



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

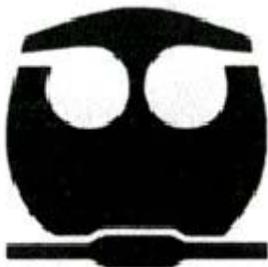
INFLUENCIA DE LA ESTRATEGIA DE
OPERACIÓN DE UN BIO-REACTOR SOBRE LA
ACTIVIDAD DE LOS MICROORGANISMOS
DEGRADADORES DE 4-CLOROFENOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
**CLAUDIA CECILIA MENDOZA
GONZÁLEZ DE LA LLAVE**

Tutor: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ



MÉXICO, D. F.

2006



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.

DEDICATORIA

Con todo el amor a mi padre

Te agradezco infinitamente todo el amor, apoyo y comprensión que me has brindado a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a:

- **La UNAM por ser una gran Universidad y haberme apoyado en mi formación académica a través de DGAPA.**
- **Mis padres por haberme brindado la vida.**
- **Robert por todo el amor y apoyo brindado.**
- **Todos mis amigos que han estado presentes a lo largo de mi vida (incluyendo a Mir y su pandilla).**
- **Al Dr. Germán Buitrón por su apoyo en la realización de este trabajo.**
- **Al Dr. Edmundo Brito y al Dr. Adalberto Noyola por su tiempo y consejos en mi formación académica y a mis sinodales: la Dra. Carmen Watcher, Dr. Miguel Costas, Dr. Alberto Tecante y Dr. Mariano Gutiérrez por sus invaluable observaciones a este trabajo.**
- **Todo el personal del Posgrado de Ciencias Bioquímicas por su profesionalismo, dedicación y enseñanza.**

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| NOMENCLATURA | VII |
| AGRADECIMIENTOS | IX |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 3 |
| 1. Tratamiento de Aguas Residuales Industriales | 3 |
| 1.1. Compuestos xenobióticos | 3 |
| 1.1.1. Clorofenoles | 3 |
| 1.1.2. Ruta metabólica de degradación del 4-Clorofenol (4-CF) | 4 |
| 1.2. Aclimatación | 6 |
| 1.2.1. Mecanismos enzimáticos | 7 |
| 1.2.2. Cambios genéticos | 7 |
| 1.2.3. Multiplicación de microorganismos especializados | 8 |
| 1.3. Actividad Microbiana | 8 |
| 1.3.1. Medidas para determinar la Actividad Microbiana | 8 |
| 1.3.2. Actividad Deshidrogenasa | 11 |
| 1.3.3. Respirimetría | 12 |
| 1.4. Sistema SBR | 12 |
| 1.5. Influencia de los períodos de ayuno | 14 |
| HIPÓTESIS | 15 |
| OBJETIVO | 15 |
| METODOLOGÍA | 16 |
| 2. Estrategia experimental | 16 |
| 2.1. Inóculo | 16 |
| 2.1.1. Aclimatación | 16 |
| 2.2. Descripción del piloto SBR y continuo utilizados | 17 |
| 2.3. Estrategia de operación en modo continuo | 17 |
| 2.4. Estrategia de Operación en modo Discontinuo | 18 |
| 2.4.1. Estrategia de tiempo fijo | 18 |
| 2.4.2. Estrategia de tiempo variable | 19 |
| 2.4.3. Estrategia con flujo óptimamente alimentado | 20 |
| 2.4.3.1. Modelo del proceso | 21 |
| 2.4.3.2. Ley de control | 22 |
| 2.4.3.3. Programa | 23 |
| 2.5. Método Respirométrico | 24 |
| 2.5.1. Respirograma patrón | 24 |
| 2.6. Comparación entre el sistema SBR y continuo | 244 |
| 2.6.1. Variación del TRH y TRC | 244 |
| 2.7. Técnicas analíticas | 25 |
| 2.7.1. Curva Patrón de Actividad deshidrogenasa INT-Formazán | 255 |
| 2.7.2. Determinación de 4-CF y COT | 266 |
| 2.7.3. Absorbancia de metabolito | 27 |

| | |
|--|-----|
| 2.7.4. Estimación de la biomasa..... | 27 |
| 2.7.5. Índice volumétrico de lodos..... | 27 |
| 2.8. Cálculos de variables del proceso..... | 27 |
| 2.8.1. Carga orgánica eliminada (B_{ve}) y aplicada (B_{va})..... | 27 |
| 2.8.2. Tasas de degradación específica (q_x) y volumétrica (q_v)..... | 28 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 29 |
| 3. Funcionamiento de los reactores bajo diferentes condiciones de operación..... | 29 |
| 3.1. Aclimatación de los lodos..... | 29 |
| 3.1.1. Cinéticas de degradación en etapa de aclimatación..... | 29 |
| 3.1.2. Sistema SBR operado con tiempos variables..... | 30 |
| 3.1.3. Comparación de un sistema SBR de tiempo fijo vs. Continuo..... | 311 |
| 3.1.4. Respirogramas en etapa SBR de tiempo variable..... | 355 |
| 3.1.5. Actividad específica con respecto al TRH y TRC..... | 35 |
| 3.1.6. Respirogramas estrategia de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado..... | 36 |
| 3.1.6.1. Carga orgánica y tasas de degradación..... | 38 |
| 3.2. Evaluación de la actividad microbiana en la estrategia de tiempo fijo..... | 41 |
| 3.2.1. Correlación de la actividad microbiana con el consumo de sustrato y oxígeno..... | 41 |
| 3.2.2. Variación de la actividad en las estrategias de tiempo fijo y continuo..... | 43 |
| 3.2.3. Variación de la actividad en las estrategias de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado..... | 444 |
| 3.2.4. Relación de los períodos de ayuno y tiempo de degradación..... | 455 |
| 3.2.5. Evolución de la actividad para las estrategias de flujo óptimamente alimentado y de tiempo fijo..... | 455 |
| 3.3. Evolución de un metabolito..... | 466 |
| CONCLUSIONES..... | 49 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 51 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 1.1. Vía de degradación aerobia del 4-CF (Parson y Commandeur, 1990)..... | 5 |
| Fig. 1.2. Fórmulas desarrolladas del INT | 12 |
| Fig. 2.1. Esquema de la estrategia de operación en modo continuo | 18 |
| Fig. 2.2. Arreglo del equipo SBR. Reactor (1), agitador (2), bomba de llenado (3), bomba de vaciado (4), válvula solenoide (5), rotámetro (6), válvula de presión (7), temporizador (8), calentador (9), tanque de alimentación (10), medidor de oxígeno (11), graficador (12). | 19 |
| Fig. 2.3. Arreglo del equipo en la estrategias de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado. Reactor (1), agitador (2), bomba de llenado (3), bomba de vaciado (4), válvula solenoide (5), rotámetro (6), válvula de presión (7), tarjeta de adquisición de datos (8), termostato (9), influente (10), medidor de oxígeno (11). | 20 |
| Fig. 2.4. Ley de Haldane. | 22 |
| Fig. 2.5 Panel de control..... | 23 |
| Fig. 2.6. Respirograma donde se muestran las diferentes etapas de un ciclo de operación | 25 |
| Fig. 2.7. Curva Patrón de INT-Formazán..... | 26 |
| Fig. 3.1. Cinéticas de degradación del sustrato durante la aclimatación en la estrategia de tiempo fijo . | 30 |
| Fig. 3.2. Respirogramas con adición de microorganismos aclimatados en estrategia de tiempo variable | 32 |
| Fig. 3.3. Tasas de degradación volumétrica en la estrategia de tiempo fijo en etapa de aclimatación.... | 32 |
| Fig. 3.4. Eficiencias de degradación de 4-CF en la estrategia de tiempo fijo y continuo | 33 |
| Fig. 3.5. Actividad específica en estrategia de tiempo fijo y continuo | 34 |
| Fig. 3.6. Concentración de SSV e IVL en estrategia SBR de tiempo fijo y continuo | 34 |
| Fig. 3.7. Respirograma Vs. Cinéticas de degradación en SBR de tiempo fijo Ciclo 10 y Ciclo 30..... | 36 |
| Fig. 3.8. Cinética de degradación y respirograma durante la estrategia de tiempo variable. | 37 |
| Fig. 3.9. Respirograma durante la estrategia con flujo óptimamente alimentado | 38 |
| Fig. 3.10. Comparación de OD estimado y real en estrategia con flujo óptimamente alimentado. | 39 |
| Fig. 3.11. Carga orgánica aplicada Vs. eliminada en estrategia con flujo óptimamente alimentado | 40 |
| Fig. 3.12. Evolución de la biomasa e IVL en estrategia con flujo variable | 40 |
| Fig. 3.13 Tasa de degradación específica y volumétrica en estrategia con flujo variable | 41 |
| Fig. 3.14 Evolución de la biomasa e IVL en estrategia con flujo óptimamente alimentado..... | 42 |
| Fig. 3.15 Tasa de degradación específica y volumétrica en estrategia flujo óptimamente alimentado ... | 42 |
| Fig. 3.16. Correlación de actividad y consumo de sustrato Vs. OD. SSV=1200 mg/L..... | 43 |
| Fig. 3.17. Actividad microbiana en estrategia de tiempo fijo vs. Continuo | 44 |
| Fig. 3.18. Actividad microbiana en estrategia de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado | 45 |
| Fig. 3.19. Respirograma en estrategia de tiempo fijo en un período de ayuno=14 h..... | 46 |
| Fig. 3.20. Actividad en estrategia con flujo óptimamente alimentado vs. Tiempo fijo de 24 h..... | 47 |
| Fig. 3.21. Cinética de degradación del 4-CF y metabolito en estrategia de tiempo fijo | 48 |
| Fig. 3.22 Cinética de Actividad y metabolito en estrategia con flujo óptimamente alimentado..... | 48 |

Lista de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1.1. Ejemplos de microorganismos que degradan 4-CF..... | 6 |
| Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de las diferentes técnicas utilizadas para medir la actividad microbiana | 9 |
| Tabla 2.1. Medio sintético con nutrientes y oligoelementos en los reactores | 17 |
| Tabla 2.2. Condiciones de operación del reactor continuo | 18 |
| Tabla 2.3. Condiciones de operación de la estrategia de tiempo fijo..... | 19 |
| Tabla 3.1. Valores de volatilización en reactor SBR y continuo | 29 |
| Tabla 3.2. Valores de TMCO en el sistema SBR de tiempo variable..... | 31 |
| Tabla 3.3. Valores típicos para la TMCO específica (Buitrón <i>et al.</i> , 2000)..... | 31 |
| Tabla 3.4. SSV e IVL en estrategia SBR de tiempo fijo y continuo..... | 34 |
| Tabla 3.5. Valores de q_v y TMCO para el ciclo 10 y 30 de la estrategia SBR de tiempo variable..... | 35 |

NOMENCLATURA

| | |
|-----------------|--|
| ADH | actividad total de deshidrogenasa |
| ADHe | ADH por extracción |
| ADHc | ADH por cuenta microscópica de cristales |
| ATP | adenosín trifosfato |
| B _{va} | carga orgánica aplicada, kg DQO/m ³ •d |
| B _{ve} | carga orgánica eliminada kg DQO/m ³ •d |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| COT | carbono orgánico total |
| CPU | central processing unit |
| 4-CF | 4-clorofenol |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| FDA | diacetato de fluoresceína |
| DO | densidad óptica, nm |
| DQO | demanda química de oxígeno, mg/L |
| IVL | índice volumétrico de lodos, ml/g |
| INT | cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5 fenil tetrazolio |
| INTF | INT-formazán |
| NA | naranja de acridina |
| O ₂ | oxígeno |
| OD | oxígeno disuelto, mg O ₂ /L |
| OUR | tasa de respiración, mg O ₂ /L•min |
| Q | flujo de agua, L/h |
| pH | potencial de hidrógeno |
| PTAR | plantas de tratamiento de agua residual |
| q _x | tasa de degradación específica, mg 4-CF/g SSV•h |
| q _v | tasa de degradación volumétrica, mg 4-CF/L•h |
| RNA | ácido ribonucleico |
| S | concentración de sustrato en el reactor, mg 4-CF/L |
| S _{en} | concentración de sustrato en el influente, mg 4-CF/L |
| S _{ef} | concentración de sustrato en el efluente, mg 4-CF/L |
| SBR | reactor discontinuo secuencial |

| | |
|-------------------|--|
| SST | sólidos suspendidos totales, mg/L |
| SSV | sólidos suspendidos volátiles, mg/L |
| SSV _{ef} | sólidos suspendidos volátiles del efluente, mg/L |
| STE | sistema de transporte de electrones |
| T _a | tiempo de ayuno, h |
| T _c | tiempo de ciclo, h |
| T _d | tiempo de degradación, h |
| T _{Ll} | tiempo de llenado, h |
| T _m | tiempo muerto, h |
| T _r | tiempo de reacción, h |
| T _s | tiempo de sedimentación, h |
| TMCO | tasa máxima de consumo de oxígeno |
| TRC | tiempo de retención celular, días |
| TRH | tiempo de retención hidráulico, h |
| TTC | cloruro de trifeniltetrazolio |
| T _v | tiempo de vaciado, h |
| V | volumen de agua en el reactor, L |
| V _I | volumen de agua intercambiado, L |
| X | concentración de biomasa en el reactor, mg SSV ó SST/L |
| μm | micromoles |
| μ _{max} | tasa máxima de crecimiento específico, h ⁻¹ |
| f | factor de conversión a kg de DQO m ⁻³ d ⁻¹ de mg 4-CF L ⁻¹ h ⁻¹ igual a 0.04 |
| η | eficiencia de degradación, % |

RESUMEN

Los procesos de tratamiento de agua residual tienen limitaciones en cuanto a eficiencias de remoción y requieren de grandes volúmenes de reactor para biodegradar los tóxicos. Por esta razón, es necesario el empleo de nuevas estrategias de operación y control en procesos biológicos que muestren mejores resultados, permitiendo que el tiempo de degradación de las sustancias tóxicas sea mínimo, traducándose en un rendimiento óptimo de las plantas. Es posible mejorar la eficiencia de un sistema de tratamiento biológico manteniendo la actividad microbiana tan alta como sea posible. Sin embargo, es indispensable la medición en línea de la concentración de sustrato y actividad microbiana para el control de la planta, lo cual puede resultar difícil y costoso. En el presente trabajo se realizan mediciones de actividad microbiana por medio de métodos bioquímicos, correlacionando éstos con la medición en línea del oxígeno disuelto.

Se utilizó un proceso biológico para tratar 4-clorofenol. Para ello se comparó un proceso discontinuo secuencial (SBR) con un proceso continuo por lodos activados. El proceso SBR funcionó bajo tres diferentes estrategias de operación: 1) Tiempos fijos, 2) Tiempos variables y 3) Estrategia con flujo óptimamente alimentado donde el sustrato fue estimado a partir de la concentración de oxígeno disuelto. En esta parte el flujo del agua de entrada se controló para mantener la tasa de degradación en su valor máximo. Se observó que en general el proceso discontinuo presentó una mejor operación que el proceso continuo ya que la actividad microbiana se incrementó en 13% en el sistema SBR, operado bajo la estrategia de tiempo fijo, en comparación con el reactor continuo. Los valores de actividad microbiana mostraron un notable incremento en la estrategia con flujo óptimamente alimentado ($166 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$) mientras que en la estrategia de tiempo variable ($99 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$) y de tiempo fijo ($112 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$) los resultados son muy similares. Se encontró que fue factible la medición en línea de la concentración de 4-clorofenol a través de la concentración de oxígeno disuelto para controlar el sistema. En la estrategia de tiempo variable se utilizó un algoritmo de control para conocer el final de la reacción, obteniéndose cargas orgánicas máximas eliminadas de $2.6 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{d}$ cuatro veces más a las obtenidas durante la estrategia de tiempo fijo ($0.65 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{d}$). Mientras que la estrategia con flujo óptimamente alimentado, la carga orgánica máxima eliminada fue de $4 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{d}$ con tiempos de degradación inferiores a 1 h para una concentración de 100 mg/L de 4-clorofenol.

Palabras clave: Actividad microbiana, SBR, 4-Clorofenol, INT, oxígeno disuelto.

INTRODUCCIÓN

El incremento exponencial de la población humana y el desarrollo industrial en los últimos tiempos ha traído como consecuencia altos niveles y formas de contaminación, lo cual se manifiesta con un efecto destructivo en el planeta y en todas sus formas de vida.

Hoy en día, México se enfrenta al gran problema de la contaminación de sus fuentes de abastecimiento de agua, debido a la gran cantidad de aguas residuales que son arrojadas a los ríos, lagos, lagunas, acuíferos y aguas marinas sin ningún tratamiento. Este proceso acumulativo de contaminación ha dado como resultado la degradación parcial o total de diversos cuerpos de agua.

Se estima que la descarga total de aguas residuales municipales e industriales en nuestro país asciende a 260 m³/s. De estos el 40% proviene del sector industrial, caudal que constituye el efluente más contaminante y heterogéneo.

En particular las aguas de desecho industriales que contienen fenoles, representan un gran problema para el ecosistema; su creciente producción ha llevado a la creación de nuevas estrategias para su tratamiento. En este sentido se ha visto que los compuestos orgánicos tóxicos se pueden eliminar a altas concentraciones en los reactores discontinuos, los cuales son un método biológico en donde los microorganismos mineralizan el contaminante (Buitrón y Capdeville, 1995). A pesar de que existen otros métodos como los fisicoquímicos, éstos únicamente remueven el contaminante sin llegar a degradarlo, ya que pasa a un polímero el cual debe ser confinado adecuadamente para cumplir con las normas ambientales.

Existe la necesidad de aumentar la eficiencia de degradación de compuestos tóxicos en los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales industriales y además minimizar los costos de construcción y operación. Para ello resulta conveniente automatizar las plantas con equipos que permitan que los procesos de tratamiento sean más eficaces al contar con estrategias de control adecuadas.

Para automatizar un sistema discontinuo es necesario tener una estrategia de control y la medición en línea de las variables de proceso. También es necesario conocer la actividad de los microorganismos para evaluar su funcionamiento. Por esta razón, en el presente trabajo se presenta como alternativa realizar un seguimiento de la actividad microbiana en un reactor discontinuo, a través de métodos bioquímicos por medio de la actividad de deshidrogenasa usando el método del cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5 fenil tetrazolio (INT). La actividad también será medida a través de métodos respirométricos para compararlo con los resultados obtenidos por INT. Para este fin, el trabajo se estructura de la siguiente manera.

En el Capítulo 1 de generalidades, se habla acerca de: a) las características de los compuestos xenobióticos, b) la aclimatación de los microorganismos para la degradación de estos compuestos, c) las características de los procesos SBR y d) las técnicas para determinar la actividad microbiana, así como su relevancia en el proceso SBR.

Una vez establecido el marco teórico de esta investigación, se indica en el Capítulo 2, la metodología empleada en el desarrollo experimental. Lo cual comprendió las etapas de aclimatación y la comparación entre un reactor operado en continuo y otro operado de manera discontinua secuencial o SBR (sequencing batch reactor) bajo 3 diferentes estrategias de operación y control. Estas últimas

fueron: estrategia de tiempo fijo, estrategia de tiempo variable y estrategia con flujo óptimamente alimentado. En la primera estrategia el tiempo de reacción es fijado de acuerdo con la experiencia del operador; en la segunda se utiliza la relación que existe entre el consumo de sustrato y la concentración de oxígeno disuelto, donde la etapa de reacción es concluida después de que el oxígeno disuelto pasa por un mínimo. Y por último, la estrategia con flujo óptimamente alimentado se basa en la estimación de la concentración de sustrato a partir del oxígeno disuelto. Durante esta estrategia el flujo del agua de entrada se controló para mantener la tasa de degradación y actividad microbiana en un máximo.

En el Capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos durante la fase de aclimatación y las diferentes estrategias empleadas en los reactores. Cada una de las estrategias de operación presenta las características de la biomasa, tiempos de degradación, tasas de degradación, eficiencias de remoción, actividad microbiana, respirogramas, entre otras mediciones, así como la influencia de los períodos de ayuno. Aunado a esto se observa la aparición de un metabolito durante la degradación del compuesto.

Capítulo 1

ANTECEDENTES

1. Tratamiento de Aguas Residuales Industriales

Existe un problema ambiental importante de contaminación de agua, y éste se ha convertido en un problema mundial poco fácil de resolver. Diversas metodologías han tratado de disminuir los contaminantes del agua, muchas de ellas han tenido problemas en su implementación o al cumplir las normas ambientales establecidas. Los sistemas de tratamiento biológicos son una buena alternativa para el tratamiento de aguas residuales industriales (Buitrón *et al.*, 2005) especialmente en los últimos años ha sido de gran interés el uso de estos procesos sobre todo si se trata de degradar un compuesto específico en lugar de compuestos complejos o una mezcla desconocida (Seigneur *et al.*, 1993).

