

Columbus, Ohio

## REMOVAL OF DI-, TRI-, TETRA-, AND PENTACHLOROPHENOL MIXTURES IN A 5 L CONTINUOUS AEROBIC PACKED COLUMN

Luis G. Torres, Alejandro Salinas, Blanca E. Jiménez (Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, MEXICO), and Erick R. Bandala (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, MEXICO)

**ABSTRACT:** A 5 L column packed with *tezontle* (a basaltic scoria) and inoculated with *Pseudomonas fluorescens* was operated at room temperature, under unaerated conditions. Three different chlorophenol mixtures were assessed 200, 400 and 600 mg/L as total chlorophenols (with proportional concentrations of di-, tri-, tetra-, and pentachlorophenol). Both total (4-aminoantipirine method) and specific chlorophenols (GC/Mass spectrometry system), and total organic carbon (TOC analyzer) removals were measured. Of the total initial chlorophenols for the concentrations of 200, 400 and 600 mg/L, the packed column was able of removing 43-56, 75-80, and 77-86%, respectively. The biodegradation rates for each concentration range were 33-174 mg/L.day (for 200 mg/L), 118-494 mg/L.day (for 400 mg/L), and 179-725 mg/L.day (for 600 mg/L). These variations are due to the hydraulic residence time (HRT), controlled at values of 15.5, 31, and 62 hours. The lowest values correspond most of the time to HRT = 62 hours, and the higher values to HRT=15.5 hours. Total organic carbon TOC removals were around 38-59%. The system demonstrated to be a powerful tool in the bioremediation of waters contaminated with chlorophenols.

### INTRODUCTION

Chlorophenols and derivatives have been widely used as pesticides, antifungal agents and herbicides. Due to the high toxicity of this xenobiotics, only a few biological treatment systems are suitable for the bioremediation of contaminated aquifers, water bodies or soils. The use of aerobic submerged filters, where specific microorganisms or mixtures of them have been immobilized, has been reported because of its high potential applications (Arvin, 1991, Selgnez *et al.*, 1993, Fava *et al.*, 1996, Torres *et al.*, 1997b). Some of these experiences were carried out in small systems working batchwise. In most of the quoted papers the degradation of simple compounds and never of complex mixtures of them were assessed.

**Objective.** The aim of this work is to report the successful use of a 5 L continuous aerobic column with a low-cost packing material, for the biodegradation of di, tri, tetra, and pentachlorophenol mixtures in concentrations up to 600 mg/L as total chlorophenols. The relationship between chlorophenol's removal and the hydraulic retention time was investigated. TOC removals and cell loads in the packed column during the continuous process were also evaluated and discussed.

## MATERIALS AND METHODS

*Tezontle* is a basaltic scoria abundant in the central Valley of México. It is a very cheap, light, resistant, porous and easy to handle construction material. Three different *tezontle* size distributions were characterized in terms of global porosity (%), apparent density (g/ml), and strength indirectly, as the solubilities in HCl and NaOH (%), as well as the suitability of being colonized by *Pseudomonas fluorescens* cells (as FCU/g<sub>support</sub>). These mixtures were termed fine (particles between 0.84-1.19 mm), medium size (particles between 1.19-1.68 mm) and gross portion (particles between 1.68-3.36 mm).

The employed column is a perspex cylinder (95 mm in diameter, 900 mm in height); Active volume is around 3.5 liters according to the porosity of the employed packing material. The cross section is 0.007 m<sup>2</sup>. It was packed with 100 mm height of gravel and 710 mm height of a given *tezontle* granulometry. The system was connected as shown on figure 1. A peristaltic pump was used in order to pump CPh solutions and circulate them upwards through the column. The system was started inoculating the *tezontle*. For this purpose, a 15 liters fermentation of *Pseudomonas fluorescens* in YPG (yeast extract, caseine peptone and glucose, 10 mg/L of each one) medium was used. Cell concentrations during the fermentation process were monitored by means of optical density. The rich culture was recirculated through the column for 24 hours and the wasted medium was discharged. Different solutions of chlorophenols in Dapaah medium (Dapaah and Hill, 1992) were fed to the system. The cell load in the column (as CFU/g<sub>support</sub>) was evaluated periodically by plating dishes of YPG and King B (specially designed for fluorescent microorganisms as *P. fluorescens*) media as described by Salinas, 1997. Solutions containing mono-, di-, and trichlorophenols were fed consecutively to the column. The phenols and total organic carbon (TOC) were measured as detailed by Salinas, 1997. Mixtures consisting of mono-di, mono-di-tri and mono-di-tri-pentachlorophenol were fed to the column. The procedure lasted 3 months. The results of this experimental work were reported elsewhere (Salinas, 1997). After this, di-, tri-, tetra-, and pentachlorophenol mixtures at 200, 400 and 600 mg/L were employed. Every total phenol's concentration was evaluated at three different hydraulic retention times, HRT, defined in the previous experiences. FCU/g<sub>support</sub>, temperature, total and specific chlorophenol concentrations, and TOC were evaluated periodically. GC/mass techniques were employed in order to determine specific chlorophenols concentration in the effluents, the 4-aminoantipirine method, for the total chlorophenols evaluation, using the appropriate calibration curve. For more details, see Torres *et al.*, 1997a.

## RESULTS AND DISCUSSION

The characterization of the packing material with different size distributions is given on table 1. Differences among the three size distributions were observed. Apparent densities were between 0.77 and 0.93 mg/L. Solubility values are an accelerated-test measurement of the decay of the material. The harder mixture is the gross portion, followed by the fine and medium sizes. Regarding the suitability for being colonized by *Pseudomonas*, it is interesting to note that fine and medium portions gave a very good cell load value (around 10<sup>9</sup> FCU/g<sub>support</sub>), but the gross

portion showed to be the best one (around  $10^{11}$  FCU/g<sub>support</sub>). Perhaps the most useful parameter is the porosity of the material. Regarding to these values, medium size distribution had the best porosity (65%), followed by the fine (44%) and, at last, the gross portion (21%). In basis of the importance of the packing material porosity for the functioning of the system, it was decided to use the medium size distribution throughout this work.