1.1. Compuestos xenobióticos

El término “xenobiótico” significa extraño para la biota. En el sentido estricto son compuestos fabricados o introducidos por el hombre, frecuentemente por procesos industriales que involucran químicos sintetizados, que al ser liberados al medio ambiente se convierten en contaminantes produciendo un efecto dañino para el ecosistema. El tipo y magnitud de los efectos indeseables dependen principalmente de la toxicidad del compuesto y de la concentración del mismo. Los compuestos xenobióticos son compuestos recalcitrantes (totalmente resistentes) o persistentes que no se degradan rápidamente (Nordin, 2004).

La persistencia de un compuesto en el ambiente es debido a: 1) ausencia de microorganismos con la capacidad de degradar el compuesto; 2) condiciones ambientales desfavorables para la biodegradación (temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, presencia de químicos inhibidores y organismos competidores); 3) concentraciones desfavorables del sustrato (el contaminante puede estar presente en alta concentración, lo cual produce inhibición, o en baja concentración, obstruyendo la acción de degradación de las enzimas) (Fetzner, 1994).

Algunas de las razones por las cuales un compuesto orgánico xenobiótico es recalcitrante a la biodegradación son: 1) estructura química del compuesto y sustituciones inusuales (tales como átomos de carbono terciarios y cuaternarios); 2) anillos aromáticos altamente condensados y 3) alto peso molecular (en el caso de polietileno y otros plásticos) (Moreno y Buitrón, 2004; Atlas, 1993).

1.1.1. Clorofenoles

Son compuestos extremadamente tóxicos y potencialmente carcinógenos y teratógenos (Nakhla, 1993), que debido a su toxicidad, concentración, y persistencia, son causa de preocupación por sus efectos en la calidad de vida. A pesar del conocimiento que se tiene acerca de la degradación de los clorofenoles, aún siguen encontrándose comúnmente en las aguas residuales.

Actualmente se utilizan en la industria petroquímica, en la fabricación de fungicidas y de herbicidas. La presencia de estos compuestos en los medios naturales (cuerpos de agua y mantos freáticos) procede también de los subproductos del blanqueamiento de pulpa, desinfección de agua, o incineración de desperdicios y también pueden formarse como subproducto del rompimiento químico y biológico de los herbicidas fenoxi tales como el 2,4- ácido diclorofenoxiacético (Buitrón *et al.*, 2005; Nordin, 2004).

Los clorofenoles son más tóxicos que los fenoles debido a la presencia de átomos de cloro en la molécula orgánica, siendo más difícil de biodegradar la molécula al aumentar el número de átomos de cloro.

Debido a su toxicidad, tendencia a acumular y la persistencia en el ambiente, la contaminación de clorofenoles en suelo y agua es un grave problema, y la remediación es en estos momentos imprescindible.

El término de biodegradación implica la degradación molecular de una sustancia, frecuentemente en un medio acuoso, que resulta de acciones complejas de organismos vivos. La biodegradación permite la remoción de los compuestos xenobióticos del medio transformándolos en productos minerales y biomasa. Es bien conocida la biodegradación de los clorofenoles. Una de las ventajas de esta técnica es su bajo costo comparado con otras técnicas de limpieza tradicionales tales como la incineración de residuos. La sensibilidad de las bacterias hacia los clorofenoles varía dependiendo del tipo de compuesto y de las especies bacterianas involucradas. Los procesos de tratamiento biológico para estos contaminantes necesitan ser diseñados de manera cuidadosa y supervisados continuamente para prevenir efectos tóxicos en los microorganismos responsables de la degradación (Nordin, 2004).

Se ha demostrado que la glucosa y el fenol pueden ser utilizados como cosubstratos de crecimiento en la biodegradación cometabólica del 4-CF (Tarighian, *et al.*, 2003).

Algunas de las máximas concentraciones de 4-CF degradadas han sido reportadas por Buitrón *et al.*, (2003) con concentraciones de 400 mg/L dentro de un reactor SBR automatizado.

1.1.2. Ruta metabólica de degradación del 4-Clorofenol (4-CF)

Los catecoles son los productos iniciales de la oxidación de hidrocarburos aromáticos. En la mayoría de los microorganismos, la apertura del anillo se da a través de dos vías, llamadas, orto y meta. En el caso orto (intradiol), el rompimiento del anillo se da entre los dos grupos hidroxilo del catecol, mientras en la vía meta (extradiol), el rompimiento puede ocurrir al lado de uno de los grupos hidroxilo. La vía de rompimiento depende de muchos factores, como el tipo de hidrocarburo aromático, las especies bacterianas, y el modo de inducción (fig. 1.1).

Los productos del rompimiento son posteriormente metabolizados a intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos. El rompimiento orto lleva a la formación de succinil-CoA y acetyl-CoA. Y la vía de rompimiento meta del catecol lleva a la formación de ácido pirúvico, acetaldehído, oxaloacetato, malato o succinato (Nordin, 2004).

Se considera completa la biodegradación de los compuestos aromáticos halogenados cuando el anillo es roto para generar dióxido de carbono, agua y biomasa y el halógeno orgánico es mineralizado. La degradación de 4-CF se ha estudiado ampliamente, y las vías de degradación están bien caracterizadas. Se han aislado diversas bacterias aerobias y hongos capaces de degradar 4-CF, en la tabla 1.1. se indica la diversidad de microorganismos capaces de degradarlo y sus mecanismos de degradación.

Cuando por condiciones desfavorables, el rompimiento del anillo es por vía meta, se genera un metabolito amarillo llamado ácido semialdehído 5-cloro-2-hidroximucónico, el cual es un inhibidor de los microorganismos (Soto, 1999).

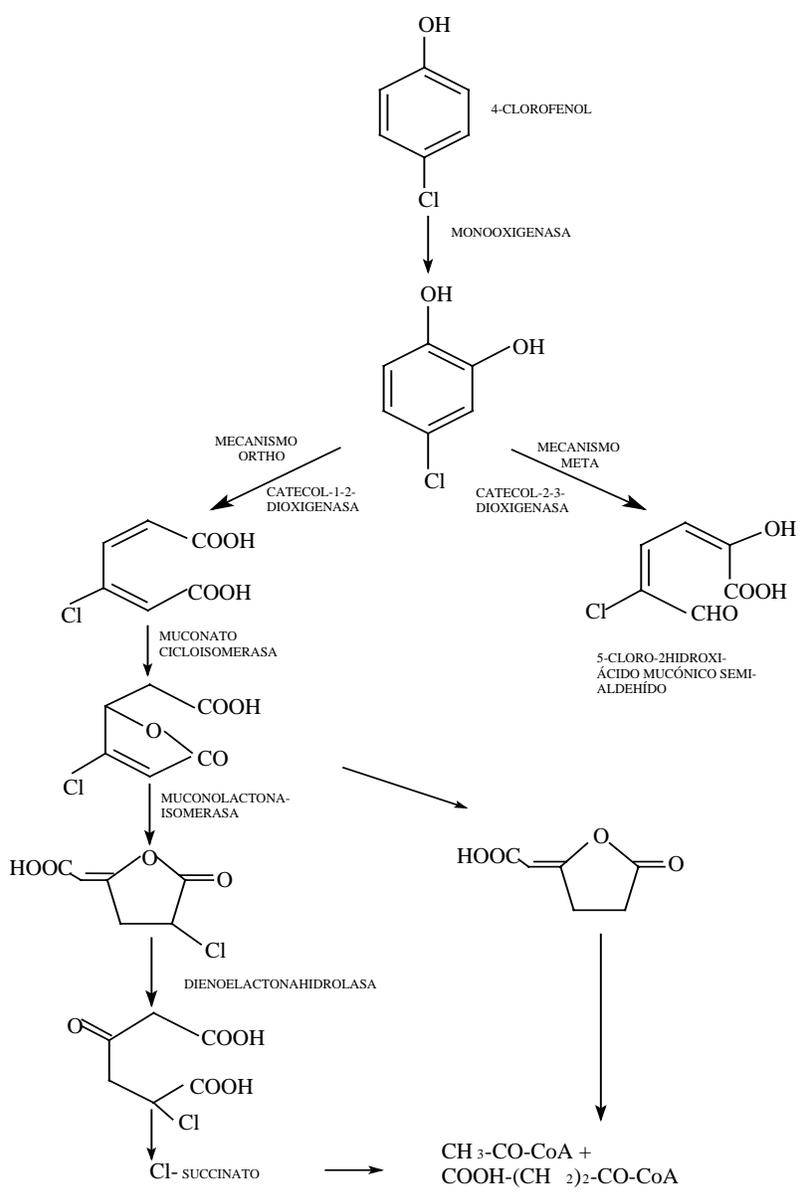


Figura 1.1. Vía de degradación aerobia del 4-CF (Parson y Commandeur, 1990).

Tabla 1.1. Ejemplos de microorganismos que degradan 4-CF

| Microorganismo | Mecanismo | Referencia |
|--|-----------|---|
| <i>Rhodococcus</i> sp. cepas An117 y An213 | A | Inn <i>et al.</i> , (1989) |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> 1cp | A | Gorlatov <i>et al.</i> , (1989) |
| <i>Azotobacter chroococcum</i> cepa MSB1 | A | Balajee y Mahadevan (1990) |
| <i>Arthrobacter</i> sp. | - | Kramer y Kory (1992) |
| <i>Alcaligenes</i> sp. cepa A7-2 | A | Schwien y Schmidt (1982) |
| <i>Candida tropicalis</i> | A | Ivoilov <i>et al.</i> , (1983) |
| <i>Candida maltosa</i> | A | Polnisch <i>et al.</i> , (1992) |
| <i>Penicillium frequentans</i> Bi 7/2 | A | Hofrichter <i>et al.</i> , (1993, 1994) |
| <i>Acinetobacter</i> , <i>Brevibacillus</i> y <i>Pseudomonas</i> | - | Moreno y Buitrón (2004) |

A: Hidroxilación a clorocatecol con deshalogenación del anillo bencénico

1.2. Aclimatación

Al describir a *grosso modo* el problema del tratamiento del agua residual industrial, se debe enfatizar primeramente la necesidad de aclimatar la biomasa de cultivos mixtos aerobios, especialmente si se trata de compuestos xenobióticos (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004).

La aclimatación es el período en el cual se hace perceptible la biodegradación de un compuesto, lográndose sólo cuando la estructura del compuesto puede ser atacada por las enzimas sintetizadas por los microorganismos involucrados, el cual puede considerar una adaptación o período lag. Puede definirse como el intervalo de tiempo entre la adición de un químico en el ambiente y la detección de su pérdida (Alexander, 1999).

Esta aclimatación se ha detectado para diversos compuestos como son: herbicidas: endotal, monuron, insecticidas: azinfosmetil, metil paration, fungicidas: vinclozolin, iprodion, hidrocarburos aromáticos policíclicos: naftaleno, antraceno y otros: Fenol, 4-CF, 4-Nitrofenol, Clorobenceno, 1,2- y 1,4-diclorobenceno, 3,5-ácido diclorobenzoico y difenilmetano (Alexander, 1999).

El proceso de aclimatación conlleva varios mecanismos de los microorganismos como son: (a) proliferación de poblaciones pequeñas especializadas; (b) adaptación a la presencia de toxinas; (c) combate a la depredación por protozoarios; y (d) aparición de un nuevo genotipo, que les permita sobrevivir.

Cuando los cultivos mixtos son aclimatados a un nuevo o inusual químico, la duración de esta etapa va de pocas horas a varias semanas o meses dependiendo del tipo y concentración del compuesto, cantidad y calidad del inóculo utilizado, presencia de enzimas inducibles, así como de las condiciones

ambientales (temperatura, pH, aireación, concentración de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes) (Moreno y Buitrón, 2004).

Se ha comprobado que los cultivos aclimatados incrementan la actividad microbiana con respecto a la degradación de los tóxicos orgánicos si estos cultivos están adecuadamente inducidos (Buitrón y Capdeville, 1995), llegando a degradar concentraciones de hasta 1400 mg/L (Buitrón *et al.*, 2003).

1.2.1. Mecanismos enzimáticos

Los microorganismos producen muchas enzimas a pesar de que sus sustratos no estén presentes. Estas son conocidas como enzimas constitutivas. En contraposición, las enzimas inducibles se sintetizan en cantidades apreciables solo cuando el sustrato, o una sustancia química estructuralmente similar, está presente. Muchas de las enzimas involucradas en la degradación de compuestos sintéticos son inducibles, por ejemplo, muchas de las dehalogenasas que remueven cloro de las moléculas halogenadas (Alexander, 1999).

Existen microorganismos capaces de degradar compuestos aromáticos sintéticos. Durante el metabolismo aerobio de estos compuestos las bacterias expresan una batería de sistemas enzimáticos para convertir el sustrato a estructuras anilladas desestabilizadas dihidroxiladas, como los catecoles. El catecol es un intermediario en la degradación de compuestos como el benzoato, naftaleno, salicilato y fenol. Los catecoles sustituidos son intermediarios en el catabolismo de derivados metilados y clorados de estos compuestos (Nordlund *et al.*, 1993).

1.2.2. Cambios genéticos

Los microorganismos sufren cambios genéticos como resultado de la aparición de un mutante en la población o la transferencia de información genética de una especie a otra. Tales eventos se dan a baja frecuencia, por lo que solo algunas células en una población poseerán un nuevo genotipo con las nuevas características fenotípicas. Sin embargo, si el nuevo genotipo posee características fisiológicas que le den ventajas selectivas, éste se multiplicará. El poseer enzimas que degradan un sustrato nuevo, como una molécula sintética, y que proporciona energía a las células que las sintetizan es sin lugar a dudas una ventaja selectiva si otros miembros de la comunidad microbiana son incapaces de crecer a expensas de esa molécula. Existe poca evidencia experimental de mutaciones que suceden durante la aclimatación, debido principalmente a la ocurrencia fortuita de las mismas (Alexander, 1999).

La transferencia horizontal de genes es la mayor fuente de evolución bacteriana (Ochman *et al.*, 2000; Koonin *et al.*, 2001). La secuencia genómica ha mostrado que las bacterias contienen un mosaico de genes adquiridos horizontalmente, y la proporción de genes de origen externo puede llegar hasta un 17% (Ochman *et al.*, 2000). Estos genes pueden ser transferidos por transposones (Tan, 1999), siendo el vehículo más común de transferencia de genes los plásmidos (Alexander, 1999).

Se sabe que las vías metabólicas de los compuestos xenobióticos evolucionan por el reclutamiento de enzimas de otras vías metabólicas y de alteraciones de los correspondientes genes por mutaciones y recombinaciones (Coopley, 2000). La transferencia de genes involucrados en la biodegradación se ha mostrado que tiene lugar en medios conteniendo dos diferentes bacterias. Por ejemplo, la capacidad de degradar clorocatecoles puede ser transferida de una cepa de *Pseudomonas* a otra cepa de *Alcaligenes*, y el nuevo genotipo puede metabolizar 2-, 3-, y 4-CF, una propiedad que ninguna de las bacterias madres posee (Schwien y Schmidt, 1982). Igualmente, la transferencia de genes que codifican los pasos del metabolismo de 3-Clorobenzoato puede darse entre cepas diferentes

de *Pseudomonas* (Rubio *et al.*, 1986). Sin embargo, todavía no se ha confirmado la transferencia de genes que conducen a la evolución de nuevos genotipos involucrados en la biodegradación en ambientes naturales o muestras ambientales que han sido llevadas al laboratorio (Alexander, 1999).

Muchas vías catabólicas aromáticas están codificadas en plásmidos, y en algunos casos se han encontrado total o parcialmente codificadas en grandes transposones (Nordlund *et al.*, 1993).

1.2.3. Multiplicación de microorganismos especializados

Wiggings *et al.*, (1987) propusieron que hay una selección y multiplicación de microorganismos especializados durante la fase de aclimatación.

Se han identificado algunos microorganismos en la degradación de uno o más de los siguientes compuestos: fenol, 4-CF, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol (*Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Brevibacillus* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, *Pseudomonas putida*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Chryseomonas luteola*) y dos micobacterias (Buitrón *et al.*, 1997; Moreno y Buitrón, 2004; Nordin, 2004). Estos microorganismos especializados adquieren la habilidad de degradar otros compuestos análogos al químico al cual fueron aclimatados. Por ejemplo, la aclimatación de los organismos que metabolizan fenol en el agua, dará como resultado un aumento del metabolismo de 4-CF, 3-aminofenol y m-cresol (Shimp y Pfaender, 1987).

1.3. Actividad Microbiana

Se puede definir la actividad microbiana como el conjunto de procesos metabólicos, al degradar un sustrato, que llevan a cabo los microorganismos para sus procesos vitales (mantenimiento, crecimiento, respiración y motilidad celular).

En los sistemas de remoción biológica de nutrientes, la tasa de remoción de nutrientes es una función del metabolismo microbiano y/o crecimiento. Los sustratos son convertidos a productos por reacciones catalizadas a través de la actividad microbiana.

Podemos clasificar a los microorganismos aerobios en tres tipos dependiendo de su estado fisiológico:

❖ Microorganismos activos

Son aquellos que consumen oxígeno. Se dividen en:

- Viables. Aquellos microorganismos con funciones celulares básicas como son: reproducción, actividad metabólica e integridad de la membrana.
- No Viables. Aquellos cuyo material genético pudo ser dañado y por ello pueden perder su capacidad de multiplicarse, y por lo tanto de biodegradar.
- Estado latente. Estado reversible de baja actividad metabólica, sus formas esporuladas son debidas a un largo período de ayuno o condiciones ambientales adversas en el cual pueden persistir sin reproducirse.

❖ Microorganismos muertos

No presentan actividad metabólica, su membrana celular ha sido dañada aunque sus estructuras principales pueden estar presentes.

1.3.1. Medidas para determinar la Actividad Microbiana

En un sistema biológico de tratamiento de agua es necesario mantener la actividad microbiana tan alta como sea posible. Para esto, se necesita una estrategia de control del proceso.

La actividad microbiana puede llegar a bajar debido a la concentración de los tóxicos a los que fueron aclimatados, ya que concentraciones altas inhiben a los microorganismos, o en el caso de una mezcla compleja retardan la degradación de otros compuestos presentes. También al eliminar de la alimentación el tóxico al que fueron adaptados los microorganismos aclimatados, disminuye su capacidad de degradación (Buitrón *et al.*, 1994).

La actividad microbiana se puede medir de manera directa o indirecta a través de diversas técnicas como son:

- Contenido de Adenosín Trifosfato (ATP)
- Hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA)
- Cuenta directa de naranja de acridina (NA)
- Cuenta heterótrofa en placa
- Citometría de flujo
- Métodos respirométricos de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono
- Actividad de deshidrogenasa por medio del INT

En la tabla 1.2 se presentan las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos.

Tabla 1.2. Ventajas y desventajas de las diferentes técnicas utilizadas para medir la actividad microbiana

| Técnicas | Desventajas | Ventajas |
|--|---|---|
| Adenosín Trifosfato (ATP) | Presenta interferencias debidas a su sensibilidad. No muestra actividad real. | Expresa biomasa viable (Frolund, 1995). |
| Diacetato de Fluoresceína (FDA) | Sobrestima biomasa viable. Sin correlación con actividad o biomasa (Jorgensen, 1992). No penetra la pared de las bacterias Gram-. | Se enfoca en microorganismos saprófitos. |
| Naranja de Acridina (NA) | No refleja actividad (Bitton, 1993). No detecta ultramicrobacterias. Reacciona con partículas no biológicas. | Cuantifica microorganismos. |
| Citometría de Flujo | Requiere equipo costoso (Jansson, 1997) y personal calificado. | Rápida y poco laboriosa. |
| Cuenta Heterótrofa en Placa | Baja estimación de biomasa para muestras ambientales. Mide abundancia. Consume mucho tiempo (Andreottola <i>et al.</i> , 2002) | Comúnmente utilizada. Aisla microorganismos específicos. |
| Respirometría | Sensibilidad de la membrana a perturbaciones ambientales. | Expresa cantidad de biomasa activa. Medición en línea sencilla y rápida. |
| Cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio (INT) | Procedimiento complejo, reactivos peligrosos y de alto costo. No mide especificidad (Andreottola <i>et al.</i> , 2002) | Sencillo, sensible y mide actividad respiratoria (Stubberfield y Shaw, 1990). Correlación con el consumo de oxígeno (Chang-Won <i>et al.</i> , 1994). |

La técnica de producción de ATP expresa la cantidad de biomasa viable pero es extremadamente sensible y no muestra una actividad real (Karl, 1993).

El FDA es un sustrato no fluorescente el cual es hidrolizado por enzimas intra y extracelulares tales como esterasas, proteasas, hidrolasas y lipasas, para dar fluoresceína la cual permanece en las células y puede cuantificarse por espectrofotometría (Inbar *et al.*, 1991; Ryckeboer *et al.*, 2003). Estas enzimas están relacionadas con la descomposición de tejidos, por ello se enfoca en microorganismos saprófitos. Se ha observado que esta técnica sobreestima la biomasa (Jorgensen, 1992). Además, el FDA difícilmente penetra la pared de las bacterias Gram-.

La cuenta total de bacterias con NA es un método popular para determinar el número de microorganismos en muestras ambientales vía microscopía de epifluorescencia. El NA se une a los ácidos nucleicos con el complejo ácido ribonucleico (RNA) fluoresciendo rojo-naranja (células activas) mientras que el complejo ácido desoxirribonucleico (DNA) fluoresce verde (células inactivas). Este método da información en número y biomasa de los microorganismos establecidos, sin reflejar necesariamente la actividad microbiana (Bitton, 1993; Rebillard y Torre, 1993). En el caso de las ultramicrobacterias tienen poco DNA para su detección. El DNA proveniente de otro material biológico puede también interferir con la imagen (Jansson, 1997). Aunado a todo esto el NA puede reaccionar con partículas no biológicas (Rebillard y Torre, 1993).

La cuenta heterótrofa en placa es el método más común para la estimación de la abundancia de células viables en muestras ambientales, pero no detecta a los microorganismos en período latente o con períodos lag mayores a los de incubación. La formación de colonias en el medio de cultivo puede ser inhibida por interacciones antagonistas con colonias vecinas o por la competencia de nutrientes, así como también es afectada por la selectividad del medio y condiciones de cultivo que conducen a la baja estimación de su número (0.1-10% eficiencia) (Jansson, 1997).

Existe una controversia entre investigadores con respecto a las “células viables pero no cultivables” (Roszak y Colwell, 1987), esto es particularmente importante para dar un seguimiento a los microorganismos activos metabólicamente y/o potencialmente infecciosos. Sin embargo, a pesar de sus inconvenientes el medio puede ser diseñado para seleccionar organismos o grupos específicos que degradan compuestos xenobióticos, nitrato o celulosa, añadiendo estos compuestos en el medio como única fuente de carbono y energía o variando las condiciones particulares de cultivo. Además, es posible añadir inhibidores para seleccionar los microorganismos deseados (Jansson, 1997).

Finalmente, esta prueba consume mucho tiempo y da poca información del nivel nutricional o evidencia de toxicidad que puede afectar las actividades metabólicas y puede ser crucial en estudios de ecología microbiana.

La citometría de flujo es una técnica de alta velocidad, que nos proporciona análisis de datos multivariantes, realiza una clasificación celular siendo específica y es menos laboriosa que el NA, pero el equipo utilizado es muy costoso y necesita de personal calificado para operar (Andreottola *et al.*, 2002; Jansson, 1997).

La técnica de respirometría por cuantificación de O₂ y CO₂, presenta muchas ventajas sobre las técnicas convencionales. La cantidad de CO₂ producido o de O₂ consumido por los microorganismos activos metabólicamente es proporcional al sustrato mineralizado. El equipo utilizado para medir O₂ es menos sofisticado que el de CO₂ y las mediciones se obtienen rápidamente. Una de sus desventajas es la sensibilidad de la membrana a perturbaciones ambientales. Diversos autores han propuesto, como

estrategia de control en línea de lodos activados, la medida de consumo de oxígeno (Buitrón *et al.*, 2003, Rozzi *et al.*, 2003).

El método de INT ha sido utilizado desde hace algunos años para medir la actividad microbiana con el fin de realizar un seguimiento del funcionamiento de lodos activados (Kim *et al.*, 1994). El método de INT tiene correlación con el consumo de oxígeno (Chang-Won *et al.*, 1994) y es una técnica sencilla y sensible para determinar la actividad microbiana de organismos en cultivos mixtos (Stubberfield y Shaw, 1990). El INT (soluble) es transformado a INT-formazán (INTF, insoluble) el cual es depositado en las células activas como cristales intracelulares oscuros que se cuantifican por colorimetría después de su extracción con metanol (Kim *et al.*, 1994).

1.3.2. Actividad Deshidrogenasa

Las deshidrogenasas son enzimas intracelulares de oxido-reducción que participan en el transporte de electrones de los sustratos orgánicos hasta los aceptores finales de electrones. En el metabolismo aerobio el aceptor final de electrones es el oxígeno y por esto la tasa de consumo de oxígeno refleja la actividad total deshidrogenasa (ADH). Los colorantes de óxido-reducción que compiten con el oxígeno en el sistema de transporte de electrones (STE) han sido utilizados para medir ADH. Estos incluyen azul de metileno, resazurina y sales de tetrazolio como el INT y el cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).

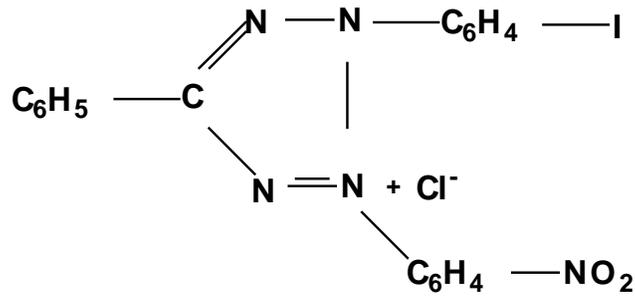
Las sales de tetrazolio en estado oxidado son solubles en agua (por el carácter catiónico del anillo de tetrazolio heterocíclico) además de ser amarillas o incoloras, y bajo condiciones de moderada reducción se convierten en sales de formazán intensamente coloreadas (insolubles en agua por su neutralidad) (Iskiyama *et al.*, 1993) que pueden extraerse con un solvente orgánico y medirse espectrofotométricamente a 480-490 nm. Estas sales se caracterizan por un heterociclo de 4 átomos de nitrógeno y 1 átomo de carbono, y éste último se abre biológicamente. Como el formazán se deposita en las células, es posible contar los organismos activos metabólicamente.

El INT es un compuesto que ha sido ampliamente utilizado para la medición de la actividad microbiana en aguas, sedimentos y lodos activados (Johnsen *et al.*, 2002; Katsifas, *et al.*, 2000), y sobre todo para evaluar la toxicidad de los compuestos xenobióticos (Johnsen, *et al.*, 2002). La prueba se realiza espectrofotométricamente después de extraer la sal de formazán reducida en las células metabólicamente activas de una muestra, actuando como aceptor externo para detectar la actividad microbiana. Esta medida de actividad se basa en la reducción de las sales de tetrazolio solubles en agua e incoloras a cristales rojos de formazán insolubles.

Este método se basa en el acoplamiento del complejo de enzimas de succinato deshidrogenasa que oxida succinato a fumarato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos para el STE de la cadena respiratoria lo cual es una medida de la actividad metabólica. La actividad microbiana puede estimar la capacidad de oxidación de un sistema de tratamiento biológico (Manias, 1991).

El INT tiene bajo potencial redox (+90mV) que lo hace un buen competidor frente al oxígeno (+560mV) por los electrones en el STE y esto elimina la interferencia con oxígeno en el ensayo (Manias, 1991; Bauer, 1991). El método de ADH puede determinarse por extracción de INTF (ADHe) o por cuenta microscópica de cristales de INTF (ADHc) (Chang-won, *et al.*, 1994) ésta última mide microorganismos libres.

Cloruro de p-iodonitrofenil tetrazolio



p-iodofenil-p-nitrofenil-fenil-formazan

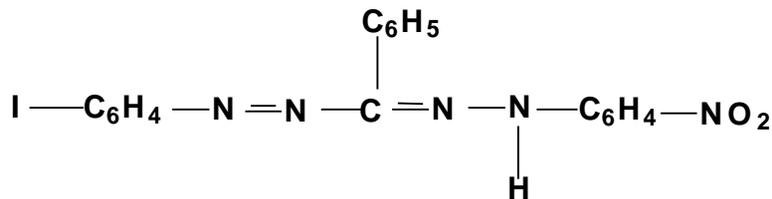


Figura 1.2. Fórmulas desarrolladas del INT

1.3.3. Respirimetría

La respirometría es la medida e interpretación de la tasa de respiración (OUR; oxygen uptake rate) de la biomasa presente en los lodos activados. La tasa de respiración es la cantidad de oxígeno por unidad de volumen y tiempo que es consumido por los microorganismos en un sustrato orgánico. Para medir esta cantidad de oxígeno consumida se utiliza un instrumento llamado respirómetro el cual es económico, confiable y no requiere de personal especializado para su operación. Esta técnica sirve para controlar el proceso de lodos activados debido a que la tasa de respiración está directamente unida a dos importantes procesos bioquímicos que deben controlarse en una planta de tratamiento de aguas residuales: actividad microbiana y consumo de sustrato (Yoong *et al.*, 2000; Adani *et al.*, 2003), los cuales son factibles sensor por otros métodos pero resultan costosos o laboriosos.

Esta metodología se basa en la relación cuantitativa entre el consumo de oxígeno, el consumo de sustrato y el crecimiento de la biomasa (microorganismos aerobios). Esta relación permite el uso de los datos del consumo de oxígeno como una medida alterna para los datos de remoción de sustrato.

Actualmente, los respirómetros se utilizan en las industrias para evaluar el impacto de desechos industriales en los procesos de tratamiento de aguas residuales municipales (Nguyen *et al.*, 2000).

1.4. Sistema SBR

El reactor SBR (Sequencing batch reactor) es un proceso de cultivos mixtos de biomasa en suspensión y se caracteriza por un vaciado y llenado periódico. La forma frecuente de operación de un SBR consiste en llenar el tanque hasta su volumen máximo utilizando el mayor flujo de agua y luego esperar un tiempo fijo suficientemente largo para asegurar que la concentración de tóxicos ha llegado a su nivel deseado. En la práctica en las plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) se utiliza

normalmente un ciclo de 24 h para la reacción. Cada tanque efectúa las funciones de igualación, aireación y decantación en una secuencia con respecto al tiempo.

El sistema SBR funciona normalmente en cinco fases: 1) llenado, 2) reacción, 3) decantación, 4) vaciado y 5) tiempo muerto. En la fase de llenado el influente tiene una homogénea distribución de biomasa y sustrato, ya que durante esta etapa puede estar en funcionamiento la aireación que permite la respiración de los microorganismos y la adecuada agitación. En la fase de reacción, el reactor continúa con la aireación y agitación, y es aquí donde los microorganismos degradan casi en su totalidad los contaminantes. El tiempo de duración de esta fase depende de la experiencia del operador y/o está basado en pruebas piloto. Una vez concluida esta fase se inicia la decantación, en la cual el volumen contenido permanece en reposo durante el tiempo que permita la sedimentación de la biomasa suspendida. Este período es variable dependiendo de las características específicas del reactor y de la sedimentabilidad de los flóculos. Después de la sedimentación, se procede a la decantación del sobrenadante clarificado, quedando los microorganismos remanentes en el fondo del reactor en condiciones de iniciar un nuevo ciclo. Después de la etapa de vaciado, podría realizarse la purga de la biomasa anterior, con el fin de sustituirla por biomasa nueva. La etapa de tiempo muerto es conveniente si el reactor es parte de una serie de reactores en paralelo o en caso de no existir suficiente influente que amerite iniciar otro ciclo. Durante este tiempo los lodos continúan respirando, aunque la alimentación del influente no se realiza. También en esta fase pudiera ocurrir la muerte natural de microorganismos y fuese conveniente purgar biomasa.

La manera en la que se determina la duración de las fases se denomina: Estrategia de Operación, y tiene un gran impacto en las características del SBR (Moreno y Buitrón, 2002). El control del sistema se puede llevar a cabo a través de captadores de nivel, de temporizadores o de medios computarizados.

El proceso SBR presenta ventajas con respecto a los procesos continuos para el tratamiento de aguas contaminadas como son:

- Consorcio de microorganismos con altos rendimientos
- La degradación de los compuestos se realiza en función del tiempo, ya que dependiendo de la concentración del sustrato se puede aumentar o disminuir la duración del tratamiento, de tal manera que, en caso de haber un choque de concentración (aporte puntual de un tóxico), se puede prolongar la duración del tratamiento para cumplir con las normas
- Disminución en costos de inversión, debido a que el mismo tanque sirve de reactor y de sedimentador así como en costos de operación, ya que la demanda de energía es menor que en los sistemas convencionales (Steinmetz *et al.*, 2002)
- Mejoramiento en la decantación de la biomasa debido a la operación cíclica del reactor

A pesar de las ventajas sobre los reactores en continuo los sistemas SBR operados en la forma usual adolecen de algunas dificultades como son:

1. Inhibición causada por sustancias tóxicas que disminuyen la capacidad de degradación de la biomasa por altas concentraciones, lo cual nos lleva a una aclimatación previa de la biomasa a la sustancia tóxica y tiempos de reacción largos para asegurar la mineralización del tóxico.
2. Choques de concentración del tóxico sustanciales e inusuales en el influente que llevan a mayores tiempos de degradación. Al recibir una alta concentración del tóxico la biomasa puede verse seriamente afectada en sus características fisiológicas e inclusive morir.

3. Disminución de la capacidad de los microorganismos para realizar la degradación debido a la falta de sustrato tóxico por períodos largos de tiempo (ayuno) (Buitrón y Capdeville, 1995).
4. Ineficiencia y baja confiabilidad en la operación aunada a la combinación de los factores anteriores y la forma usual de operación conducen a una baja eficiencia del reactor en términos de la cantidad del influente tratado. Adicionalmente las diversas perturbaciones presentes en la operación del sistema hacen que no se tenga ninguna certeza de que el tóxico haya sido degradado al final del ciclo.

Una estrategia de control para el reactor puede llegar a eliminar las desventajas anteriormente expuestas (Dudley *et al.*, 2004, Moreno y Buitrón, 2002) y depende básicamente de la reducción en el tiempo de reacción (Buitrón *et al.*, 2003).

1.5. Influencia de los períodos de ayuno

Aun cuando los microorganismos se aclimatan a un compuesto tóxico, los períodos de ayuno a los que se ven sometidos influyen negativamente sobre el tiempo de degradación (Buitrón, 1993) y produce una disminución de la actividad y la muerte de microorganismos (Coello *et al.*, 2003).

Arbuckle y Kennedy (1989) observaron que un reactor alimentado con 4-CF y una mezcla de compuestos orgánicos (urea, peptona, extracto de carne y lactosa), alimentado con lodos activados aclimatados al 4-CF perdió su actividad microbiana cuando el compuesto se elimina del influente. La tasa de degradación del 4-CF disminuye después de 1 día de ayuno un 30% y 56% al transcurrir dos días de ayuno.

Según Torres (1999) experimentos con 4-CF mostraron que la tasa máxima de crecimiento específico (μ_{\max}), disminuye después de un período de ayuno de 4, 8, 12, 24 y 36 h de 0.35 a 0.15 h⁻¹. Además se demostró que la viabilidad disminuye al incrementarse el período de ayuno, llegando a perderse hasta un 76% después de 36 h de ayuno.

Experimentos realizados por Moreno-Andrade y Buitrón (2004) indican que durante el ayuno se observa una disminución en la tasa de degradación específica (q_x) además de una pérdida de actividad, medida como tasa específica de consumo de oxígeno. Estos resultados indican que el grado de desaclimatación de los microorganismos en ayuno parece ser determinado por la historia de la biomasa.

HIPÓTESIS

La estrategia de operación del bioreactor influye en las eficiencias de degradación de 4-clorofenol. La alimentación óptimamente controlada en un reactor discontinuo permitirá mantener elevada la actividad metabólica de los microorganismos, lo cual se verá reflejado en un incremento en la eficiencia de degradación y menores tiempos de degradación.

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la influencia que tienen 3 estrategias de operación de un proceso biológico sobre la actividad de los microorganismos degradadores de 4-CF, medida a través de la actividad deshidrogenasa y respirométrica

Los objetivos particulares fueron:

1. Implementar una técnica para la determinación de la actividad deshidrogenasa (técnica del INT) y respirométrica para la medición de actividad microbiana, las cuales indicarán el estado metabólico y de respiración de los microorganismos
2. Comparar la actividad microbiana en un reactor continuo y discontinuo, para tener una referencia de sus valores de eficiencia
3. Evaluar la actividad microbiana del reactor discontinuo operado bajo tres estrategias de operación

Capítulo 2

METODOLOGÍA

2. Estrategia experimental

Se estudió la operación de un reactor continuo y un reactor discontinuo secuencial (SBR). En el sistema SBR se estudiaron tres diferentes estrategias de operación llamadas: a) de tiempo fijo, b) de tiempo variable y c) con flujo óptimamente alimentado. El funcionamiento de cada una de las estrategias se realizó por medio de la medición de actividad microbiana la cual fue medida a través de la técnica de deshidrogenasa con INT, así como se midieron eficiencias de degradación, sólidos suspendidos volátiles (SSV) y oxígeno disuelto (OD). En este capítulo se describirá con detalle la fase experimental.

Reactor Continuo. El sistema continuo funcionaba de manera constante, de modo que el sustrato entrara de manera intermitente con una velocidad constante la cual era regulada para lograr los tiempos de retención hidráulica (TRH) deseados. Este reactor se utilizó para comparar el funcionamiento del sistema SBR.

Reactor SBR. La estrategia de tiempo fijo consistió en establecer un tiempo de 10 min de llenado, un tiempo fijo de reacción donde variaron los TRH, un tiempo de sedimentación de 30 min y un tiempo de vaciado de 10 min. En la búsqueda de alternativas de optimización de PTAR, se proponen 2 estrategias de control. En la estrategia SBR de tiempo variable se determina el tiempo de reacción al medir la concentración de OD en el reactor, utilizando un algoritmo de control que detiene automáticamente la etapa de reacción. Y en la estrategia SBR con flujo óptimamente alimentado se determina el final de la reacción utilizando la medición del OD y un modelo que estima la concentración de sustrato, biomasa y volumen dentro del reactor, con el propósito de reducir al mínimo el tiempo de degradación del sustrato, al llevar la tasa de crecimiento hasta su valor máximo (μ_{\max}) y mantenerla ahí hasta llenar el tanque, para después esperar a que el sustrato se degrade al valor deseado. Hay que enfatizar que las variables importantes del proceso (biomasa, sustrato y volumen) pueden ser medidas en línea y que el flujo de entrada de agua al tanque está disponible como variable de control.

2.1. Inóculo

Se inocularon los reactores con lodos activados (2100 mg/L SSV) provenientes de un tanque de aireación de una PTAR municipales, los cuales se transportaron al laboratorio en menos de 30 min, para ser posteriormente cribados y aireados durante 2 h para degradar el sustrato remanente. En esta etapa de aclimatación se procedió a introducir el sustrato en forma de medio sintético el cual contenía 4-CF, nutrientes y oligoelementos según recomendaciones de AFNOR (1985) (ver tabla 2.1) y pH de 7.

2.1.1. Aclimatación

Durante la aclimatación, el flujo de aire utilizado fue de 1.0 L/min, y se empleó la medición del OD para monitorear el comportamiento de la reacción.

El 4-CF (grado analítico) fue empleado como única fuente de carbono para los microorganismos con una concentración inicial de 50 mg/L. Al permanecer constantes los tiempos de reacción la concentración se incrementó a 100 mg/L. Los lodos se consideraban aclimatados cuando la eficiencia de degradación era mayor a 95%.

2.2. Descripción del piloto SBR y continuo utilizados

El reactor SBR utilizado para todas las estrategias, fue construido con material acrílico transparente, siendo sus dimensiones: 60 cm de altura, 15 cm de diámetro interno y una doble pared de 1.5 cm utilizada como protección térmica, siendo su volumen utilizado de 7 L. Debido a la variación que tiene el OD y los microorganismos con respecto a la temperatura fue necesario mantener el reactor a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sugerido por Qureshi *et al.*, (2003), con un circuito cerrado de agua, controlada por un termostato a través de la doble pared del reactor (PolyScience model 210). La aireación se administró a través de un sistema de difusores porosos en su base. Para controlar el flujo del aire se utilizó una válvula solenoide (Marca SMC Mod. VXD2142), un regulador de presión y un rotámetro. El agitador consistió de una flecha de acero inoxidable de 70 cm de largo, la cual tenía dos aspas rectangulares de 5 cm * 2 cm las cuales se encontraban colocadas a 10 y 15 cm de distancia del fondo del reactor. Con un flujo de aire entre 0.5-1.5 L/min y una velocidad de agitación de 120 rpm, lo cual garantizaba una buena homogeneización en el reactor y una concentración de OD mayor a 2 mg/L recomendada por Magbanua *et al.*, (2004).

Tabla 2.1. Medio sintético con nutrientes y oligoelementos en los reactores

| Compuesto | Concentración mg/L | Compuesto | Concentración mg/L |
|--|--------------------|---|--------------------|
| KH₂PO₄ | 19.125 | Fe₂Cl₃·6H₂O | 0.023 |
| K₂HPO₄ | 24.45 | MnCl₂·4H₂O | 0.0026 |
| Na₂HPO₄·7H₂O | 56.63 | H₃BO₃ | 0.00429 |
| NH₄Cl | 5.63 | ZnCl₂ | 0.00152 |
| MgSO₄·7H₂O | 1.69 | (NH₄)₆Mo₇O₂₄ | 0.0026 |
| CaCl·2H₂O | 2.73 | EDTA | 0.00405 |

Se utilizaron dos bombas peristálticas (Masterflex Mod. 7523-20), utilizadas en la alimentación del influente y la purga del efluente; mismas que fueron conectadas a un temporizador (ChronTrol XT), el cual sirvió para controlar el proceso. Se monitoreó el OD a través de un oxímetro (Mod. YSI 058) el cual se encontraba sumergido a 20 cm de la superficie, y estaba acoplado a un graficador (Mod. D-1052) para imprimir el respirograma. Se colocó un No Break Tripp Lite Mod. Omnismart-2200PNP al cual se conectaron todos los equipos.