TABLE 1. Characterization of the *tezontle* mixtures.

Mixture	Particle size	Porosity (%)	App. Density (g/ml)	Solubility in HCL (%)	Solubility in NaOH (%)	Cell load (FCU/g <sub>support</sub> )
Fine	0.84-1.19	44.0	0.9378	3.47	0.897	$8.5 \times 10^9$
Medium	1.19-1.68	65.0	0.7700	3.23	1.36	$1.4 \times 10^9$
Gross	1.68-3.36	21.3	0.8594	1.88	0.1970	$1.7 \times 10^{11}$

The 15 liters fermentation lasted 24 hours and reached optical densities of around 0.3 (1.08 mg/L, in accord with the dry weight curve). It is interesting to mention that the final YPG total count was about  $1 \times 10^{10}$  FCU/g<sub>support</sub>, while the King B was very close ( $5 \times 10^{10}$  FCU/g<sub>support</sub>). This means that most of the bacteria present were *P. fluorescens*. The column was packed with the medium size distribution and inoculated as described in the materials and methods section. After the inoculation process, the column reached  $10^7$  FCU/g<sub>support</sub> but due to the single CPh's fed (during three months), the cell load oscillated between  $10^5$ -  $10^7$  FCU/g<sub>support</sub> (YPG count). Regarding to the King B count, the FCU/g<sub>support</sub> value was lower than the YPG count (first two weeks), but rapidly increased up to the same value of the YPG count. During this period, temperature ranged between 10 and 23°C. 2CPh was not included in the mixture from this point on due to problems with the chlorophenol's measurement procedure.

The first chlorophenols mixture evaluated was the one containing 400 mg/L (100 mg/L of every chlorophenol), followed by the 600 mg/L one, and the 200 mg/L mixture at the end. Every solution was treated during 2-3 residence times as less. Three samples (morning, noon and afternoon) of the influent and effluent were taken in order to determine the chlorophenol and TOC removals.

The CPh's removal was a function of the HRT for an initial CPh concentration of 200 mg/L. For all the single compounds (except 2,3,4,6TeCPh), the higher the HRT, the lower the CPh removal values. It seems that the 2,3,4,6TeCPh was more degraded at HRT of 62 hours than at 31 hours. The chlorophenol's removal rate was quite near for the specific compounds and the average for the mixture, except for the 2,4,6TCPh. The correspondent removals for this compound were 36, 5.6 and 5% for the 15.5, 31 and 62 hours of HRT, respectively

In the case of the mixture with 400 mg/L of CPh's, the removal values were less dependent on the HRT, maybe except for the 2,4,6TCPh. As a general observation the higher removals were found at HRT equivalent to 15.5 and 31 hours for the different compounds. The removal for 2,4,6TCPh was again markedly lower in comparison to the other compounds or the mixture of total CPh's. The achieved removals for this mixture were higher (75.6-79.8%) than

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

TABLE 3. Biodegradation rates for the different chlorophenols, concentrations, and operation systems ( in  $\text{mg}_{\text{phenol}}/\text{L}\cdot\text{day}$ ).

Phenol	Conc. mg/L	Batch operation		Continuous operation, mixtures at HRT =		
		Singles**	Mixtures*	62 h	31 h	15 h
2,4DCPh	50	45	9.7	7.7	15.3	35.3
	100	69	34.5	23.8	46	100.1
	150	-	40.4	46.4	100.3	197.8
	200	656	4.6	-	-	-
2,4,6TCPh	50	52	0.7	1.6	20.7	-
	100	83	37.3	16.5	29.5	53.6
	150	-	40.1	24.2	83.6	92.3
	200	770	1.7	-	-	-
2,3,4,6TeCPh	50	-	7.6	9.1	19.1	43.7
	100	-	35.7	28	57.1	115
	150	-	38.3	57	108.2	223
	200	-	2.3	-	-	-
PCPh	50	16	7.6	7	13.8	35.7
	100	16	35.4	19.8	41.5	87.9
	150	-	38	50.5	96.7	205.7
	200	204	0	-	-	-
	300	100	-	-	-	-
As total CPh's	200	-	33.9	24.6	49.8	135.3
	400	-	145.9	88.1	174.1	376.7
	600	-	157	178	367.7	718.9
	800	-	8.6	-	-	-

Notes: \*From Torres *et al.*, 1997\*. \*\* From Torres *et al.*, 1997b.

column with the same packing material and size distribution, the same immobilized bacteria and the same mineral medium. The only one difference (besides de operation mode, *i.e.* batch *vs.* continuous) was the temperature. The experiments carried out on batch operation were controlled at 28°C. On the contrary, the experiments reported in this work were developed without temperature control (around 17-23°C). As shown, the BDR's were higher for 2,3,4,TeCPh>PCPh>2,4DCPh>2,4,6TCPh. Regarding to the HRT it is clear that the best BDR's were obtained at the lower HTR tested (15.5 hours). The behavior in this mixture of chlorophenols is considered quite good: BDR's between 135-719  $\text{mg}/\text{L}\cdot\text{day}$  were found for the best HTR (15.5 hours). In the case of the 31 HRT, values of 50-367  $\text{mg}/\text{L}\cdot\text{day}$  were achieved. Finally, for the largest HRT (62 hours), the BDR's were as high as 25-178  $\text{mg}/\text{L}\cdot\text{day}$ . If all these values (specifically those obtained at HRT=15.5 hours) are compared with the values obtained by Torres *et al.*, 1997 working the same mixture in batch mode, it is concluded that the BDR's were increased 1.4-5.8 fold due to the continuous operation. At the other hand, it is necessary to compare this BDR values with those obtained in batch operation, compound by compound (Torres *et al.*, 1997b), *i.e.* not mixed. As shown on table 2, the single BDR values were in general lower than those obtained herein. The BDR values for very high CPh's concentrations are quite high (thousands of

those obtained with a 200 mg/L concentration (42.7-58.7%). It is remarkable to compare the behavior of the 2,4,6TCPPh for this two mixture concentrations, which is completely different. At the end, the removal values found for the 600 mg/L were slightly higher (77.3-86.6%) than those obtained for the 400 and 200 mg/L experiences. In fact, the trends for the specific phenols and the mixture in the case of 600 mg/L are very similar to those observed for the 400 mg/L test

On table 2, the CPh's and TOC removals, as well as the cell loads (as FCU/g<sub>support</sub>) and the average temperatures for every biodegradation assessment, are shown. For the 200, 400 and 600 mg/L tests, the TOC removals were 56, 50 and 46%. This fact indicates that the lower the total chlorophenols concentration, the higher the TOC removal values. Except for the case of the 200 mg/L experiments, all the TOC removal values were less than the CPh removal value (1.4-2 fold). These values mean the capability of *Pseudomonas* of mineralizing the phenolic compounds.

**TABLE 2. Results of the biodegradation runs, regarding to Total phenols, and TOC degradations. Results are an average of triplicates.**

HRT (hours)	Initial total Ph conc. (mg/L)	TOC removal (%)	Total Ph removal (%)	Cell load (FCU/g <sub>support</sub> x10 <sup>5</sup> )	Test temperature (°C)
15.5	200	59.5	58.8	2.97	21.0
31	200	52.1	43.3	2.97	17.0
62	200	57.7	42.7	2.97	17.5
15.5	400	41.3	79.8	2.77	19.0
31	400	52.8	75.6	1.95	18.5
62	400	56.2	76.5	1.95	17.5
15.5	600	45.0	78.0	2.68	20.0
31	600	55.1	86.6	2.68	18.0
62	600	37.9	77.3	2.68	19.2

Regarding to the FCU/g<sub>support</sub>, it is noticeable that the cell load was quite constant (1.95-2.97x10<sup>5</sup> FCU/g<sub>support</sub>). This fact is important when comparing different biodegradation tests. At the end, the average temperature of the column operation was 17-21°C during working hours (temperature was not registered during nights). This is a critical point, since other systems reported in the literature for the treatment of toxic compounds or mixtures are temperature controlled, and that means energy consumption which increases the cost of the waste, superficial or aquifer water treatment.

In order to compare the different removal values obtained in the tests previously described, this values were converted into biodegradation rates BDR's, taking into account the process time (*i.e.* the HRT) for every case. At table 3, these biodegradation rates for the total phenol concentration and for every compound in the mixtures, are summarized.

For comparison purposes, the BDR's observed when working with a batch system very similar to that employed in this work (Torres *et al.*, 1997a and b). It is important to mention that those experiments were carried out in a 27 mL glass

mg/L.day) but in these experiments the specific CPh concentrations ranged between 50 and 150 mg/L.

## CONCLUSIONS

The most suitable granulometry for this work's purposes is the medium one. It showed high porosity (65%), medium apparent density (0.77 g/ml), strength, and suitability for being colonized by *Pseudomonas fluorescens* (around  $10^9$  FCU/g<sub>support</sub>). The column packed with *tezontle* was able of removing 43-56, 75-80, and 77-86% of the total initial chlorophenols for the concentrations of 200, 400 and 600 mg/L, respectively. The biodegradation rates for every concentration ranges were 33-174 mg/L.day (for 200 mg/L), 118-494 mg/L.day (for 400 mg/L), and 179-725 mg/L.day (for 600 mg/L). These variations are due to the specific HRT, controlled at values of 15.5, 31, and 62 hours. The lowest values correspond most of the times to HRT = 62 hours, and the higher values to HRT=15.5 hours. TOC removals were around 38-59%. The system demonstrated to be a powerful tool in the bioremediation of waters contaminated with chlorophenols.

## ACKNOWLEDGEMENTS

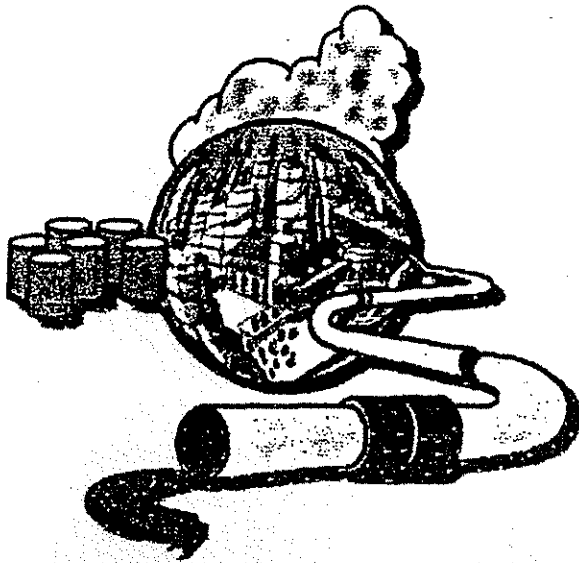
This work was financially supported by DGAPA/UNAM (Grant IN503895). The authors wish to acknowledge with thanks the text revision by Manuel de la Torre. The help of Mayra Fernández and Miguel Hernández in the experimental work and analysis is thanked too.