2.3. Estrategia de operación en modo continuo

El sistema continuo es un tanque de acrílico transparente de 5 L con un sedimentador en el exterior, que mantuvo una aireación continua a través de difusores porosos, contó con 2 bombas peristálticas para alimentación del influente y recirculación de los lodos desde el sedimentador.

El reactor continuo (fig. 2.1) se llenaba de manera constante, el efluente se llevaba a un sedimentador para retornar la biomasa al reactor y conducir el sobrenadante al drenaje. La tabla 2.2. presenta las condiciones de operación utilizadas en el reactor continuo.

Los lodos se aclimataron después de 20 días de trabajar en el sistema continuo a concentraciones de 100 mg/L de 4-CF.

Tabla 2.2. Condiciones de operación del reactor continuo

| Flujo (Q) del influente (L/h) | Recirculación (L/h) | TRH (h) | Carga volumétrica (mg 4-CF/L-d) | Tiempo de retención celular (TRC) (días) |
|-------------------------------|---------------------|------------------|---------------------------------|--|
| 0.208 | 0.624 | 5, 8 ,11, 16, 32 | 50, 100 | 18 |

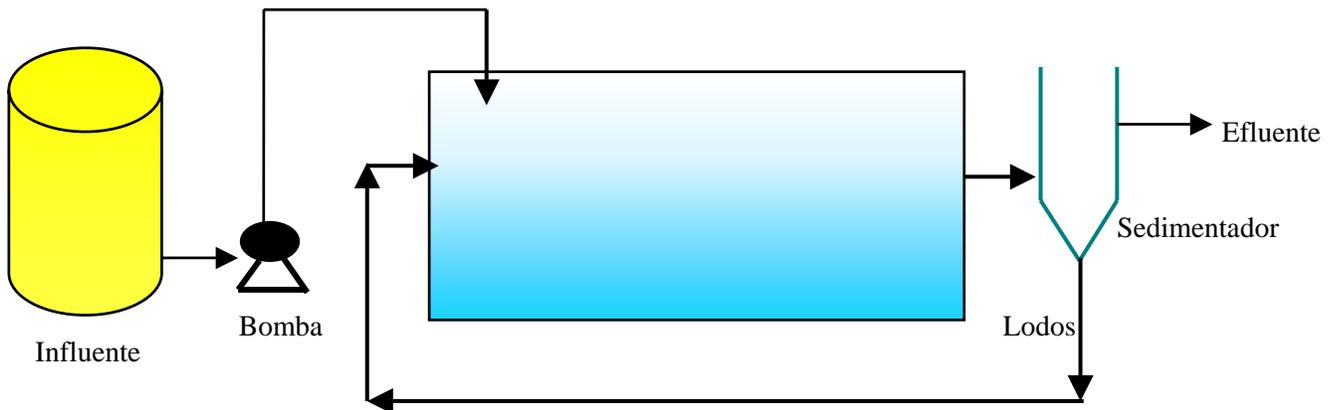


Fig. 2.1. Esquema de la estrategia de operación en modo Continuo

2.4. Estrategia de operación en modo discontinuo

2.4.1. Estrategia de tiempo fijo

La estrategia de operación de tiempo fijo consistió en llenar el reactor de manera rápida y poder esperar el tiempo necesario para eliminar el sustrato. Uno de sus inconvenientes es la duración de la etapa de reacción la cual puede ocasionar períodos de ayuno.

Esta etapa se inició después de una aclimatación de los lodos que duró 27 días con ciclos de 24 h. Después de la etapa de aclimatación el tiempo de llenado fue de 10 min, con un tiempo de reacción fijo de 4, 6, 8, 12 y 24 h, la sedimentación se fijó en 30 min, y el tiempo de vaciado en 10 min, sin considerar el tiempo muerto. Aunque se supervisó continuamente el consumo de OD no se utilizó como herramienta de control en esta etapa. En un inicio los lodos tenían poca sedimentabilidad por lo que en los primeros ciclos la fuente de carbono se alimentaba directamente sin intercambiar agua hasta alcanzar progresivamente un volumen intercambiado del 75%.

En la fig. 2.2. se observa el arreglo de la estrategia de tiempo fijo y en la tabla 2.3. se indican las condiciones de operación de la estrategia de tiempo fijo.

Tabla 2.3. Condiciones de operación de la estrategia de tiempo fijo

| Decantación (min) | Vaciado (min) | TRH (horas) | TRC (días) | Volumen intercambiado (%) | Carga volumétrica (mg4CF/L-d) |
|-------------------|---------------|------------------|------------|---------------------------|-------------------------------|
| 30 | 10 | 5, 8, 11, 16, 32 | 34 | 75 | 50, 100 |

2.4.2. Estrategia de tiempo variable

En la estrategia de tiempo variable se llenó el reactor utilizando el mayor flujo posible de agua y el tiempo de degradación se determinó midiendo la concentración de OD en el reactor. Cuando el OD llega a la saturación después de pasar por el mínimo, el algoritmo de control automáticamente detiene la reacción, iniciando la siguiente etapa del proceso. Es posible implantar la estrategia de tiempo variable ya que existe una relación estrecha entre el sustrato y la concentración de OD.

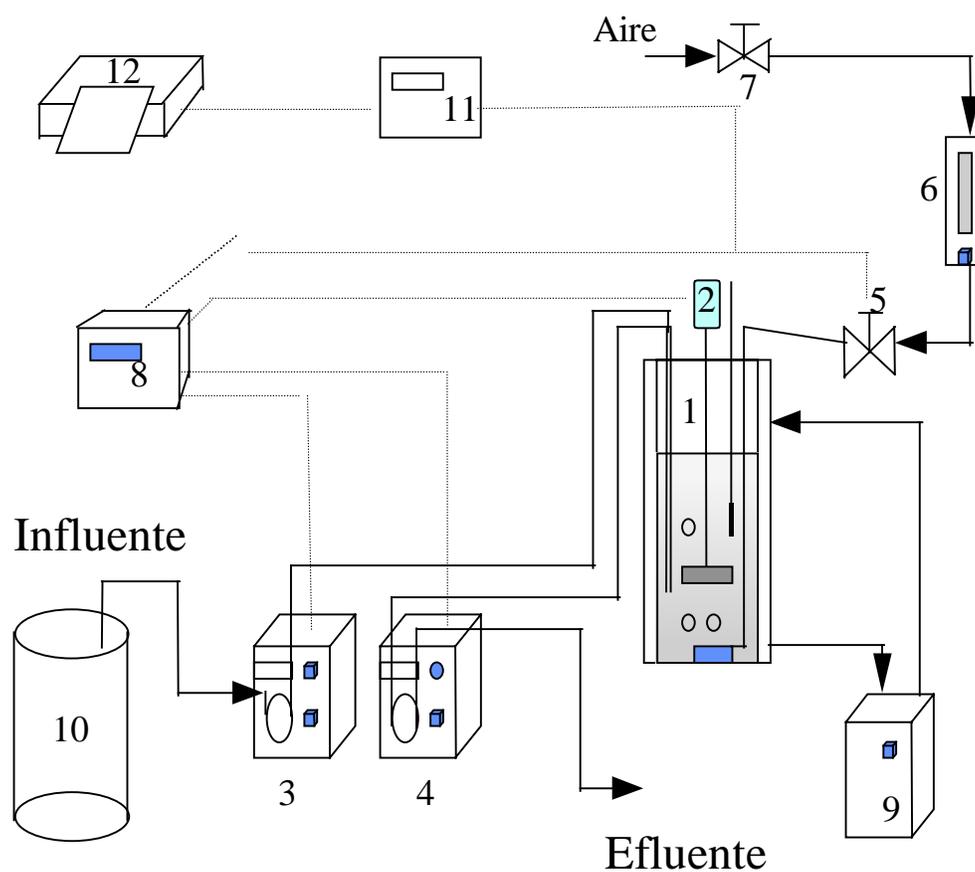


Fig. 2.2. Arreglo del equipo SBR. Reactor (1), agitador (2), bomba de llenado (3), bomba de vaciado (4), válvula solenoide (5), rotámetro (6), válvula de presión (7), temporizador (8), calentador (9), tanque de alimentación (10), medidor de oxígeno (11), graficador (12).

Con el empleo de técnicas respirométricas se puede conocer el final de la reacción y de esta manera controlar el sistema evitándose períodos de ayuno que afectan la actividad microbiana (fig. 2.5).

Mendoza y Buitrón (1998) indican la máxima actividad microbiana en un ciclo del reactor SBR coincidiendo con el 90% de degradación del sustrato. El influente fue el mismo medio sintético de 4-CF y una mezcla de nutrientes siendo el volumen intercambiado de 75%.

2.4.3. Estrategia con flujo óptimamente alimentado

Esta estrategia fue una mejor opción para minimizar el tiempo de degradación del tóxico, lo cual se logró con técnicas de optimización dinámica que consisten en regular Q para mantener la concentración de sustrato dentro del reactor en un valor donde la tasa de crecimiento fuese máxima (Moreno y Buitrón, 1998). Con la medición del OD y un modelo que estimó los demás estados del sistema (concentración de sustrato, biomasa y volumen), se determinó el final de la reacción.

En la figura 2.3. se observa el arreglo del equipo tanto en la estrategia de tiempo variable como en la de flujo óptimamente alimentado.

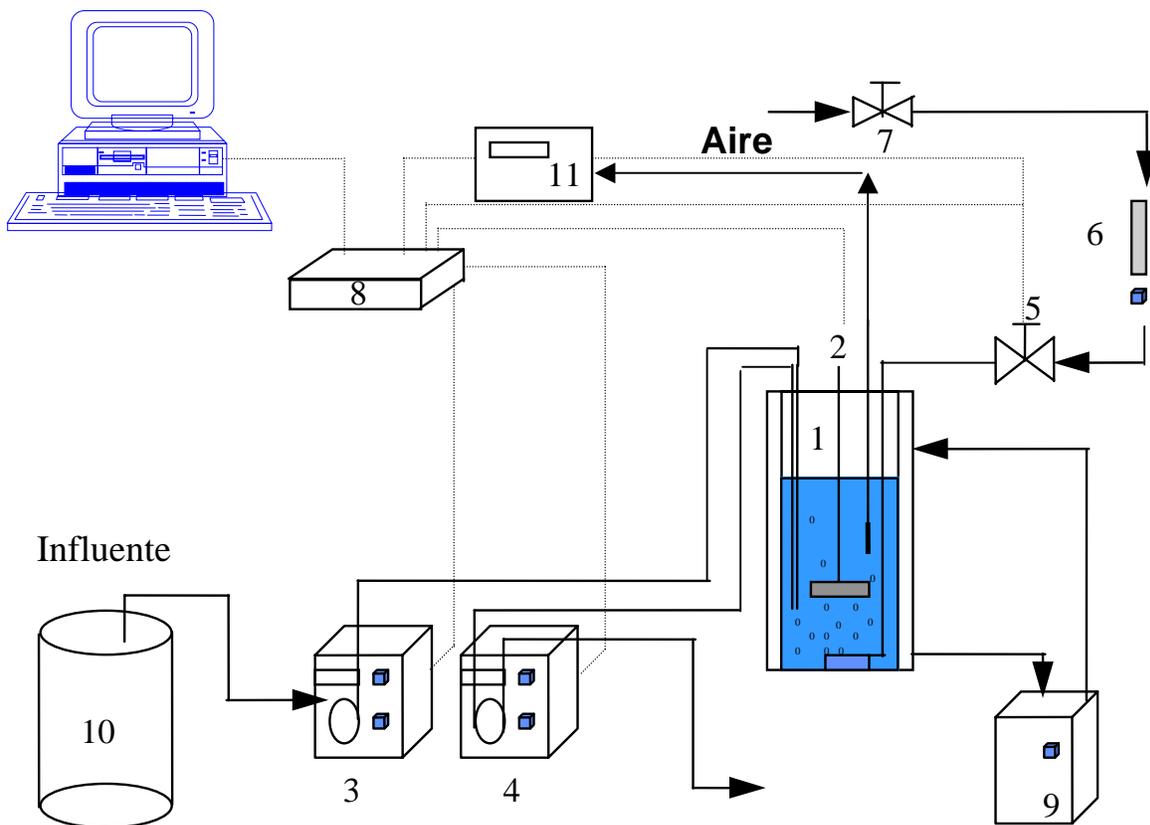


Figura 2.3. Arreglo del equipo en la estrategias de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado. Reactor (1), agitador (2), bomba de llenado (3), bomba de vaciado (4), válvula solenoide (5), rotámetro (6), válvula de presión (7), tarjeta de adquisición de datos (8), termostato (9), tanque de alimentación (10), medidor de oxígeno (11).

La estrategia con flujo óptimamente alimentado regula la tasa de alimentación a través de la medición de OD para mantener una concentración de sustrato óptima constante en el reactor, dando como consecuencia una disminución del tiempo de reacción, y evitando la inhibición de la biomasa por altas concentraciones del sustrato y períodos de ayuno.

El reactor tuvo una concentración inicial de 100 mg/L de 4-CF, y un volumen de intercambio del 75%.

Para establecer el control del reactor fue necesario disponer de un modelo matemático que describiera los fenómenos físicos de forma satisfactoria; para los intereses del presente trabajo, fue suficiente con la modelación de las fases de llenado y reacción. El modelo planteado fue un balance de masa para cada estado del sistema: volumen, OD, biomasa y sustrato.

Este modelo se utiliza para diseñar la ley de control y se busca que describa adecuadamente la situación física real, aunque no es fácil cuando se trata de reacciones bioquímicas complejas como las de un proceso biológico.

2.4.3.1. Modelo del proceso

El modelo matemático para el reactor propuesto por Moreno y Buitrón (1998) tiene las siguientes suposiciones y simplificaciones:

1. Se supone biomasa homogénea, con iguales tasas de crecimiento y mortalidad
2. Considera que el sustrato es único y que su concentración en el influente es constante y conocida, además de existir la misma concentración en cualquier punto del reactor
3. Se considera que la concentración de OD es suficiente

Bajo las consideraciones anteriores, las fases de llenado y reacción pueden ser descritas por las siguientes ecuaciones diferenciales, las cuales provienen de un balance de masa en el reactor:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - K_d \cdot X - X \cdot \frac{Q_{en}}{V} \quad (2.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu \cdot X + (S_{en} - S) \cdot \frac{Q_{en}}{V} \quad (2.2)$$

$$\frac{dO}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/o}} \cdot \mu \cdot X - b \cdot X + K_{La} \cdot (O_s - O) + (O_{en} - O) \cdot \frac{Q_{en}}{V} \quad (2.3)$$

$$\frac{dV}{dt} = Q_{en} \quad (2.4)$$

Donde:

- X : concentración de biomasa en el reactor, mg/L de SSV
- S : concentración de sustrato en el reactor, mg/L de 4-CF
- O : concentración de OD en el agua del reactor, mg/L
- V : volumen de agua en el reactor, L
- $Y_{X/S}$: coeficiente de conversión biomasa/sustrato, mg SSV/mg 4-CF
- $Y_{X/O}$: coeficiente de conversión biomasa/oxígeno, mg SSV/mg OD
- K_{La} : coeficiente de transferencia de masa, h^{-1}
- b : tasa específica de respiración endógena de biomasa, h^{-1}
- K_d : tasa de mortandad de biomasa, h^{-1}
- μ : tasa de crecimiento específico de biomasa, h^{-1}
- Q_{en} : flujo de entrada de agua, L/h

S_{en} : concentración de sustrato en el flujo de entrada, mg 4-CF/L
 O_{en} : concentración de OD en el flujo de entrada, mg/L
 O_s : concentración de saturación de O_2 , mg/L.

Como la cantidad de OD en el reactor se supone suficiente para que los microorganismos respiren adecuadamente, la tasa de crecimiento de biomasa depende exclusivamente de la concentración de S y presenta inhibición con altas concentraciones de sustancias tóxicas. Por ello, se consideró la ley de Haldane:

$$\mu = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (2.5)$$

Con esta ley, como se puede ver en la fig. 2.4, para una concentración de sustrato S^* se alcanza una tasa de crecimiento máxima μ^* , donde dicho punto se describe por :

$$S^* = \sqrt{K_s \cdot K_I} \quad (2.6)$$

$$\mu^* = \frac{\mu_m}{1 + 2\sqrt{\frac{K_s}{K_I}}} \quad (2.7)$$

Donde:

μ_m : tasa máxima de crecimiento específico, h^{-1}
 K_s : constante de afinidad, mg/L,
 K_I : constante de inhibición, mg/L.

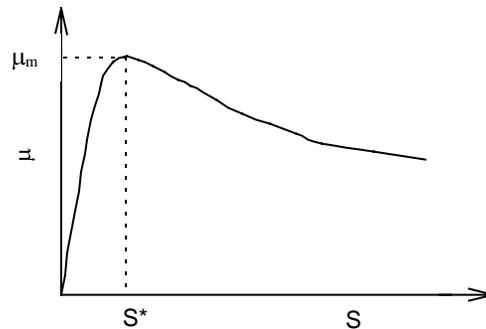


Figura 2.4. Ley de Haldane.

2.4.3.2. Ley de control

La ley de control de tiempo óptimo considera que Q_{en} es la variable de control durante el llenado y reacción del sistema. Donde $0 \leq Q_{en} \leq Q_{max}$ y se supone $K_d = 0$. Utilizando técnicas de control óptimo (Moreno y Buitrón, 1998) se tiene que una ley que permite minimizar el tiempo de reacción, ec. 2.8.

$$\begin{aligned}
 Q_{en} = & 0 \quad \text{Si } (V = V_{max}) \text{ ó } (S > S^*) \\
 & Q_{sing} \quad \text{Si } (V < V_{max}) \text{ y } (S = S^*) \\
 & Q_{max} \quad \text{Si } (V < V_{max}) \text{ y } (S < S^*)
 \end{aligned} \quad (2.8)$$

donde Q_{sing} es el flujo de entrada tal que $S = S^*$ y esta dado por:

$$Q_{sing} = \frac{\mu^* \cdot V \cdot X}{Y_{x/s} \cdot (S_{en} - S)} \quad (2.9)$$

2.4.3.3. Programa

El control del reactor se realizó utilizando el paquete MATLAB y SIMULINK.

El panel de control y visualización de datos permiten al usuario llevar un control sobre el desarrollo del proceso observando la concentración de OD real y estimado, así como el sustrato, biomasa, volumen y Q (fig. 2.6). Es posible cambiar la etapa del proceso o la forma de operación al ajustar los parámetros del modelo y calibrar el observador (Vargas *et al.*, 2000). Además de la observación gráfica permite almacenar los datos que se generan a lo largo del experimento.

El control del piloto utilizó un modelo que se resolvió con la medición de Q, OD y con estimados iniciales de biomasa y sustrato; las variables medidas y estimadas se observaron en pantalla, mientras que el controlador envía una señal correctiva a las bombas para seguir operando.

El sistema está definido por cada una de las partes que conforman el piloto, exceptuando el CPU. Así, las bombas, el sensor de OD y la válvula de aire envían una señal que es procesada en la computadora, la cual a su vez retroalimenta una señal correctiva.

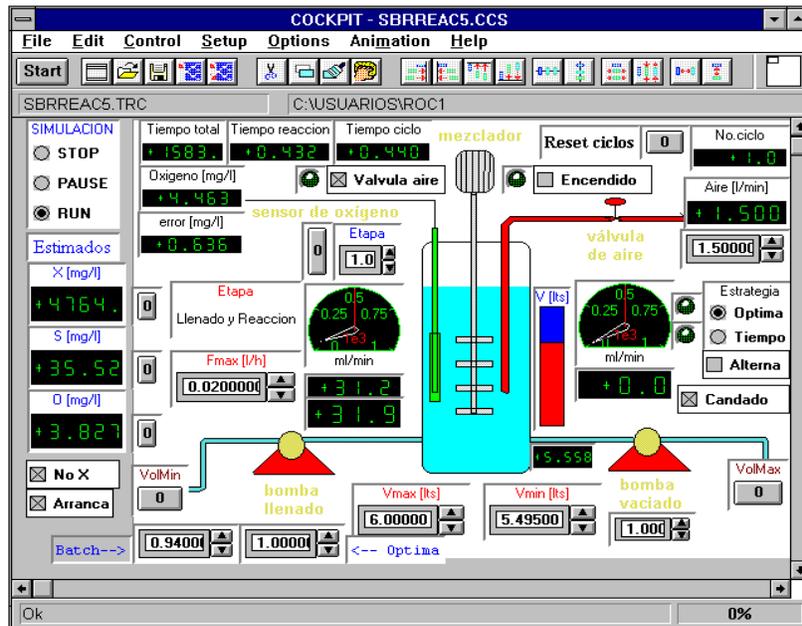


Figura 2.5. Panel de control

Cuando el observador se encuentra calibrado adecuadamente, los valores estimados de concentración de sustrato son similares a los reales, lo cual resulta en un buen desempeño del controlador, al mantener la concentración de S en un valor óptimo. Lo cual permite mantener la tasa de crecimiento máxima, así como regular Q y obtener el menor tiempo de degradación del tóxico.