## REFERENCES

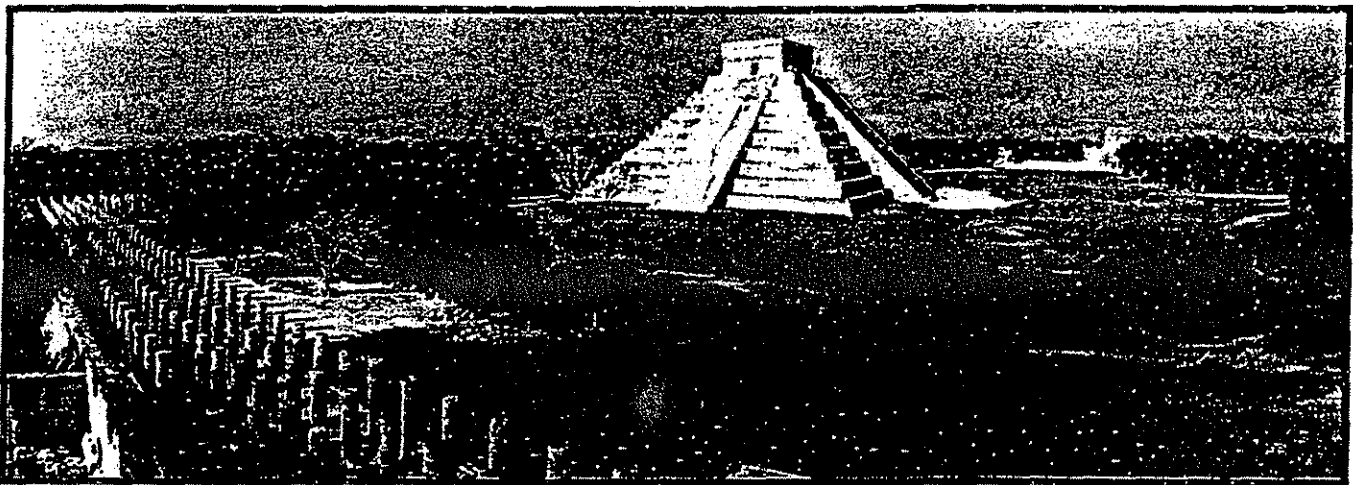
- Arvin E. (1991) Biodegradation kinetics of chlorinated aliphatic hydrocarbons with methane oxidizing bacteria in an aerobic fixed biofilm reactor. *Water Research*. 25(7): 873-881.
- Dapaah S.Y. and G.A. Hill (1992) Biodegradation of chlorinated mixtures by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*. 40:1353-1358.
- Fava F., F. Baldoni, L. Marchetti and G. Quattroni (19996) A bioreactor system for the mineralization of low-chlorinated biphenyls. *Process Biochemistry*. 31(7): 659-667.
- Salinas A. (1997) Biodegradation of chlorophenol's mixtures in a packed bed at continuous operation. UNAM. Bachelor's thesis (In spanish).
- Seigneur Ch., V. Mottier, C. Pulgarin, N. Adler and P. Péringier (1993) Biodegradation of xenobiotics in a fixed bed reactor. *Environmental Progress*. 12(4): 306-311.
- Torres L.G., M. Hernández, E.R. Bandala, Y. Pica, V. Albiter and B.E. Jiménez (1997a) Degradation of di-, tri-, tetra-, and pentachlorophenol mixtures in an aerobic biofilter. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Submitted.
- Torres L.G., V. Albiter, and B. Jiménez (1997b) Removal of chlorophenols including pentachlorophenol at high concentrations from contaminated waters. *In situ* and on site bioremediation. New Orleans. April-May 1997.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# PROCEEDINGS

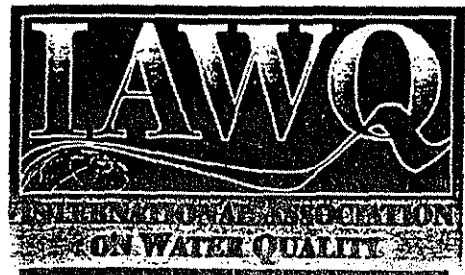


## WASTE MINIMISATION AND END OF PIPE TREATMENT IN CHEMICAL AND PETROCHEMICAL INDUSTRIES



*Merida, Yucatan, Mexico  
November 14 - 18, 1999*

**IAWQ International Specialised  
Conference of the Chemical  
Industry Group**





# START-UP AND OPERATION OF AN AEROBIC BIOFILTER FOR THE TREATMENT OF SYNTHETIC WASTEWATERS CONTAINING CHLOROPHENOLS AND THEIR MIXTURES

Luis G. Torres<sup>1</sup>, Alejandro Salinas<sup>2</sup>, Blanca E. Jiménez<sup>2</sup>, and Erick R. Bandala<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Subdirección de Investigación y Tecnología. Programa de Biotecnología, Instituto Mexicano del Petróleo, Eje Central Lázaro Cárdenas 152, 07730 México D.F., México.

<sup>2</sup>Coordinación de Ambiental. Instituto de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

<sup>3</sup>Coordinación de Tratamiento y Calidad del Agua. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Jiutepec, Morelos. México.

## ABSTRACT

Chlorophenols are highly toxic compounds of great concern for the oil extraction and transformation industry. Due to the high toxicity of these xenobiotics, only a few biological treatment systems are suitable for the treatment of wastewaters containing high concentrations of them. The use of aerobic submerged filters (where specific microorganisms or mixtures have been immobilized) which have previously demonstrated capabilities in the degradation of the target compounds, has been reported of high potential applications. The aim of this work is to report the start-up and continuous operation (at room temperature) of a 5 liters biofilter, for the degradation of single chlorophenols at high concentrations. The system did not need any sanitary control; since given the toxicity of the effluent there was no significant development of other bacteria on the inert support. The system was capable of continuously treating 2-chloro-, 2,4-dichloro-, 2,4,6-trichloro-, and pentachlorophenol at maximum concentrations of 500, 500, 500 and 200 mg/l, respectively. The chlorophenols percent removals observed were between 6.0 and 92.2%, regarding the fed synthetic wastewater.

## KEYWORDS

biological treatment, chlorophenols, industrial wastewaters, *Pseudomonas fluorescens*, submerged biofilters.

## INTRODUCTION

Petroleum industry is one of the most important industries for México. Chlorophenols are highly toxic compounds of great concern for the oil extraction and transformation industry. Physical-chemical methods have proven to be effective in the removal and/or destruction of these kind of compounds, but they are highly energy and chemical consumers. Due to the high toxicity of these xenobiotics, only a few biological treatment systems are suitable for the treatment of wastewaters containing high concentrations of them. The use of aerobic submerged filters (where specific microorganisms or mixtures have been immobilized) which have previously demonstrated capabilities in the degradation of the target compounds, has been reported of high potential applications (Torres *et al.*, 1998). The aim of this work is to report the start-up and continuous operation (at room temperature) of a 5 liters biofilter, for the degradation of single chlorophenols at high concentrations.