2.5. Método Respirométrico

Las mediciones de OD se lograron a través de un oxímetro YSI modelo 5730 (Yellows Springs Instrument Co., Yellows Springs, Ohio) acoplado a una computadora.

El aparato se calibra con agua saturada de oxígeno a la temperatura de la prueba y los valores de solubilidad se ajustan según la altitud a la que se encuentra realizando la prueba. La sonda de oxígeno se encontraba localizada a 20 cm de la superficie y cuando se alcanza el punto mínimo de OD se toma una muestra para medir el punto máximo de actividad microbiana.

2.5.1 Respirograma patrón

En el respirograma de un ciclo completo para la estrategia de tiempo fijo y variable (fig. 2.7) es posible identificar cada una de las etapas del reactor SBR. El tiempo del ciclo, en horas, se calculó según la siguiente ecuación:

$$T_c = T_r + T_d + T_a + T_s + T_v + T_{LI} + T_m$$

Donde:

T_c : Tiempo del ciclo

T_s = Tiempo de sedimentación

T_r : Tiempo de reacción

T_v = Tiempo de vaciado

T_d : Tiempo de degradación

T_{LI} = Tiempo de llenado

T_a : Tiempo de ayuno

T_m = Tiempo muerto

2.6. Comparación entre el sistema SBR y continuo

2.6.1. Variación del TRH y TRC

Se operó un reactor SBR con estrategia de tiempo fijo y otro continuo a temperatura ambiente, su modo de operación se mostró anteriormente. Ambos reactores se operaron por un período de 100 días.

La sonda de oxígeno se introduce en el reactor SBR justo después de añadir el sustrato, y cuando se alcanza el punto mínimo de OD se toma una muestra para medir la actividad microbiana ya que este es el punto donde se detecta su máxima medición. En el reactor continuo puede ser medida en cualquier momento.

El efluente de los reactores fue analizado para conocer la concentración final de 4-CF y SSV según Standard Methods (1992) además de medir el carbono orgánico total (COT). Aunado a esto se realizaron pruebas de actividad microbiana con INT (Manias, 1991) y respirometría, índice volumétrico de lodos (IVL) y un metabolito detectado a 380 nm. Se realizaron tres análisis de actividad microbiana para cada TRH.

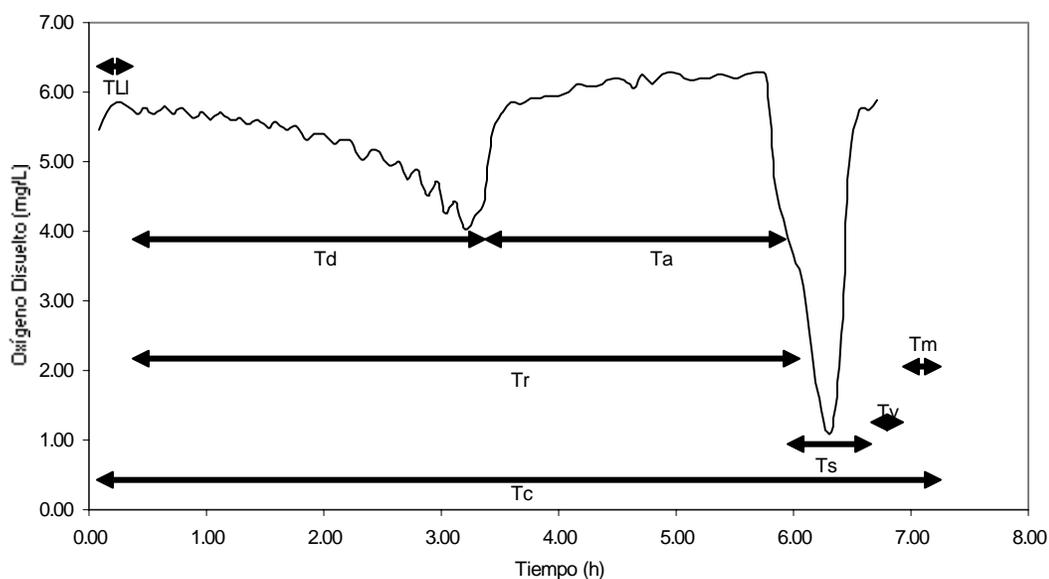


Fig. 2.6. Respirograma donde se muestran las diferentes etapas de un ciclo de operación

2.7. Técnicas analíticas

Los parámetros que se determinaron fueron: concentración de 4-CF, COT, SSV, IVL, metabolito detectado a 380 nm y actividad microbiana a través de INT y respirometría.

2.7.1. Curva Patrón de Actividad deshidrogenasa INT-Formazán

Para realizar esta curva patrón se preparan diluciones de 5 a 35 μM de INTF en metanol partiendo de una solución madre de 1 mM en agua destilada, la cual es puesta en ultrasonido (90 V, 1 min) para disolver completamente los gránulos, siendo el pico de absorción a 480 nm. Para evitar interferencias, las celdas del espectrofotómetro se lavan en mezcla sulfocrómica, con agua destilada y por último con metanol.

La técnica para medir la actividad microbiana por medio del INT fue la descrita por Manias (1991), la cual fue modificada para adecuarse a este trabajo experimental. El procedimiento a seguir fue el siguiente: en un tubo de ensayo estéril se añaden 10 mL de biomasa, se le agrega rápidamente 1 mL de INT a 0.659 mM (muestra fresca y aislada de la luz) (Kim *et al.*, 1994). Se incuba la muestra durante 20 min a 20°C en la oscuridad. Los tubos fueron vigorosamente agitados en un vortex cada 5 min para asegurar la homogeneidad. Para detener la reacción se añade 1 mL de formaldehído al 37% (p/v), se vuelven a agitar los tubos y se colocan en ultrasonido a 90 V durante 30 s. Después se toma la cantidad determinada para un ensayo preliminar, la cual depende de la concentración de la muestra y varía de 1 a 4 mL, se centrifuga por 10 min a 3700 rpm y se procede a retirar el sobrenadante. Se adiciona suficiente metanol (9 mL) y se vuelve a colocar en ultrasonido.

La curva patrón (fig. 2.8) que se obtuvo muestra un coeficiente de regresión $r = 0.999$.

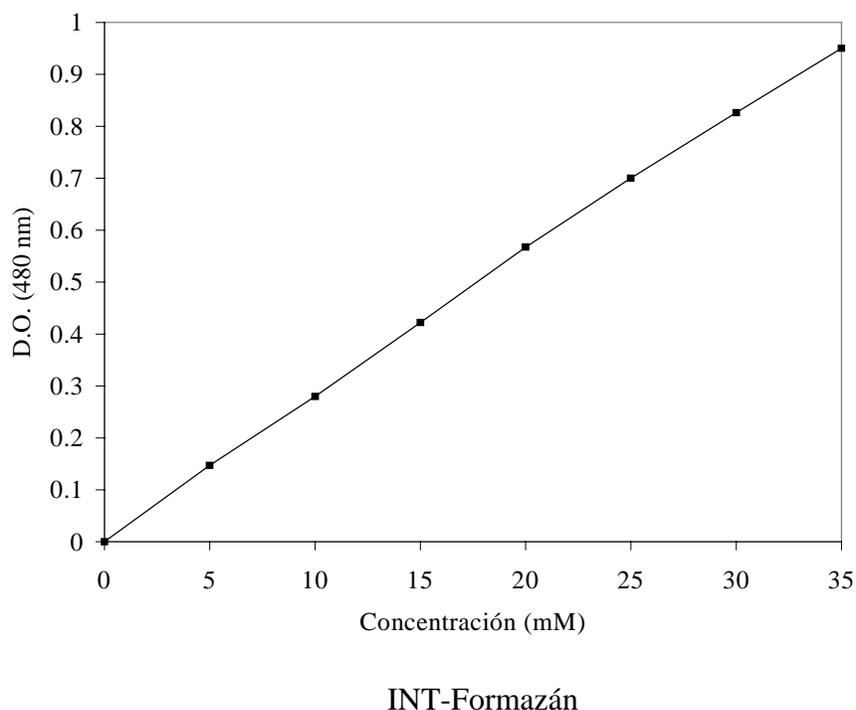


Fig. 2.7. Curva Patrón de INT-Formazán

Posteriormente se mantiene el tubo de ensayo 1 h en la obscuridad, se centrifuga 10 min a 3700 rpm y se lee el sobrenadante a 480 nm contra el blanco, el cual es una muestra incubada en presencia de INT y formaldehído.

La actividad microbiana de la muestra se calcula a través de la ecuación 2.1.

$$\frac{\mu\text{molINT}}{\text{gSSV} - h} = \frac{(\mu\text{mol/L}) * \text{vol metanol (mL)} * \frac{3.6(1/h)}{X(g/L)}}{\text{vol. de ensayo (mL)}} \quad (2.10)$$

2.7.2 Determinación de 4-CF y COT

Con el propósito de evaluar la minealización del 4-CF se realizaron las siguientes determinaciones. La concentración de sustrato se midió tomando muestras y procesándolas utilizando la técnica colorimétrica con el método de 4-aminoantipirina para la determinación de 4-CF (Standard Methods, 1992) el cual es medido a través del espectrofotómetro Hach DR/2000.

Para determinar la concentración de COT se utiliza un analizador TOC-5050 Shimadzu. Este aparato inyecta a la muestra previamente acidificada (1 mL H₃PO₄ 1:20) un flujo de aire de alta pureza (150 mL/min) humidificado, el cual es llevado a un tubo de combustión con un catalizador calentado a 680°C para llegar a CO₂. Este gas es medido a través de un analizador de infrarrojo que da una señal proporcional a la concentración de COT de la muestra. Al acidificar se eliminan los componentes de carbono inorgánico, al llevarlos a carbonatos.

2.7.3. Absorbancia de metabolito

En algunas ocasiones se observó la presencia de un metabolito de color amarillo verdoso. Para evitar su acumulación la cual causa inhibición en los microorganismos, se determinó este compuesto midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro DU serie 650 Beckman a 380 nm.

2.7.4. Estimación de la biomasa

Para determinar la concentración de biomasa en un instante dado en el reactor, se midieron los SSV y sólidos suspendidos totales (SST) según (Standard Methods, 1992). También se realizaron estas pruebas para el efluente de los reactores.

2.7.5. Índice volumétrico de lodos

Se dejaron sedimentar los lodos en una probeta de vidrio de 1 L durante 30 min, para posteriormente medirse el volumen sedimentado, este volumen se divide entre la concentración de SST. El IVL está dado por la ecuación 2.11.

$$IVL = \frac{V_{30}}{X} \quad (2.11)$$

Donde:

IVL = Índice volumétrico de lodos (mL/g)

V_{30} = Volumen (mL) sedimentado en una probeta de 1 L durante 30 min

X = Concentración de SST (g) en el reactor

2.8. Cálculos de variables del proceso

2.8.1. Carga orgánica eliminada (B_{ve}) y aplicada (B_{va})

La B_{va} es la cantidad de materia orgánica oxidable por volumen útil de reactor y tiempo de ciclo; dicha carga se calculó con la ec. 2.12.

$$B_{va} = \left(\frac{S_{en}}{T_c} \right) \cdot \frac{V_I}{V} \cdot f \quad (2.12)$$

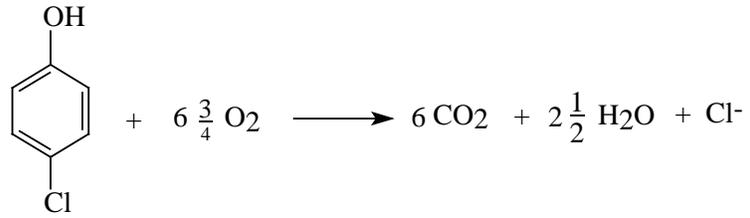
La B_{ve} se obtuvo de la ec. 2.13, la cual es el producto de la carga orgánica aplicada por la eficiencia del sistema.

$$B_{ve} = B_{va} \cdot \eta \quad (2.13)$$

Donde la eficiencia se determinó a partir de la ec. 2.14.

$$\eta = \frac{S_{en} - S_{ef}}{S_{en}} \quad (2.14)$$

La DQO (Demanda Química de Oxígeno) se calcula estequiométricamente y se utiliza para obtener el valor del factor de conversión f .



2.8.2. Tasas de degradación específica (q_x) y volumétrica (q_v)

La tasa específica de degradación evalúa la actividad de la biomasa para consumir el sustrato:

$$q_x = \left(\frac{S_{en} - S_{ef}}{T_d \cdot X} \right) \cdot \frac{V_I}{V} \quad (2.15)$$

$$q_v = \left(\frac{S_{en} - S_{ef}}{T_d} \right) \cdot \frac{V_I}{V} \quad (2.16)$$

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. Funcionamiento de los reactores bajo diferentes condiciones de operación

Antes de iniciar la experimentación propia de esta tesis, se describirá la realización de pruebas para determinar la volatilización del 4-CF. Se probaron concentraciones de 100 mg/L tanto en el reactor continuo como en el SBR de tiempo fijo en agua potable bajo continua aireación, con ausencia de microorganismos. Estas pruebas se realizaron por duplicado. Bajo tales condiciones no se observó una pérdida significativa de 4-CF con lo cual se constató que no hubo pérdidas del compuesto por volatilización (Tabla. 3.1.). Experimentos realizados por Nordin, 2004 muestran que después de 168 h de aeración, la volatilización fue menor al 3.5% de la concentración inicial de 4-CF, lo cual coincide con los valores obtenidos en esta tesis.

Tabla 3.1. Valores de volatilización en reactor SBR y continuo

| Tiempo (h) | Reactor SBR % 4-CF | Reactor Continuo % 4-CF |
|------------|--------------------|-------------------------|
| 0 | 0.1 | 0.1 |
| 1 | 0.2 | 0.1 |
| 2 | 0.2 | 0.2 |
| 3 | 0.3 | 0.2 |
| 4 | 0.2 | 0.1 |
| 5 | 0.1 | 0.2 |
| 6 | 0.1 | 0.2 |
| 7 | 0.2 | 0.1 |
| 8 | 0.1 | 0.1 |

3.1. Aclimatación de los lodos

Los lodos activados, como se explicó en el capítulo 2, fueron aclimatados al 4-CF y posteriormente se variaron las condiciones de operación en el sistema SBR en la estrategia de tiempo fijo, de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado. El tiempo para alcanzar degradaciones constantes fue de 27 días.

3.1.1. Cinéticas de degradación en etapa de aclimatación

En la figura 3.1. se observa que los lodos degradan 90% a las 20 h en la estrategia de tiempo fijo con una concentración de 4-CF de 50 mg/L y al segundo ciclo disminuye a 10 h el tiempo de

degradación, llegando a los 6 días a degradarlo en 4.5 h. Siendo importante resaltar que mientras transcurría la aclimatación (ciclos del reactor) el tiempo de degradación disminuía. En este punto se aumentó a 100 mg/L y los lodos lograron degradarlo en 11 h, disminuyendo paulatinamente el tiempo de degradación. Es necesario resaltar que al aumentar la concentración del 4-CF se duplica el tiempo de degradación por el efecto inhibitorio del tóxico (Hill *et al.*, 1996). Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Buitrón y Moreno (2004), quienes proponen un modelo para el proceso de aclimatación/desaclimatación.

En la etapa de aclimatación en la estrategia SBR de tiempo fijo las eficiencias de degradación fueron mayores al 90% y los tiempos de degradación fueron de 3.0 ± 1.0 h, por lo que fue posible realizar hasta 5 ciclos diarios cuando estuvieron ya aclimatados los lodos, lo que equivaldría a tratar 5 veces más influente que en un tratamiento SBR convencional que opera en ciclos de 24 h.

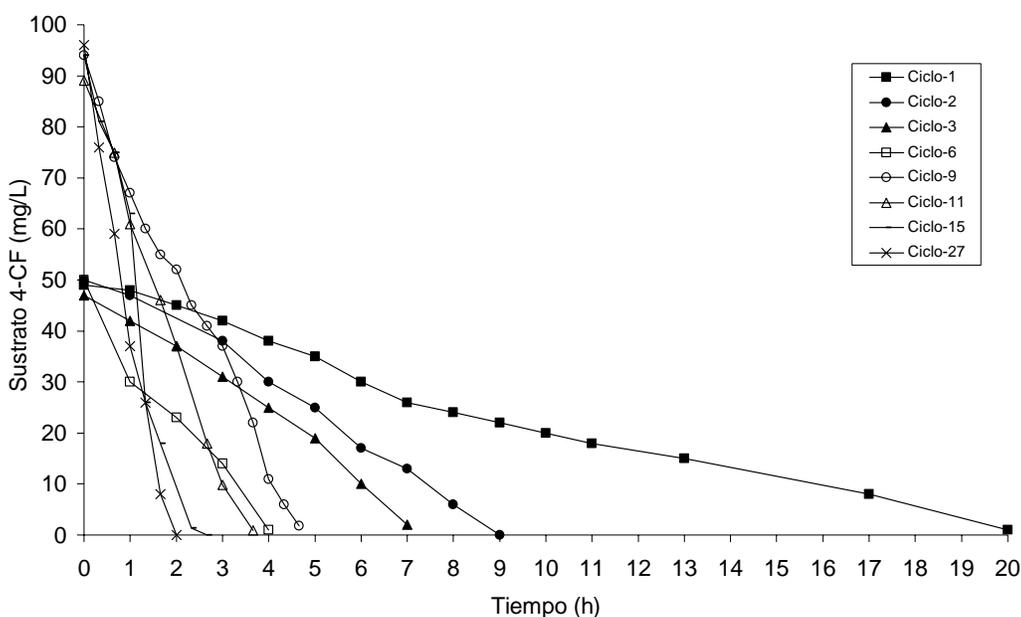


Fig. 3.1. Cinéticas de degradación del sustrato durante la aclimatación de la estrategia SBR de tiempo fijo

3.1.2. Sistema SBR operado con tiempos variables

El estudio aquí presentado se basa en la estimación en línea del oxígeno consumido a través de medidas respirométricas. Sin embargo, como se puede apreciar en la fig 3.2., se adicionaron lodos aclimatados y se observa que es prácticamente imposible en los primeros ciclos que un instrumento detecte las variaciones de concentración de OD. Conforme aumentan los ciclos disminuye el tiempo de degradación del 4-CF consumido por los microorganismos y es mayor la pendiente del OD. En el ciclo 1, el tiempo de degradación del 4-CF es de 6 h, en el ciclo 5 el tiempo desciende a 5 h hasta llegar al ciclo 30 donde el tiempo de degradación del tóxico es de 2 h, llegando a mantenerse constantes los tiempos de degradación. Se observa en un inicio que los microorganismos degradan en un menor tiempo debido a que se reinoculan lodos a los ya existentes y esto disminuye el tiempo de degradación que tendrían los lodos originales que hubiesen sido inoculados sin previa aclimatación al tóxico. El consumo de oxígeno se realiza lentamente a lo largo de un tiempo considerable. En la mínima concentración de OD la degradación es superior al 95% de 4-CF. Es decir en el momento en que el OD llega a un punto mínimo se ha degradado la mayor cantidad del tóxico.

En la primera parte de la reacción, los microorganismos consumen oxígeno para metabolizar el sustrato, pero a partir de la mínima concentración de OD el sustrato se agota y el consumo de oxígeno es solo por respiración endógena (conversión de moléculas almacenadas, las cuales en ausencia de un sustrato externo se utilizan para los procesos de crecimiento y mantenimiento celular).

La tasa máxima de consumo de oxígeno (TMCO) en la estrategia de tiempo variable se puede observar en la tabla 3.2, donde los valores se incrementan hasta llegar a 19.97 mgO₂/L·h. Buitrón *et al.*, (2000) mencionan, para aguas municipales, que para valores menores a 4 mgO₂/gSST·h existe una población no estable por la entrada de un tóxico y valores de 4 a 9 mgO₂/gSST·h son valores típicos para el proceso por aeración extendida, lo cual indica que los valores obtenidos en el sistema SBR de tiempo variable cuando los lodos estaban completamente aclimatados al 4-CF en el ciclo 30 lograron equipararse a un sistema que degrada materia orgánica fácilmente degradable (tabla 3.3).

Tabla 3.2. Valores de TMCO en el sistema SBR de tiempo variable

| Ciclo | TMCO (mgO ₂ /L·h) | TMCO específica (mgO ₂ /gSST·h) |
|-----------|------------------------------|--|
| 1 | 4.23 | 2.48 |
| 5 | 6.04 | 3.77 |
| 10 | 9.12 | 5.21 |
| 20 | 13.68 | 7.60 |
| 30 | 19.97 | 9.98 |

Tabla 3.3. Valores típicos para la TMCO específica observados en plantas de tratamiento de aguas municipales y domésticas por lodos activados (Buitrón *et al.*, 2000)

| TMCO específica (mgO ₂ /gSST·h) | Significado |
|--|---|
| < 4 | Población biológica no estable ni saludable. Posible entrada de un tóxico |
| 4 – 9 | Valores típicos para el proceso por aeración extendida. Valores de la actividad endógena. También encontrado cuando la materia orgánica es lentamente biodegradable |
| 10 – 20 | Valores normales para la mayoría de los lodos activados convencionales |
| > 20 | Materia orgánica fácilmente biodegradable. Valores típicos del proceso de alta tasa |

En la figura 3.3 se observa que a lo largo de los ciclos la variación de la tasa de degradación volumétrica (q_v) la cual se va incrementando conforme transcurren los ciclos de aclimatación, hasta llegar a obtener valores de 48 mg DQO/L·h en el ciclo 27.

3.1.3. Comparación de un sistema SBR de tiempo fijo vs. Continuo

Para tener un punto de referencia se comparó la operación del sistema SBR de tiempo fijo con un sistema continuo.

Cuando los sistemas estuvieron aclimatados con ciclos de 24 h (TRH 32 h), las eficiencias de degradación del 4-CF se mantuvieron arriba del 90% en el reactor SBR, eficiencias muy similares al

reactor continuo. Se observa que ambos reactores llegan a degradar el compuesto casi en su totalidad (fig. 3.4). En el ciclo 8 se perdieron lodos en ambos reactores debido a un accidente, lo que ocasionó una disminución del 80% de la eficiencia de degradación por la pérdida de los microorganismos.

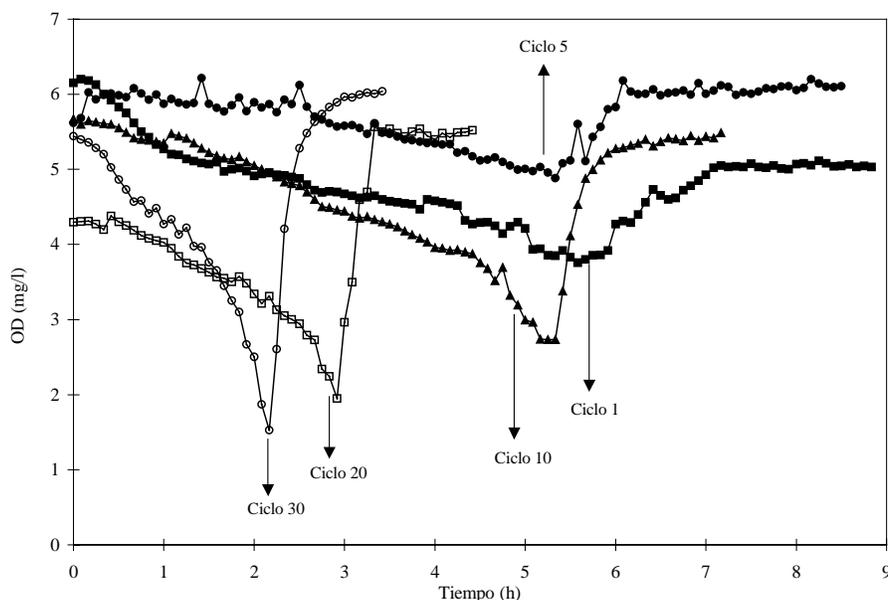


Fig. 3.2. Respirogramas con adición de microorganismos aclimatados en estrategia SBR de tiempo variable

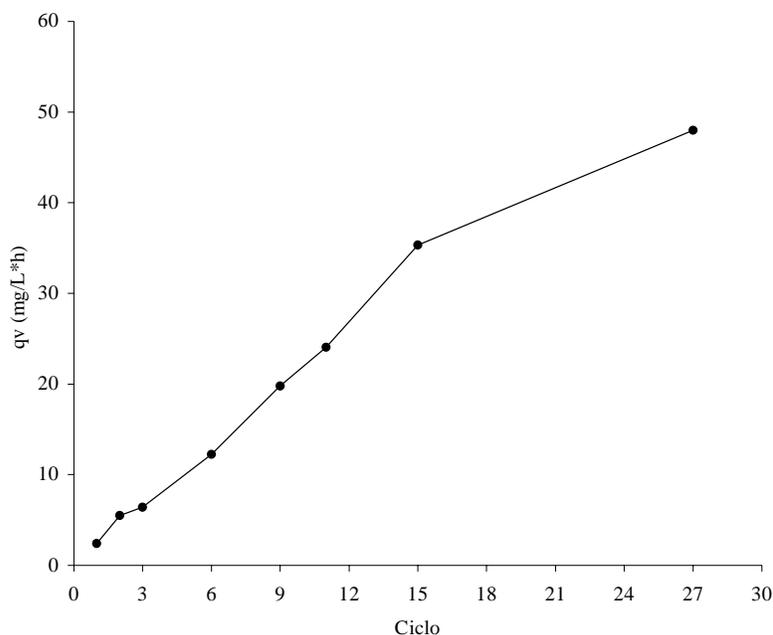


Fig. 3.3. Tasas de degradación volumétrica en la estrategia SBR de tiempo fijo en etapa de aclimatación

La actividad microbiana promedio se comparó en ambos sistemas siendo en el SBR 112 ± 3.39 y en el continuo $99 \pm 4.16 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$ respectivamente, esto permite concluir que a pesar de tener similares eficiencias de remoción, el sistema SBR tiene mayor potencial (fig. 3.5), esto se debe

principalmente a la operación cíclica del reactor que logra un consorcio de microorganismos con altos rendimientos.

Los resultados de Lopez *et al.*, (1986) son muy similares a los reportados en este trabajo para el sistema continuo, estos investigadores realizaron experimentos en el mismo sistema para el tratamiento de aguas domésticas. También es importante mencionar que observaron una correlación entre el INT y la tasa de respiración como indicativo de actividad microbiana.

Es importante observar que la concentración de la biomasa disminuyó en un inicio debido a la muerte natural de los lodos que no estaban adaptados al tóxico, sin embargo después de algunos ciclos la biomasa se estabilizó mostrando que los microorganismos se aclimataron al compuesto. Durante todos los ciclos que constituyeron la estrategia SBR de tiempo fijo y continuo (fig. 3.6).

Tabla 3.4. SSV e IVL en estrategia SBR de tiempo fijo y Continuo

| | SSV promedio (mg/L) | IVL mínimo (mL/g) |
|------------------------|----------------------------|--------------------------|
| <i>SBR Tiempo Fijo</i> | 1512 | 65 |
| Continuo | 870 | 90 |

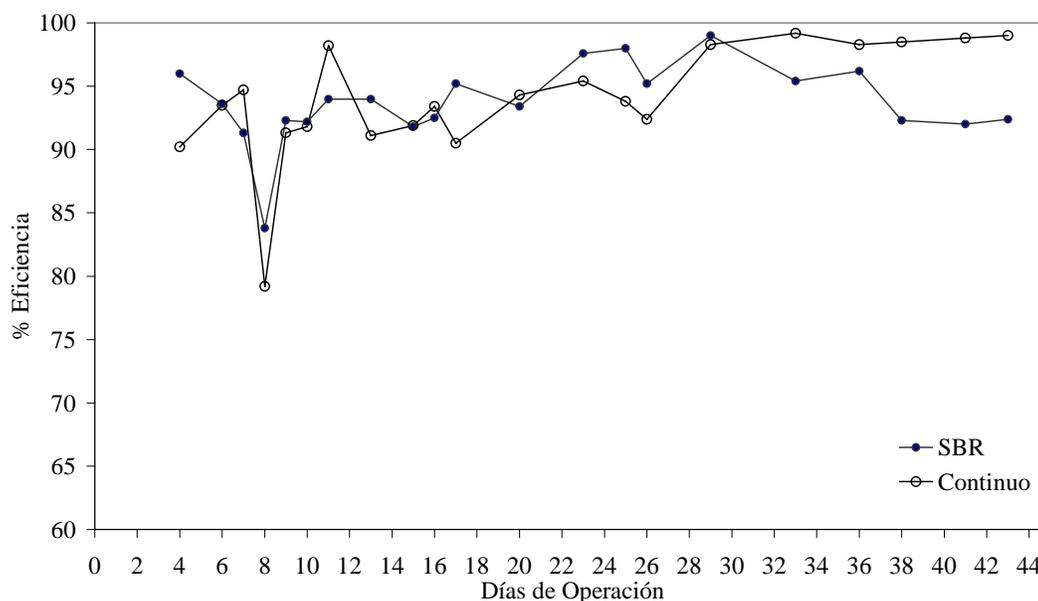


Fig. 3.4. Eficiencias de degradación de 4-CF en la estrategia SBR de tiempo fijo y continuo

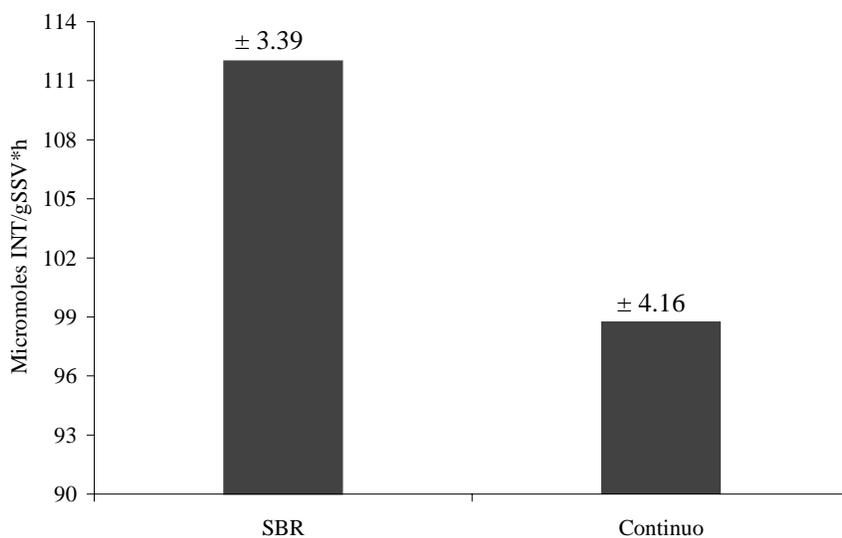


Fig. 3.5. Actividad específica en estrategia SBR de tiempo fijo y continuo

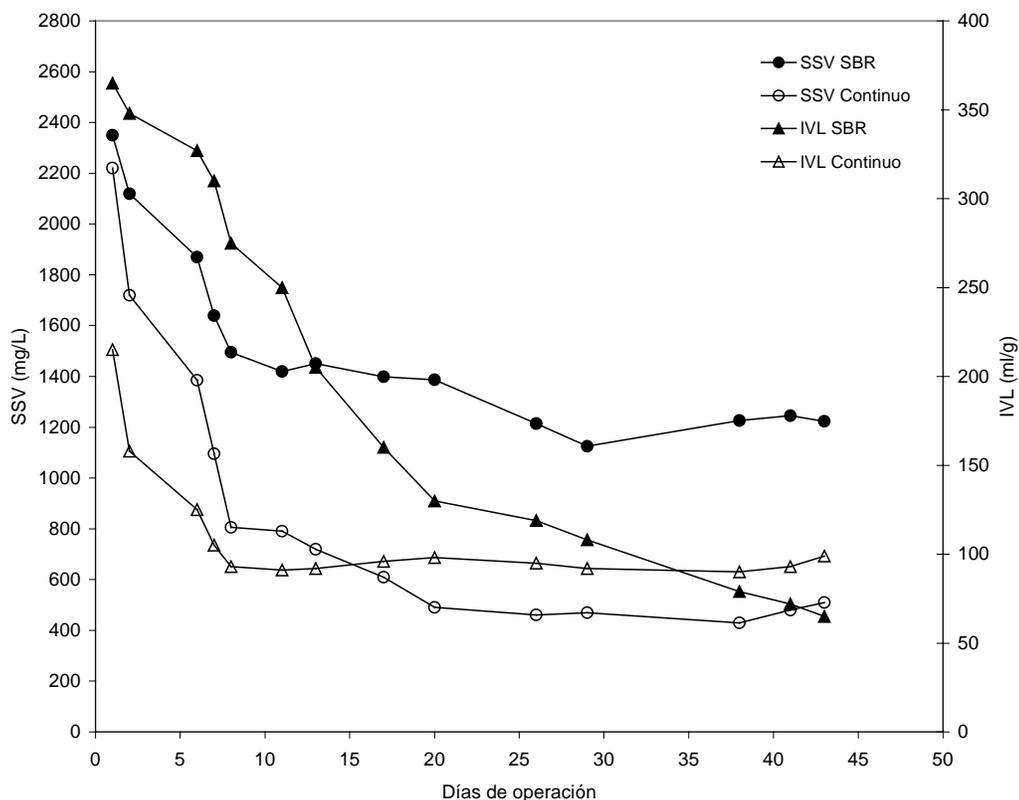


Fig 3.6. Concentración de SSV e IVL en estrategia SBR de tiempo fijo y continuo

Los resultados mostrados en la Tabla 3.4. demuestran que las características de sedimentabilidad (Yu *et al.*, 1996) e incremento de la biomasa de los microorganismos son más favorables en la estrategia SBR de tiempo fijo que en el sistema Continuo. Cabe mencionar que la

disminución del IVL en el reactor SBR también es un indicativo de una baja en los microorganismos filamentosos tanto por la concentración de 100 mg/L de 4-CF como por las características cíclicas del sistema. Mejoras en la calidad de los lodos activados permite un incremento sustancial en la calidad del efluente (Marx *et al.*, 2003).

Moreno-Andrare y Buitrón (2004) obtuvieron un IVL de 240 mL/g en similares condiciones de operación de la estrategia SBR, mientras que Franta *et al.*, (1994) reportan un valor cercano al de este trabajo.

3.1.4. Respirogramas en etapa SBR de tiempo variable

Se puede observar un respirograma de dos diferentes ciclos (fig. 3.7), en donde la pendiente de sustrato (velocidad de reacción) es menor en el ciclo 10 que en el 30 y es posible observar la relación entre el consumo de oxígeno y la degradación del sustrato. La eficiencia de degradación del 4-CF es superior al 95%.

La mínima concentración de OD nos indica el consumo del sustrato como consecuencia de la actividad metabólica de los microorganismos y posteriormente hay una concentración de OD máxima debido a la saturación del agua (Buitrón *et al.*, 2003).

Para el ciclo 10 y 30 se muestra en la tabla 3.3. un incremento en q_v y TMCO conforme transcurren los ciclos. Estas mediciones también están relacionadas con la actividad microbiana.

Tabla 3.5. Valores de q_v y TMCO para el ciclo 10 y 30 de la estrategia SBR de tiempo variable

| | Ciclo 10 | Ciclo 30 |
|-------------------------------|----------|----------|
| q_v (mg 4CF/L·h) | 14 | 48 |
| TMCO (mg O ₂ /L·h) | 9 | 20 |

3.1.5. Actividad específica con respecto al TRH y TRC

Se trabajó tanto en el sistema SBR de tiempo fijo como en el continuo para comparar sus actividades en diferentes TRH y TRC. Se variaron los TRH en 5, 8, 11, 16 y 32 h para cada reactor.

En el reactor continuo el TRC fue de 18 días y en el SBR de tiempo fijo de 34 días. Esta diferencia se presenta básicamente por la mejora en la sedimentabilidad de los lodos en el SBR de tiempo fijo, ya que esto permitió disminuir la cantidad de lodos que se pierden en el efluente. Bernal-Martínez *et al.*, (2000) muestran que un incremento en el TRC es indicativo de una mayor remoción de sustrato.

Los resultados globales de actividad microbiana para el reactor SBR de tiempo fijo fueron de 155 $\mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$, mientras en el reactor continuo fueron de 99 $\mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$. Confirmando que el sistema SBR es el más indicado para incrementar la actividad microbiana. No se encontraron referencias para comparar los resultados obtenidos para el sistema continuo, mientras que para el reactor SBR los resultados son comparados con Trevors (1984) cuyos resultados en acuíferos de agua natural son de 1,605 $\mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$ y Andreottola *et al.*, (2002) indican valores de 748 $\mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$ en una PTAR de aguas doméstica.

La eficiencia de remoción de 4-CF en ambos reactores fue mayor del 99% en todos los TRH, pero en el continuo con TRH = 5 h la eficiencia disminuyó a 79% indicando que este proceso no fue capaz de mantener altas eficiencias de remoción en TRH bajos.

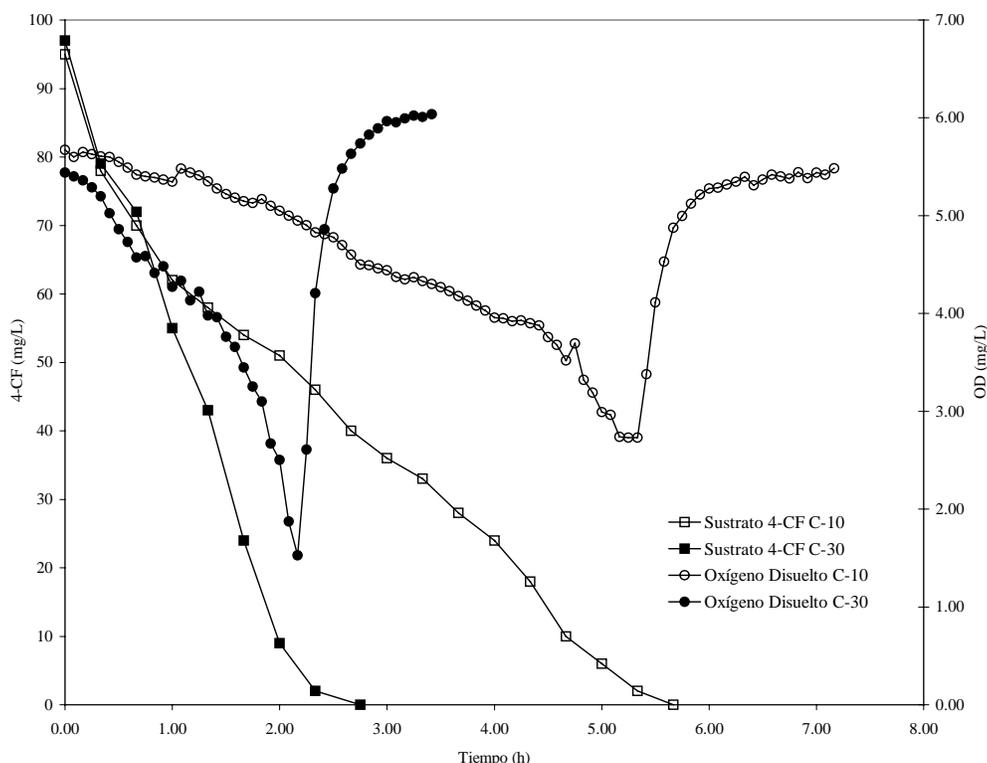


Fig. 3.7. Respirograma Vs. Cinéticas de degradación en SBR de tiempo variable Ciclo 10 y Ciclo 30

Una vez que el SBR de tiempo fijo presentó mejoras en su operación, se siguieron realizando experimentos variando las condiciones de operación en este sistema. Una de las desventajas al fijar el tiempo del ciclo es que no se pueden prevenir perturbaciones, lo cual puede causar incrementos en los tiempos de degradación o disminución en la actividad microbiana, ya que el tiempo establecido no es suficiente para degradar el sustrato, llegando a acumularse y alterar el metabolismo de los microorganismos.

3.1.6. Respirogramas estrategia de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado

Debido a que los respirogramas de la estrategia de tiempo fijo y tiempo variable siguen el mismo patrón se eligió comparar las estrategias que están reguladas por algún tipo de programa computacional, como son la estrategia de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado, para lo cual se realizaron cinéticas de consumo de oxígeno y degradación de sustrato.

En la estrategia de tiempo variable el tiempo de ciclo disminuyó de 1.9 a 1.0 h, debido a la buena aclimatación de los lodos y a la eliminación de los períodos de ayuno en esta estrategia. En la fig. 3.8. se presenta el menor tiempo de degradación de la etapa de tiempo variable donde la actividad microbiana fue de $106 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$, $\text{SSV} = 2288 \text{ mg/L}$ y la $\text{TMCO} = 27 \text{ mg O}_2/\text{L}\cdot\text{h}$.

En la etapa con flujo óptimamente alimentado, el llenado del reactor fue tal que siempre se mantuviera la tasa máxima de eliminación de sustrato. Al regular el flujo de alimentación del influente la concentración inicial es de 25 mg/L 4-CF, con el objeto de mantener la concentración de sustrato en un valor en donde la tasa de crecimiento específico fuese máxima. Con la estimación de la concentración de sustrato, a partir de la medición del OD, se determinó el final de la reacción.