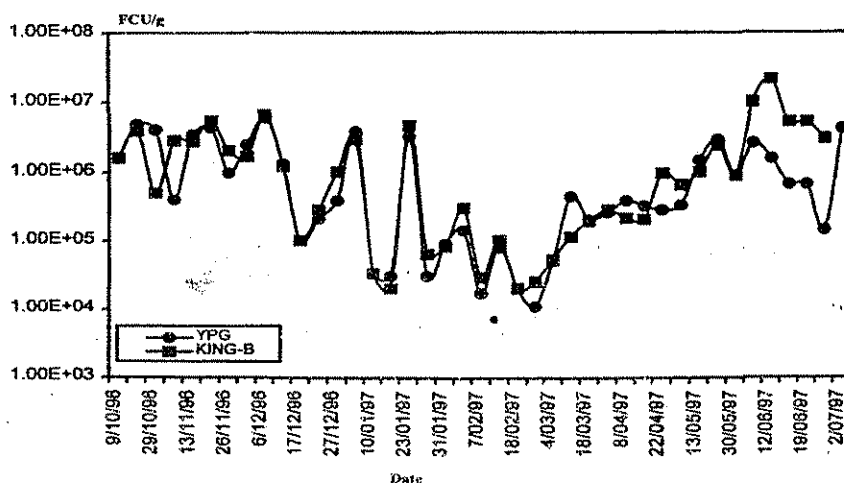
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Tezontle* is a basaltic scoria very abundant in the Central Valley of México. It has been used as a construction material and for the filtration of drinking water in low and high rate filters. It is a very porous and resistant material, which makes it very suitable a support for a biofilter. A mixture of 1.19-1.68 mm *tezontle* particles was used along this work. A perspex cylinder (95 mm in diameter, 900 mm in height) was filled with 100 mm height of gravel and 710 mm height of the *tezontle* mixture. The system was started inoculating the *tezontle* with *Pseudomonas fluorescens*, a strain previously used for the degradation of chlorophenols, 2,4 dichlorophenoxy acetic acid and pesticides as aldrin, dieldrin, heptachloro and heptachloro epoxide (Bandala *et al.*, 1998, Torres *et al.*, 1998). For this purpose, two 15 liters fermentations of *P. Fluorescens* in YPG medium were carried out. Cell concentration changes during fermentation were monitored by means of optical density.

The rich culture was recirculated through the column during 24 hours and the wasted medium was discharged. Dapaah medium (Dapaah and Hill, 1991) solutions containing different chlorophenols (mono-, di-, tri-, and pentachlorophenol) were fed to the system as a start-up stage. Colony forming units, CFU/g<sub>support</sub>, were evaluated periodically by plating Petri dishes of YPG (a rich medium) and King B (for fluorescent microorganisms) solid media. All counts were carried out by triplicate. Chlorophenols at given concentrations were employed (100-500 mg/l), and the hydraulic residence times (HRT) were varied between 3 and 62 hours. The system was operated at room temperature, though the morning, noon, and afternoon temperatures were registered and averaged. The chlorophenols were measured by means of the 4-aminoantipirine technique reported in Standard Methods (APHA, AWWA, and WPCP, 1989). Chlorophenol removal was calculated as a percentage of the initial concentration. For more details, see Torres (1999)

## RESULTS AND DISCUSSION

Two-15 liters YPG fermentations were developed lasting 24 and 22.5 hours, respectively. The maximum biomass concentrations as optical densities were 0.19 and 0.25, respectively. The rich medium was recirculated through the column during 24 hours. After that, the wasted medium was discharged and 2,4,6-trichlorophenol was added to the system batchwise. The start-up of the system consisted in the batch feed of 2,4,6-trichlorophenol at a medium concentration of 100 mg/l during a week. The cell load reached initial average values of  $1 \times 10^6$  CFU/g<sub>support</sub>. Figure 1 shows the FUC/g<sub>support</sub> developed on the *tezontle* support, measured during nine months of operation by YPG and King B count in plate. As it can be seen, YPG and King B counts are quite similar in most of the time. Along the feed of different chlorophenols at given concentrations, the biomass adhered to the *tezontle* varied between  $1.79 \times 10^4$  and  $1.13 \times 10^7$  CU/g<sub>support</sub>. These values turned out very dependent on the average day temperature, and on both the specific chlorophenol and concentration.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figure 1. YPG and King B counts for the nine months column operation period.

he system did not need any sanitary control; since given the toxicity of the effluent there was no significant development of other bacteria on the inert support. The system was capable of continuously treating 2-chloro-, 2,4-dichloro-, 2,4,6-trichloro-, and pentachlorophenol at maximum concentrations of 1000, 500, 500 and 200 mg/l, respectively. The compound's percent removals observed were between 6.0 and 89.2%, regarding the fed synthetic wastewater. Table 1 shows the more relevant results regarding the operations of the system, as a function of the HRT.

he removal of streams containing 2-chlorophenol at an initial concentration of 500 mg/l was evaluated at different HRT among 3.1 and 62 hours. Chlorophenol removal resulted in variable values among 6.0 and 3.55%. By elimination of the point corresponding to HRT=15.5 (2-chlorophenol removal of around 6%) the rest of the values are quite close, with an average of 22.8%.

hen treating 2,4-chlorophenol at initial concentration of 500 mg/l, only three HRT were evaluated: 15.5, 6.2 and 62 hours. There exist a weak relationship between HRT and the total di-chlorophenol removal: the higher the HRT, the lower the compound removal, though because there are only three points it is hard to make more conclusions.

he 2,4,6-trichlorophenol removal was characterized more deeply. Initial concentrations of 100, 300, and 500 mg/l were evaluated at HRT of 3.1-93 hours. For the lower initial concentration (100 mg/l) it is clear that the higher the HRT, the higher the total removal value (%). These removals were in the range of 18.30 and 56.3%, respectively. When the 2,4,6-trichlorophenol had an initial concentration the trend was unusual: the higher the HRT, the lower the compound removal. Removals of 74.1, 69.3, and 46.0% were measured at HRT of 6.2, 15.5 and 31.0 hours, respectively. Finally, for the higher tested concentration (500 mg/l) the trend was the following. For the lower HRT (3.1 hours) the observed removal was 55.8%, and an increment on HRT (15.5 hours) induced a higher removal value (89.2%, which was the higher chlorophenol removal observed in this work), but a further increment on HRT (31 hours) gave a slightly lower removal (73.9%).