Siendo la alimentación de 175 mg/L de 4-CF, el reactor operó a un volumen mínimo y máximo de 3 y 7 L respectivamente. La estrategia con flujo óptimamente alimentado inició después de 7 días en ciclos SBR con estrategia de tiempo fijo con TRH de 5 h, una actividad microbiana de 77 $\mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$ y un tiempo de degradación de 3 h, lo cual nos habla de una baja actividad de los microorganismos en el inicio de la experimentación.

Al iniciarse la etapa con flujo óptimamente alimentado es notoria una disminución en el tiempo de degradación de 3 a 1.5 h., la actividad microbiana se incrementa hasta 105 $\mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$, siendo la concentración de SSV = 2530 mg/L. La TMO fue de 39 mg $\text{O}_2/\text{L}\cdot\text{h}$ superior a la estrategia de tiempo variable.

En la fig. 3.9 se observa que el OD se mantiene constante durante toda la reacción y aumenta al final de la misma debido a la degradación del sustrato. Siendo su tiempo de degradación de 0.8 h, confirmando que tiene mejores tiempos de degradación que las etapas de tiempo fijo y variable.

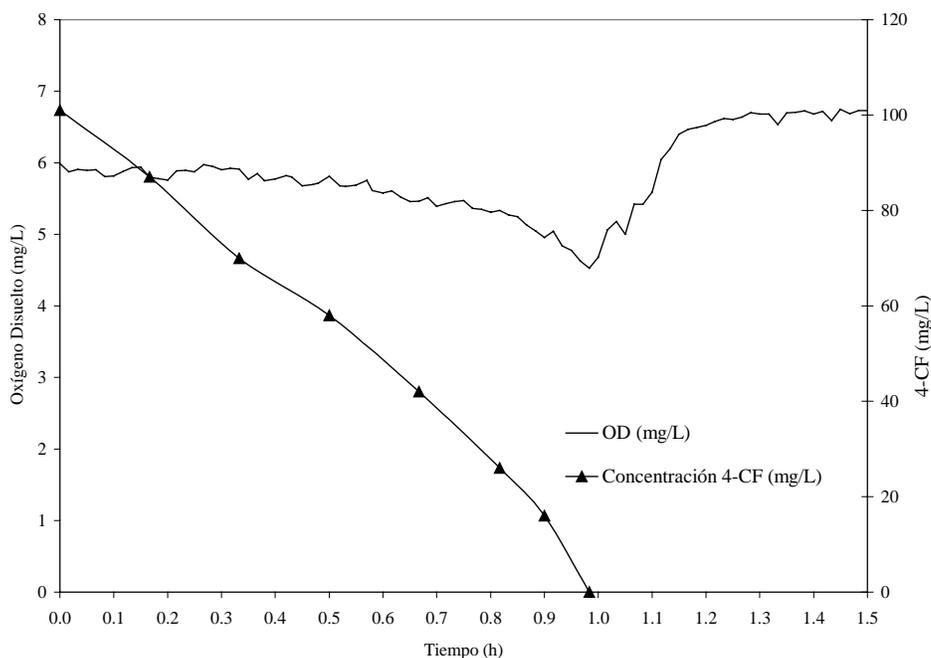


Fig. 3.8. Cinética de degradación y respirograma de estrategia de tiempo variable.

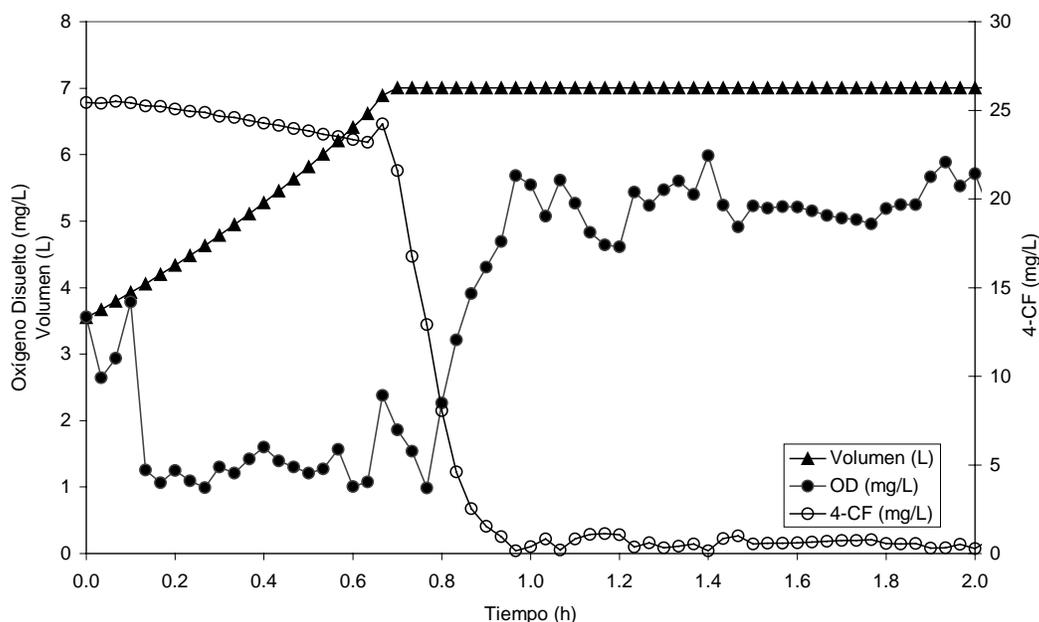


Fig. 3.9. Respirograma durante la estrategia con flujo óptimamente alimentado

En la fig. 3.10. se observa que la medición de OD estimado mediante simulación del modelo matemático es muy similar al obtenido experimentalmente, demostrando que el programa realizó estimaciones muy precisas.

Aunque es posible que el observador realice una baja o alta estimación y en estos casos el llenado puede ser muy lento o demasiado rápido para la actividad de los microorganismos.

3.1.6.1. Carga orgánica y tasas de degradación

Se obtuvo una B_{ve} máxima de $2.6 \text{ kg DQO/m}^3 \cdot \text{d}$ en la estrategia de tiempo variable, cuatro veces más a las obtenidas durante la estrategia SBR de tiempo fijo ($0.65 \text{ kg DQO/m}^3 \cdot \text{d}$) comparado con los resultados de $0.037 \text{ kg DQO/m}^3 \cdot \text{d}$ que obtuvieron Bazaldúa *et al.*, (1996) para un reactor SBR. La B_{ve} máxima en la estrategia con flujo óptimamente alimentado fue de $4 \text{ kg DQO/m}^3 \cdot \text{d}$. En la fig. 3.11 se observa que la B_{va} fue prácticamente igual a la B_{ve} (con un coeficiente de correlación cercano a uno) porque las eficiencias de degradación del 4-CF son cercanas al 100%, esto se debió a la estrategia de operación del reactor, donde no importaba cuánto tiempo durase la degradación siempre y cuando las eficiencias se mantuviesen constantes.

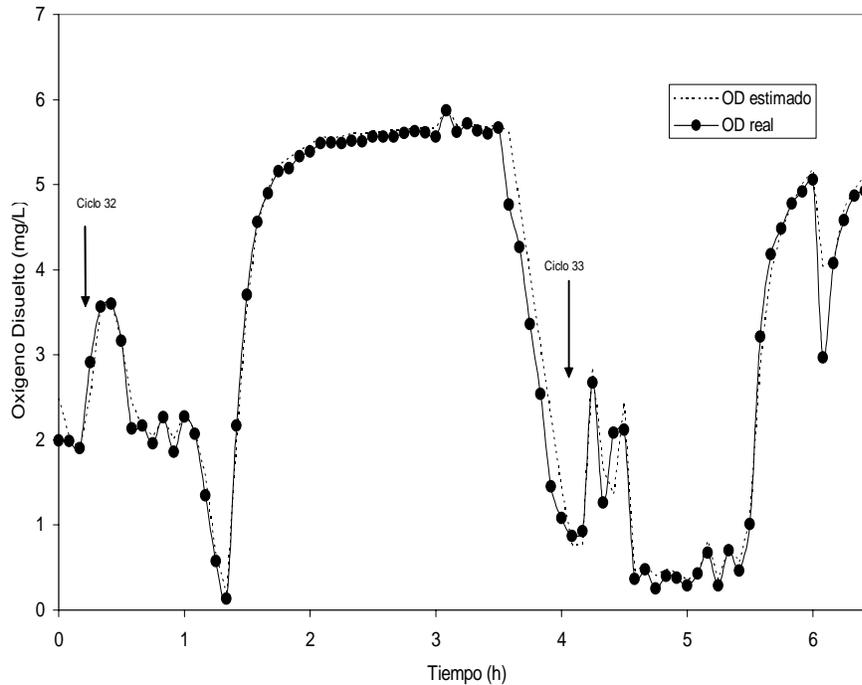


Fig. 3.10. Comparación de OD estimado y real en estrategia con flujo óptimamente alimentado.

En la fig 3.12 se observa la evolución de la biomasa e IVL en la estrategia con flujo variable donde se tiene una concentración promedio de SST de 3120 mg/L. Inicialmente las propiedades de sedimentación no fueron las más adecuadas, con un IVL de 134 mL/g. A pesar de ello, las características de sedimentación tuvieron una recuperación rápida y se observó una disminución en el IVL hasta lograr valores de 77 mL/g.

En la estrategia con flujo variable (fig. 3.13), la tasa de degradación específica (q_x) promedio fue de 24 mg 4-CF/g SSV·h y la tasa de degradación volumétrica (q_v) tuvo un promedio de 62 mg 4-CF/L·h.

Por su parte, en la fig. 3.14 se observa la evolución de los SST e IVL en la estrategia con flujo óptimamente alimentado, teniendo un promedio de SST de 3220 mg/L mostrando un incremento sustancial de 4000 mg/L en algunos ciclos, lo cual muestra que esta estrategia favorece la reproducción de los microorganismos.

Además el IVL llegó hasta valores de 63 mL/g menor a los de las anteriores estrategias, lo que indica la posibilidad de reducir significativamente el tiempo de la fase de sedimentación y decantación.

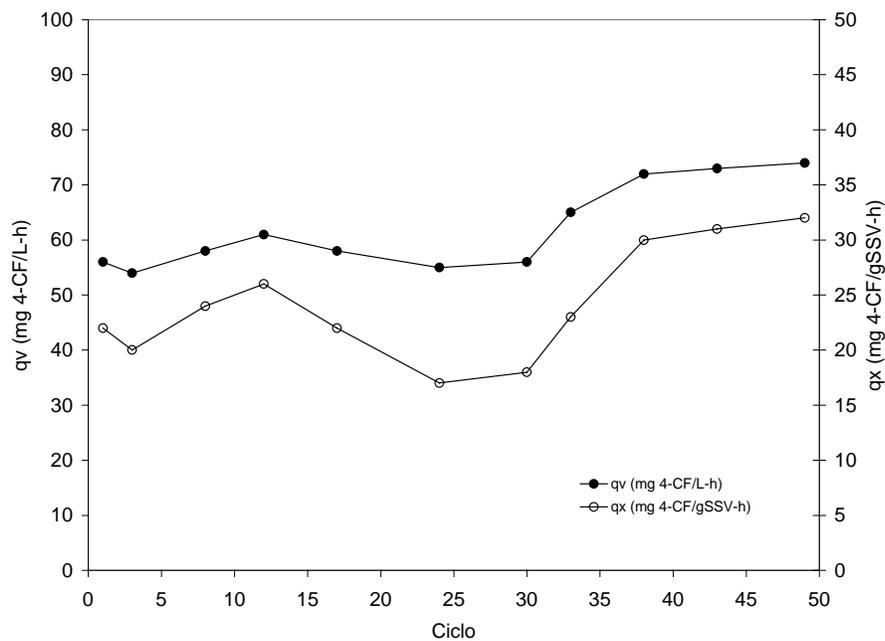


Fig. 3.11. Carga orgánica aplicada Vs. eliminada durante la estrategia con flujo óptimamente alimentado

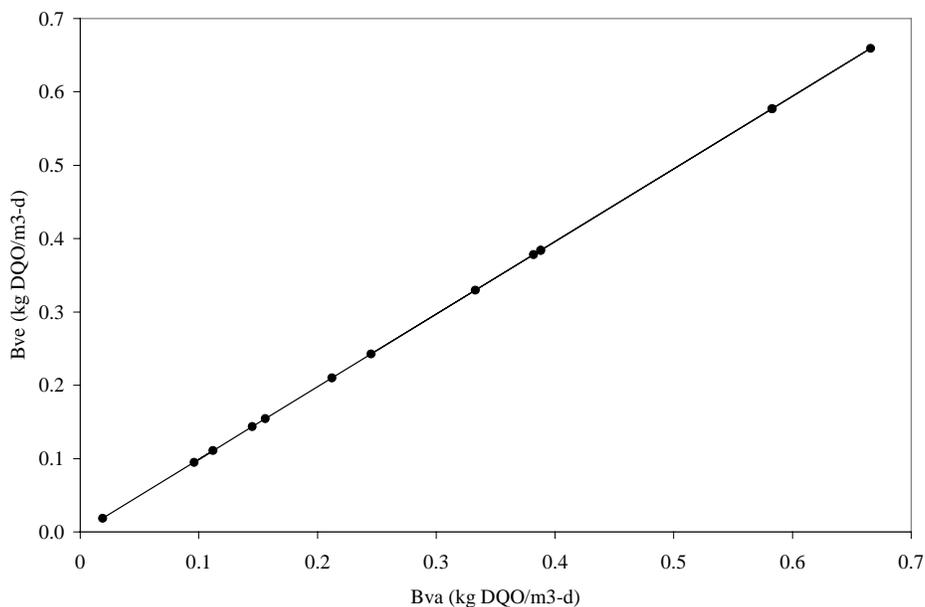


Fig 3.12. Evolución de la biomasa e IVL en estrategia con flujo variable

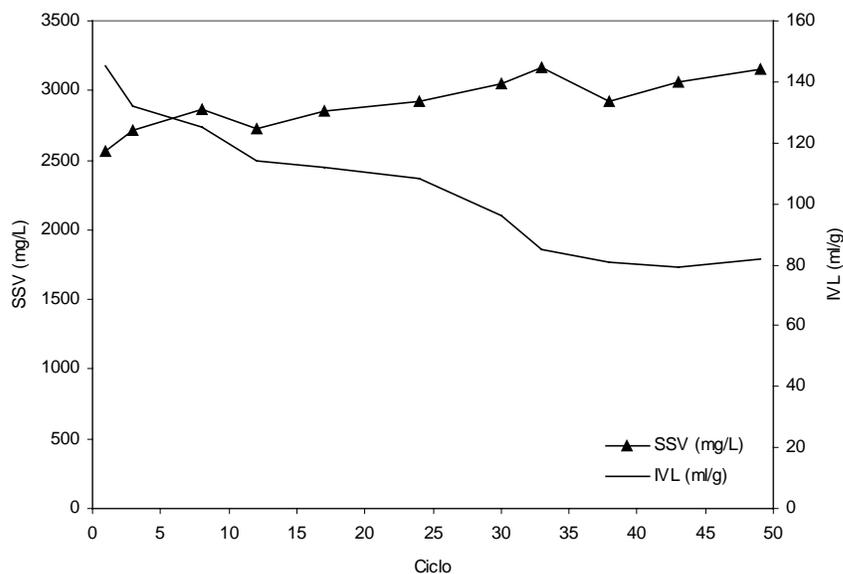


Fig. 3.13 Tasa de degradación específica y volumétrica para estrategia con flujo variable

Se muestra en la fig. 3.15 las tasas de degradación específica y volumétrica de la estrategia con flujo óptimamente alimentado, donde la q_x y q_v promedio fueron de 28 mg 4-CF/g SSV·h y 77 mg 4-CF/L·h respectivamente, valores mayores que en la estrategia de tiempo variable. Las eficiencias de remoción fueron mayores al 99% en ambas estrategias.

Aunque no se lograron las tasas de degradación específicas máximas reportadas por Buitrón y Capdeville (1995) de 105 mg 4-CF/g SSV-h, las de degradación volumétrica son muy similares, las cuales son muy importantes en el funcionamiento de los reactores. Lo anterior se puede explicar por diferencias en la actividad, origen y composición del inóculo así como la estrategia de aclimatación.

3.2. Evaluación de la actividad microbiana en la estrategia de tiempo fijo

3.2.1. Correlación de la actividad microbiana con el consumo de sustrato y oxígeno

Se midió la actividad microbiana a través de la ADH y se realizó una cinética en el ciclo 45, encontrando una correlación con la evolución del OD. Se observó que la actividad microbiana aumenta cuando se añade el sustrato y llega a un punto máximo que corresponde al agotamiento de sustrato y al punto mínimo de OD (fig. 3.16). Aunque se observa que la actividad microbiana no desciende completamente lo que muestra una baja en la actividad metabólica, es importante mencionar que es necesario un período de tiempo para alcanzar su estado inicial, el cual debe ser tomado en cuenta antes del inicio de un nuevo ciclo.

Dada la variación de la ADH durante un ciclo, para el seguimiento de esta variable se tomó, en todos los casos, en el punto máximo de la curva para tener un patrón de comparación.

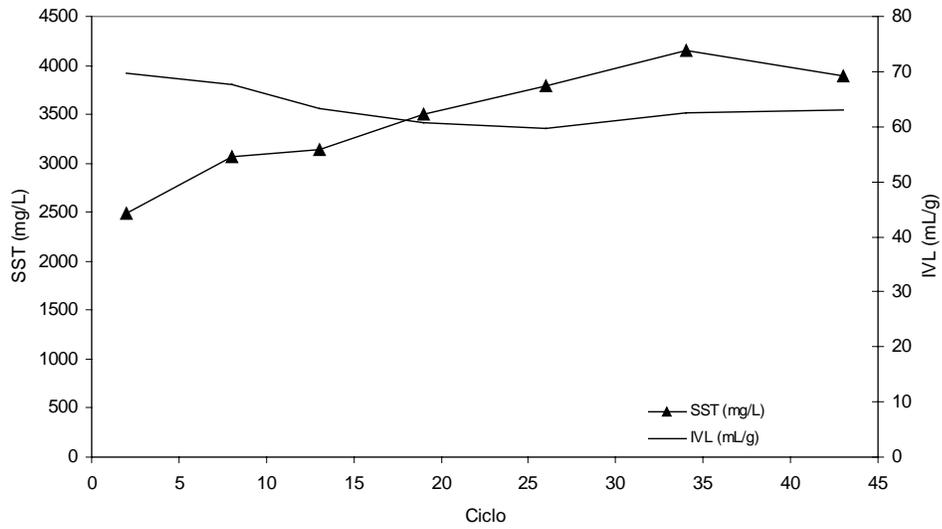


Fig. 3.14 Evolución de la biomasa e IVL en estrategia con flujo óptimamente alimentado

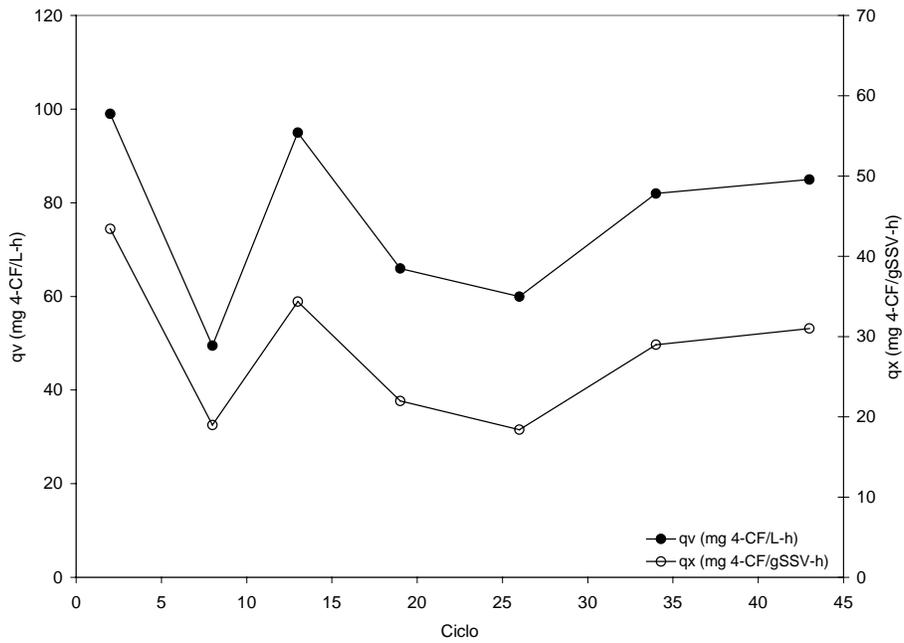


Fig. 3.15 Tasa de degradación específica y volumétrica en estrategia con flujo óptimamente alimentado

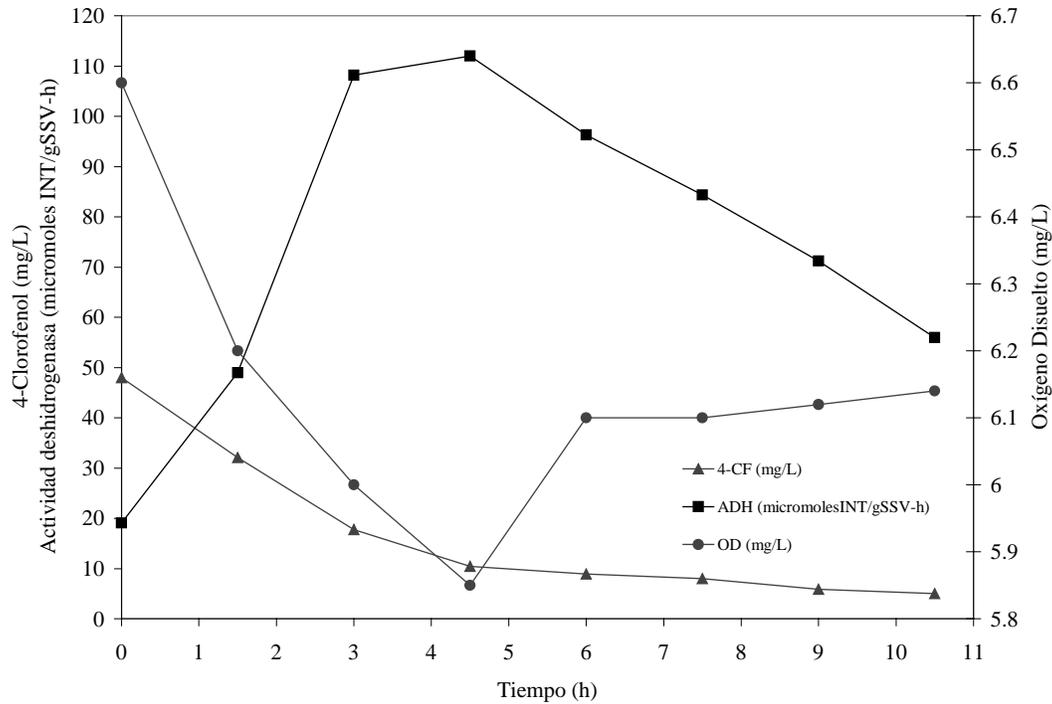


Fig. 3.16. Correlación de actividad microbiana y consumo de sustrato y OD (SSV=1200 mg/L)

A continuación se analizará la relación entre actividad microbiana y OD, así como el consumo de sustrato.

3.2.2. Variación de la actividad en las estrategias de tiempo fijo y Continuo

Para la estrategia de tiempo fijo la actividad microbiana se mantiene en un promedio de 112 μm INT/gSSV·h, mientras que en el continuo fue de 99 μm INT/gSSV·h (fig.3.17). En el sistema SBR el tiempo de reacción disminuye de 20 a 1 h. El promedio de los SSV es de 1512 en el SBR y 870 mg/L en el continuo. Bazaldúa *et al.*, (1996) muestran actividades microbianas máximas de 25 μm INT/gSSV·h en un sistema SBR, por debajo a las reportadas en este trabajo.

En la Fig. 3.17 se muestra que la estrategia SBR de tiempo fijo tiene mayor actividad microbiana que el continuo. Moreno y Buitrón (1996) indican que una de las ventajas de la estrategia SBR es crear un consorcio de microorganismos con altos rendimientos. Caravelli *et al.*, (2004) realizaron experimentos en un reactor continuo para analizar el efecto del cloro a concentraciones de 6.0 mg Cl_2/L en lodos activados, químico frecuentemente utilizado para disminuir microorganismos filamentosos, y poder cuantificar la actividad microbiana a través de INT, sus resultados son 10 veces mayores a los reportados en este trabajo.

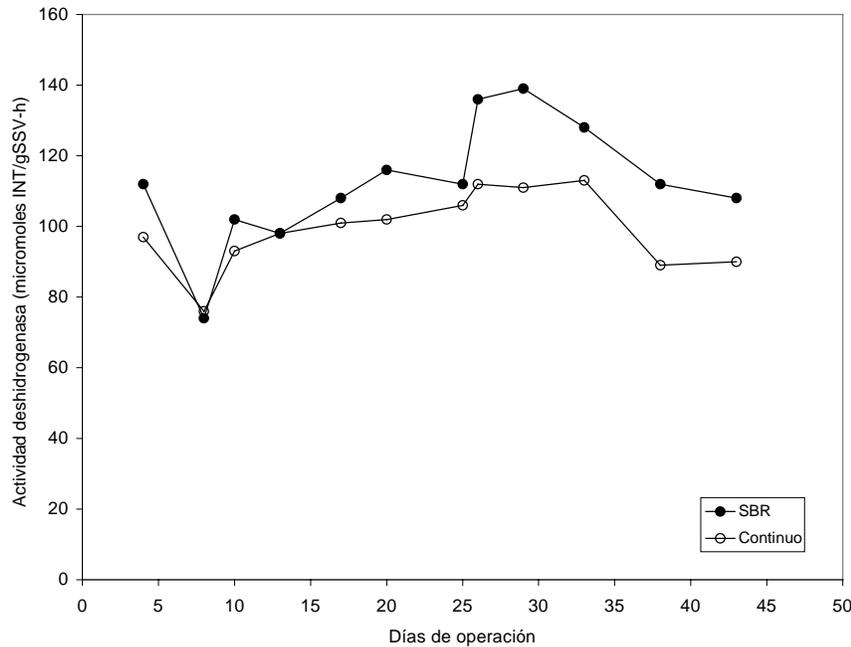


Fig. 3.17. Actividad microbiana en estrategia de tiempo fijo vs. continuo

3.2.3. Variación de la actividad en las estrategias de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado

Durante la estrategia de tiempo variable la actividad microbiana se mantiene en un promedio de $99 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$. Mientras que los tiempos de reacción bajan de 20 hasta 1.6 h dando en los últimos ciclos un tiempo máximo de 2 h (fig. 3.18). El promedio de los SSV es de 2313 mg/L y el IVL es de 55 ml/g.

En esta estrategia los lodos se aclimatan hasta el ciclo 26 con un temporizador y después trabajan completamente con la estrategia con flujo óptimamente alimentado.

En el ciclo 27 de la estrategia con flujo óptimamente alimentado, se observa que la actividad microbiana alcanza los $190 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$ (fig 3.18), mientras que la duración del tiempo de degradación llega a 1 h. El promedio de actividad microbiana es igual a $166 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$, lo cual representa un incremento del 60% en comparación con la estrategia de tiempo variable, ya que en esta estrategia la μ_{max} se trató de mantener lo más alto posible y los períodos de ayuno se eliminaron. Trevors (1984) reporta valores 10 veces mayores en acuíferos de agua natural siendo sus resultados $1,605 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$ en estos ambientes naturales es más alta la actividad microbiana debido a las condiciones favorables que presentaban de disponibilidad de nutrientes y ausencia de tóxicos. Andreottola *et al.*, (2002) realizaron experimentos para determinar la actividad microbiana en una PTAR de aguas domésticas, sus resultados son de $748 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$, 4 veces mayores a los mostrados en este trabajo, lo cual indica la influencia que tienen los compuestos recalcitrantes en la actividad de los microorganismos.

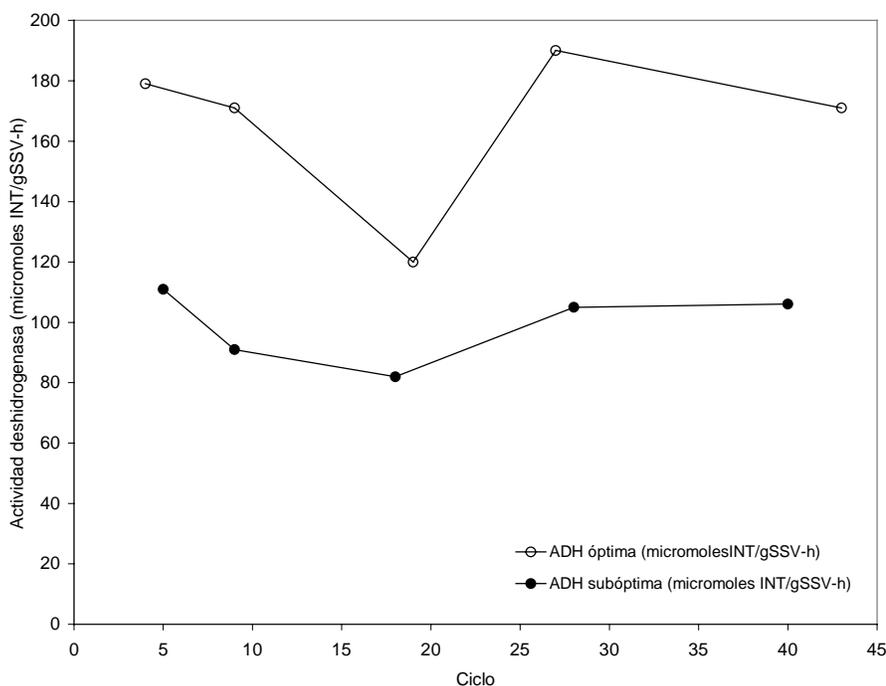


Fig. 3.18. Actividad microbiana en estrategia de tiempo variable y con flujo óptimamente alimentado

3.2.4. Relación de los períodos de ayuno y tiempo de degradación

Se estudió la influencia del período de ayuno en los microorganismos sobre el tiempo de degradación de 100 mg/L de 4-CF. Para ello se dejó en el ciclo 24, de la estrategia de tiempo fijo, transcurrir un ayuno de 14 h (fig 3.19). Se puede observar que antes del ayuno la degradación era de 2.5 h, mientras que después del mismo éste aumentó a 3.5 h. Moreno y Buitrón (2004) mostraron que después de un ayuno de 20 a 23 horas el tiempo de degradación se incrementó de 0.7 a 4.5 h con las mismas concentraciones de 4-CF.

Así mismo Buitrón y Torres (1998) nos indican que la viabilidad de los microorganismos disminuye al aumentar el tiempo de ayuno.

3.2.5. Evolución de la actividad para las estrategias de flujo óptimamente alimentado y de tiempo fijo

Se comparó la evolución de la actividad microbiana en un reactor operado con la estrategia con flujo óptimamente alimentado y la de tiempo fijo operado en ciclos de 24 h. Una vez aclimatada la biomasa, ésta se repartió en dos reactores (2350 mg SSV/L) y cada uno se operó ya sea con la estrategia con flujo óptimamente alimentado o la de tiempo fijo. Ambos reactores operaron a temperatura constante de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y un volumen de intercambio del 75%.

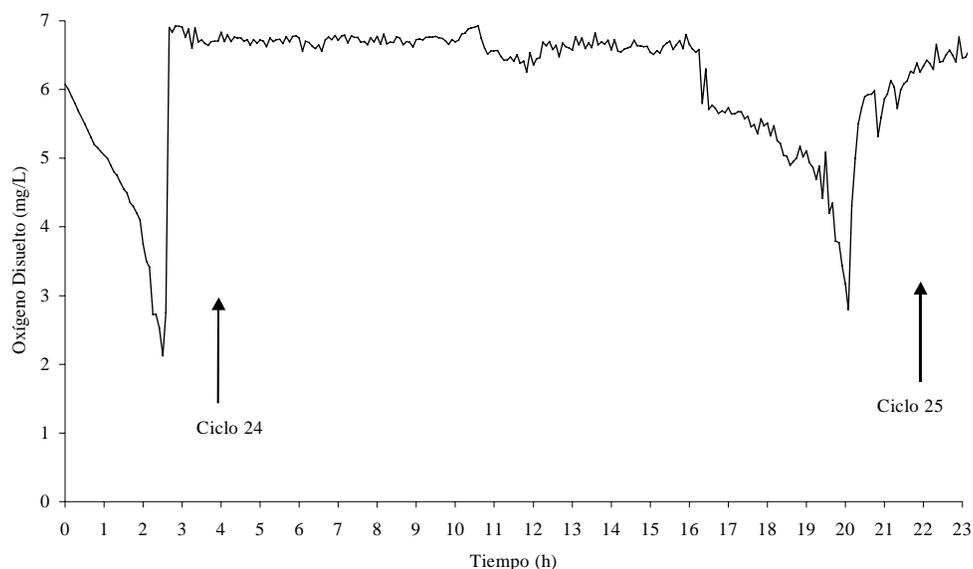


Fig. 3.19. Respirograma en estrategia de tiempo fijo durante un período de ayuno=14 h

Se observaron mejoras en las variables de proceso para la estrategia con flujo óptimamente alimentado, lo mismo sucedió con las características de la biomasa.

En la fig. 3.20 se observa que al inicio la actividad microbiana fue similar en ambas estrategias y conforme transcurren los días de operación se hizo notorio un incremento en la estrategia con flujo óptimamente alimentado comparada con la de 24 h, lo que vuelve a confirmar que este tipo de operación no es la más adecuada para mantener alta la actividad de los microorganismos.

3.3. Evolución de un metabolito

Durante la estrategia con flujo óptimamente alimentado se observó la aparición de un metabolito el cual se contabilizó como unidades de absorbancia a 380 nm. Se realizaron cinéticas donde se muestra que el punto máximo de concentración de metabolito coincide con la disminución de la actividad microbiana.

La degradación del 4-CF es vía catecol, el cual a su vez puede degradarse por un rompimiento orto o meta en el anillo (Parson y Commandeur, 1990). Cuando el rompimiento es meta se genera un metabolito de color amarillo verdoso, el ácido semialdehído 5-cloro 2 hidroximucónico. Este compuesto se presentó en los ciclos intermedios de la aclimatación y apareció en la fase final de la reacción, ocasionando un incremento en los tiempos de degradación (fig. 3.21).

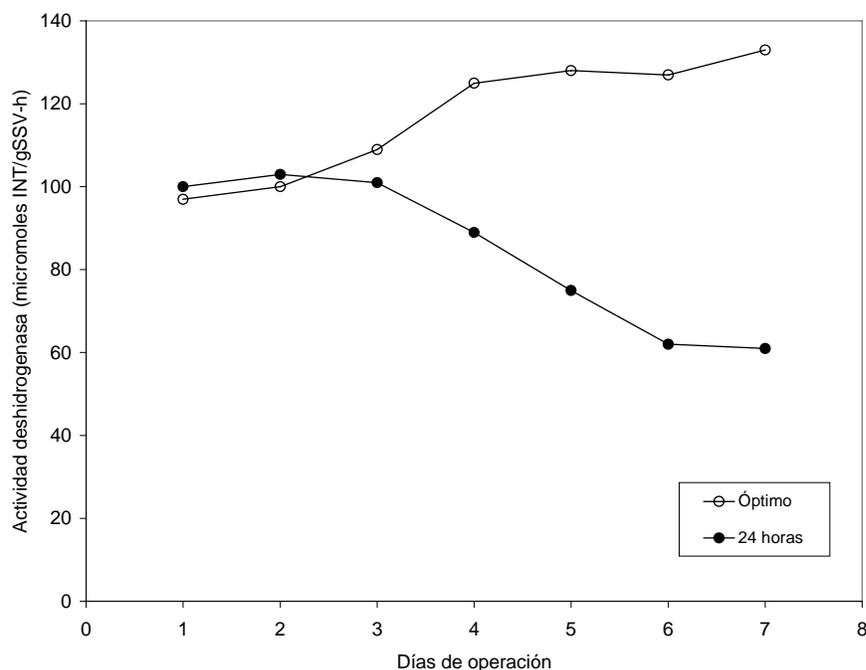


Fig. 3.20. Actividad microbiana en estrategia con flujo óptimamente alimentado vs. Tiempo fijo de 24 h

Al realizarse una subestimación de los parámetros, el sustrato real estaba muy por debajo del estimado generándose el metabolito que además de incrementar el tiempo de reacción, el observador no fue capaz de detectar por lo que podría terminar la reacción antes de que sea degradado, lo que originaría su acumulación disminuyendo la actividad de los microorganismos.

En los ciclos 1 y 2 (fig. 3.21) se observa que el OD llegó a la saturación después de que la degradación de 4-CF se completó, sin embargo aún se tuvo la presencia del metabolito. Para solucionar el problema de la acumulación del metabolito se agregó un periodo de tiempo necesario para que este desaparezca. Esta duración depende de la actividad microbiana y debe ser fijada según observaciones experimentales

Si la reacción se concluye cuando se ha degradado el 4-CF y aún existe metabolito, se empezaría a acumular provocando inhibición de los microorganismos. Debido a que la aparición de este compuesto no fue contemplada en el modelo de control, se agregó una etapa que comprende el tiempo necesario para permitir la degradación del metabolito por los microorganismos.

Este comportamiento se presentó en algunos ciclos de las diferentes estrategias de control, durante los primeros ciclos de un cambio de operación del reactor o cuando se operó a muy bajas concentraciones. Algunos estudios han mostrado que la aparición de este metabolito es debida a un problema operacional y por lo tanto a una desaclimatación de los microorganismos al sufrir un ayuno (Buitrón *et al*, 2003, Moreno-Andrade y Buitrón, 2004).

Posiblemente, la formación del metabolito se debió al desarrollo de una enzima presente en el inóculo, que se activó cuando el sistema sufrió alguna alteración.

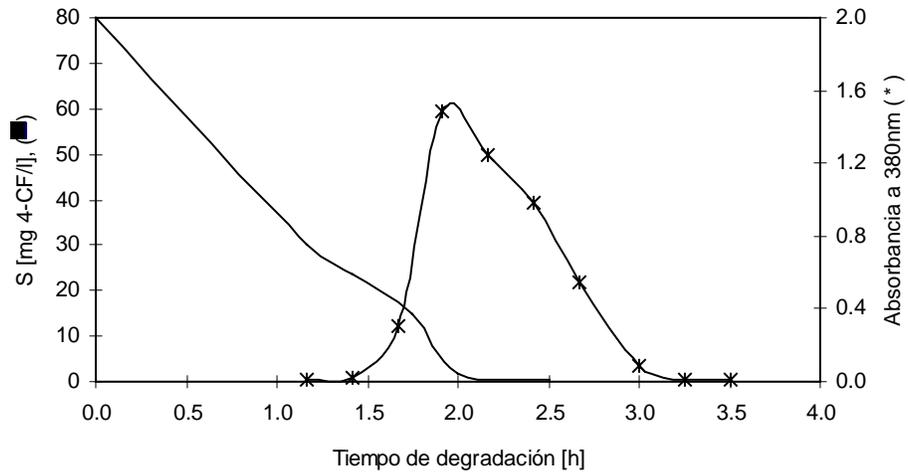


Fig. 3.21. Cinética de degradación de 4-CF y metabolito en estrategia SBR de tiempo fijo

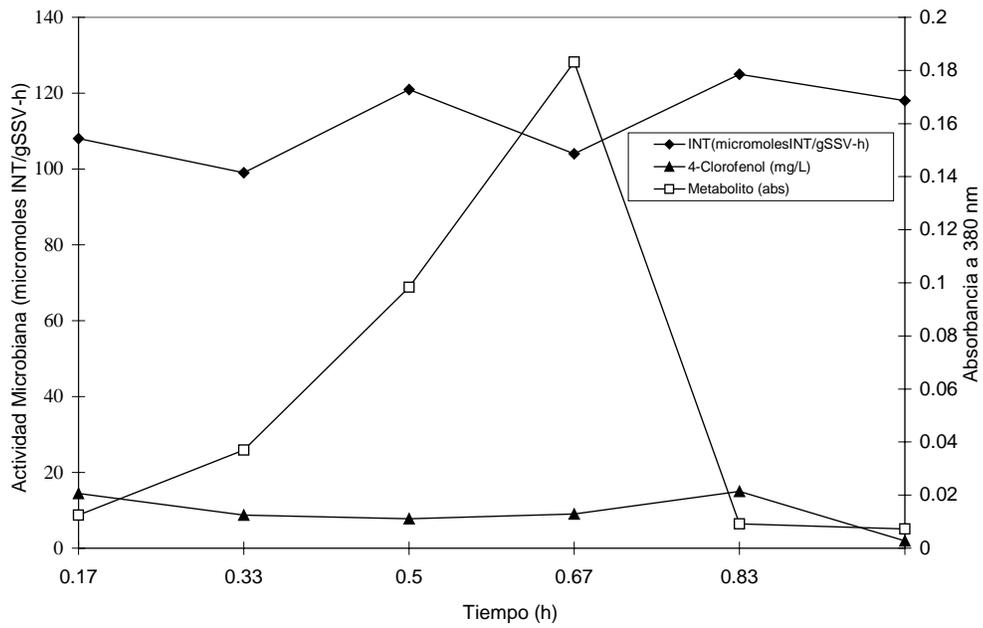


Fig. 3.22 Cinética de actividad microbiana y metabolito en estrategia con flujo óptimamente alimentado

Durante la cinética de degradación del 4-CF se observa la aparición del metabolito y también se detecta un ligero descenso en la actividad microbiana (Fig. 3.22).

Capítulo 4

CONCLUSIONES

En general los valores más elevados de actividad microbiana se obtuvieron para los procesos discontinuos estudiados durante la degradación de 4-CF. De las tres estrategias probadas en modo SBR, la mejor fue la de flujo óptimamente alimentado, pues la actividad microbiana fue mayor, así como menor