In the special case of the pentachlorophenol treatment, a 200 mg/l concentration was used. HRT of 15.5, 31.0 and 62 hours were assessed. It was observed that the higher the HRT value, the higher the pentachlorophenol removal as in previous assessments.

It is important to underline that all these experiences were developed under no aeration conditions, without pH control, and at room temperature. This bacteria demonstrated the capability of degrading 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol at maximum concentrations of 1,000, 600, 600, 700 and 300 mg/l when it was immobilized on the same support and worked batchwise at 28°C, without any pH control or air addition (Torres *et al.*, 1998).

After this, different chlorophenol mixtures (in concentrations between 200 and 600 mg/l as total chlorophenols) were treated successfully in the system, but the results are reported elsewhere (Torres *et al.*, 1998).

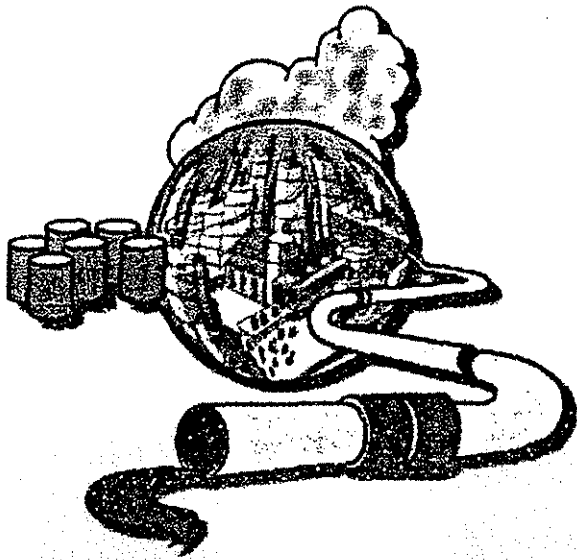
#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was entirely carried out at Instituto de Ingeniería/UNAM and supported by DGAPA/UNAM (303895). The text style revision is thanked to Manuel de la Torre.

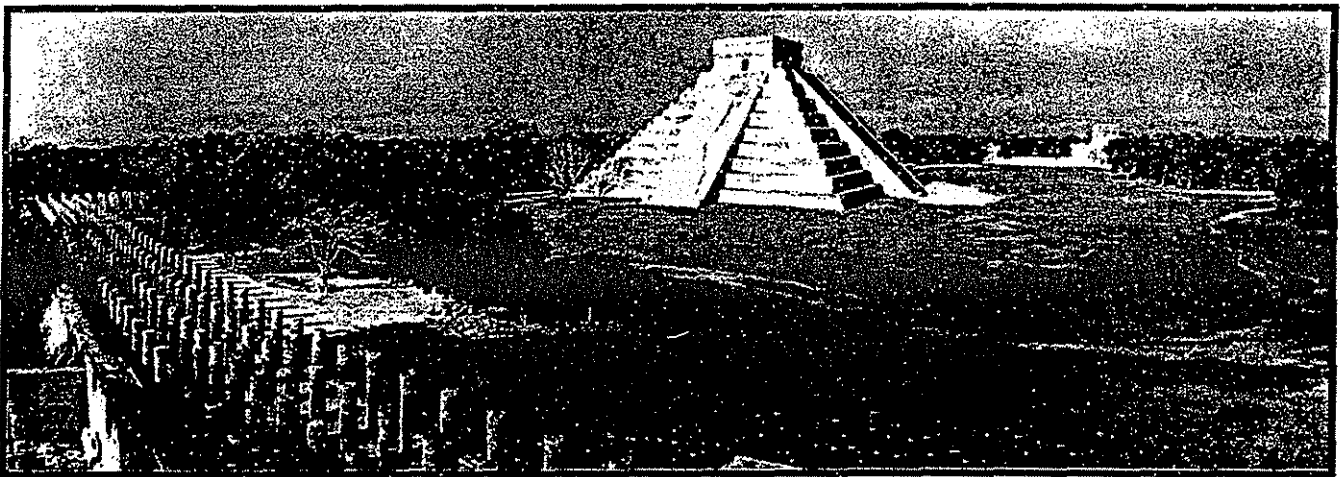
169

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# PROCEEDINGS



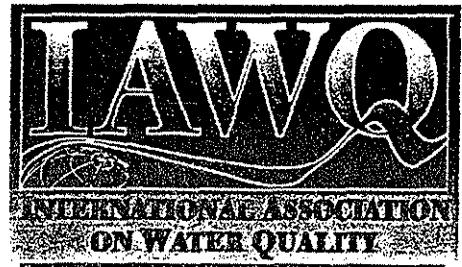
## WASTE MINIMISATION AND END OF PIPE TREATMENT IN CHEMICAL AND PETROCHEMICAL INDUSTRIES



*Merida, Yucatan, Mexico*  
*November 14 - 18, 1999*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**IAWQ International Specialised  
Conference of the Chemical  
Industry Group**



# TOXICITY REDUCTION OF CHLOROPHENOLS MIXTURES IN AN AEROBIC BIOFILTER

**Erick R. Bandala<sup>1</sup> and Luis G. Torres<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Paseo Cuauhnáhuac 8532. Jiutepec, Morelos. 62550 México.

<sup>2</sup> Instituto Mexicano del Petróleo. Subdirección de Investigación y Tecnología. Programa de Biotecnología. Eje Central Lázaro Cárdenas 152. Delegación Gustavo A. Madero. 07730, México D.F.

## ABSTRACT

Chlorophenols are xenobiotics, normally found in the effluent of many industries, as the oil extraction and transformation industry. Due to the high toxicity of these compounds, it is difficult to treat streams containing high concentrations of chlorophenols. The aim of this work is to demonstrate the capabilities of an aerobic submerged filter in the removal of toxicity of di-, tri- tetra- and pentachlorophenols mixtures. A 54 ml glass column packed with *tezontle* and inoculated with *Pseudomonas fluorescens* was employed in this work. Mixtures of 2,4-dichlorophenol; 2,4,6-trichlorophenol ; 2,3,4,6-tetrachlorophenol and pentachlorophenol at equal proportions were prepared in a saline medium. Toxicity was measured in the beginning and the end of the experimental runs using a Microtox equipment. It was shown that the system is capable of treating up to 600 mg/l of total chlorophenols. The system reduced the influent toxicity up to 76%, even when the initial toxicities of the mixture were in range of 40-358 toxic units (classified as very toxic). This results are higher than the reported for toxicity reduction in microbial systems using single aromatic hydrocarbons. Obtained results suggest that the aerobic biofilter characterised in this study poses powerful capabilities for toxicity reduction in industrial effluents contaminated with high concentrations of chlorophenols.

## KEYWORDS

Aerobic biofilter, biodegradation, chlorophenols, *Pseudomonas fluorescens*, toxicity reduction

## INTRODUCTION

Chlorophenols are used extensively as antifungal agents and are often applied as a preservative to freshly sawn lumber. These xenobiotics have been used as herbicides and in the processing of food as microorganism growth controller. Due to their wide use, chlorophenols are presents in the effluents from many industries as pulp and paper, synthetic plastics, pesticides, oil and petrochemistry (Torres, 1994). Mexico has an important oil and petrochemistry industry. It has been calculated that approximately, 10,000 barrels of crude oil refinement yield almost 100 kg of phenols (Nemerow, 1987). Considering the actual quantity of crude oil treated daily in the country, potential phenol and chlorophenols production is alarming.

Phenol and chlorophenols are included in the priority pollutant list from Mexican legislation with a maximum permissible limit quite low due to their high toxicity values in water. Toxicity values for some mono, di, tri and tetrachlorophenols, evaluated as the concentration producing a culture inhibition of 50% respect to a non inhibited control (IC50), are from 0.05 (for tetracholophenol) to 18 mg/l (for 2-chlorophenol). IC50 values for another organic compounds are quite higher, dichloromethane IC50 value is 700 mg/l; methanol IC50 is 14,000; IC50 for chlorohexane is 200; N,N-dimetylacetamide 4,800 and 2,600 for ethyl ether (Blum and Speece, 1991; Torres, 1994).

Due to the high toxicity of these products, only a few biological treatments are suitable for the treatment of streams containing high concentrations of these compounds. One of the systems reported because of its high efficiencies and removal capacities is the submerged aerobic filter, inoculated with one or more

specific microorganisms (Bettman and Rehm, 1985; Zache and Rehm, 1989; Seignez *et al.*, 1993; Khlebnikov and Péringer, 1996; Fava *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 1997).

The aim of this work is to demonstrate the capabilities of an aerobic submerged filter in the removal of toxicity of di-, tri-, tetra- and pentachlorophenols mixtures.

## METHOD

A 54 ml glass column, similar to the one used in previous work (Torres *et al.*, 1997a,b) was employed in this work. The column was packed with *tezontle*, a red basaltic scoria (mesh 12, 13 and 14 at equal proportions) and inoculated with a 24 hours YPG culture of *Pseudomonas fluorescens* grown as detailed in Torres *et al.*, 1997b. Mixtures of 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol and pentachlorophenol at equal proportions and total phenol concentrations of 200, 400 and 600 mg/l, were prepared in the media reported by Dapaah and Hill (1994). Temperature was kept at 28°C. The specific phenols were analysed at the beginning and the end of every biodegradation run (when total chlorophenols removal reached approximately 95%) by means of a gas chromatography/mass spectrometry system, as described in Torres *et al.*, (1997b). Toxicity (as EC50 in mg/l or toxic units, TU) was measured using a Microtox equipment.

## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 summarises data from the removal of chlorophenol mixtures. As shown, at the end of the 200 mg/l experience, 26.23 mg/l of TPh (87% removal). In the 400 mg/l experiment, only 10.8 mg/l (97.3% removal) of TPh were left and, for the last experiment, only 17.8 of initial 600 mg/l were quantified at the end of the test (97% removal).

Table 1. Biodegradation of the chlorophenol mixtures

Initial Conc. (mg/L)	Final Conc. (mg/L)	Removal %	Process time (hours)
200	26.23	86.88	123
400	10.8	97.29	64
600	17.84	97.02	89

The results of the tests developed with the Microtox system in order to estimate the initial toxicity of the 200, 400 and 600 mg/l total phenols mixtures, as well as the final value, are shown at table 2. The initial toxicity values, as EC<sub>50</sub> (in mg/l), were 3.25, 2.45 and 1.9 for the different mixture concentration values, as high as 30.8, 40.8 and 52.4 toxicity units. A toxicity unit is defined in equation 1 (in mg/l) for an easier understanding of the changes in toxicity during the process.

$$\text{Toxicity Units} = \frac{100}{\text{EC}_{50}} \quad (1)$$

The higher the value of TU, the higher the toxicity value of the sample. As comparison, the reference value for a 100 mg/l phenol solution, is shown (with an EC<sub>50</sub> and TU value of 3.85 mg/l and 25.98 respectively).

Some other papers dealing with the toxicity reduction of several organic and inorganic compounds has been reported in the past. For example, Bruns-Nagel *et al.*, (1997) found toxicity reduction up to 98% for the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene using both aerobic and anaerobic systems.

Anderson and Appana (1993) have reported the use of *Pseudomonas fluorescens* for Indium detoxification. Reported results shown that *P. fluorescens* have been able to reduce toxicity by Indium complexation with phosphorus. Pothuluri *et al.* (1995, 1996) reported the detoxification of chrysene and other polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) by *Cunninghamella elegans*. These authors had found that the formation of phenols, quinones, sulphate conjugates of phenols and hydroxylated products formed by *C. elegans* are generally less toxic than parent compounds (Sutherland, 1992).

Toxicity reduction for other several PAH has been reported using *C. elegans*. Authors reported removal of toxicity up to 58% for fluoranthene, 36% for 7,12-dimethylbenze(a)anthracene and 91% for 1-nitropyrene (Cerniglia *et al.*, 1985; McMillan *et al.*, 1988; Pothuluri *et al.*, 1992). In general, all these works have been carried out using only single compounds, which are less toxic that those used in this work. Chlorophenol mixtures used here showed toxicities higher than the sum of the individual compounds.

Another relevant benefit of the system characterised herein, is the work time. Bruns-Nagel *et al.*, (1997) reach exceptional 98 % toxicity removal values after 18-20 weeks. In the same way, McMillan *et al.*, (1988) found toxicity reduction up to 36% over a period of 5 days and Potohuluri *et al.*, (1992), got a 58% of toxicity removal after 120 hours. In this work, we reach satisfactory toxicity reduction in the first 15-20 hours despite concentration used in this work were up to almost four times the work concentrations used by the authors mentioned above.

## CONCLUSIONS

This aerobic submerged filter posses potential applications for the toxicity reduction of highly toxic phenol mixtures up to 600 mg/l of total phenols with satisfactory removal values. The system reduced the influent toxicity in 48-76%, even though the initial toxicities of the mixtures were in the range of 40-358 toxic units, classified as very toxic. A quadratic relationship between total phenol and TU removal was found, but if time is taken account, the most significant relationship is that existing between TU removal and time.

The system proved to be a useful tool in the treatment of industrial streams or contaminated municipal wastewaters containing high toxicity due to high quantities of di-, tri-, tetra- and pentachlorophenols. Nevertheless, if this system is to be employed in the detoxification of phenol and chlorophenol mixtures in industrial effluents, further research is necessary to examine the mechanisms by which this strain metabolises chlorophenols.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by DGAPA, UNAM (Grant IN503895). The authors wish to acknowledge with thanks the Microtox experimental runs made by Yolanda Pica (IMTA) and the text revision by Manuel de la Torre.

## REFERENCES

- Anderson S. and Appana V.D. (1993) Indium detoxification in *Pseudomonas fluorescens*. Environ. Pollution 82,33-37.
- Bettam H. and Rehm H.J. (1985) Continuous degradation of phenol(s) by *Pseudomonas putida* P8 entrapped in polyacrylamide-hydracide. Appl. Microbiol. Bitech. 22,389-393.
- Blum D.J. W. and Speece R.E. (1991) A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. Res. J. WPCF 63(3), 198-207.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Cerniglia C.E., Freeman J.P., White G.L., Heflich R.F. and Miller D.W. (1985). Fungal metabolism and detoxification of the nitropolycyclic aromatic hydrocarbon 1-nitropyrene. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**,649-655.
- Dapaah S.Y. and Hill G.A. (1992). Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering* **40**,1353-1358.
- Fava F., Baldoni F., Marchetti L. and Quattroni G. (1996) A bioreactor system for the mineralization of low-chlorinated biphenyls. *Proc. Biochem.* **31**(7), 659-667.
- Khlebnikov A. and Péringer P. (1996) Biodegradation of p-toluenesulphonic acid by *Commamonas testosteroni* in an aerobic counter-current structured packing biofilm reactor. *Water Sci. Technol.* **34**(5-6), 257-266.
- McMillan D.C., Fu P.P., Freeman J. P., Miller D.W. and Cerniglia C.E. (1988). Microbial metabolism and detoxification of 7,12-dimethylbez(a)anthracene. *J. Ind. Microbiol.* **3**,211-225.
- Nemerow N.L. (1987) Industrial ware pollution: Origin, characteristics and treatment. Addison-Wiley Publishing Co. New York, N.Y. USA.
- Pothuluri J.V., Shelby A., Evans F.E., Freeman J.P. and Cerniglia C.E. (1995). Transformation of chrysene and other polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Bot.* **73** (suppl. 1),S1025-S1033.
- Pothuluri J.V., Evans F.E., Heinze T.M., Fu P.P. and Cerniglia C.E. (1996). Fungal metabolism of 2-nitrotoluene. *J. Toxicol. Environ. Healt* **47**,587-599.
- Pothuluri J.V., Heflich R.H., Fu P.P. and Cerniglia C.E. (1992). Fungal metabolism and detoxification of fluoranthene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**,937-941.
- Seingnez C., Mottier V., Pulgarin C., Adler N. and Péringer P. (1993). Biodegradation of xenobiotics in a fixed bed bioreactor. *Environ. Progress* **12**(4), 306-311.
- Sutherland J.B. (1992). Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Ind. Microbiol.* **9**, 53-62.
- Torres L. G. (1994). Removal of phenol and chlorophenols from water by immobilised microorganisms. (In Spanish). *Revista Biotecnología* **4**(2), 49-65.
- Torres L.G., Albiter V. and Jiménez B. (1997a). Removal of chlorophenols including pentachlorophenol at high concentration from contaminated waters. *Proceedings of the In situ and on site bioremediation Symposium. Battelle. New Orleans, USA. April-May 1997: 447-452.*
- Torres L.G., Bandala E.R., Albiter V., Cabello M., Sánchez-de-la-Vega A. and Jimenez B. (1997b). Biodegradation of some chloro-, nitro- and methylphenols by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* (In preparation).
- Zache G. and Rehm H.J. (1989) Degradation of phenol by co-immobilized entrapped mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 426-432.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN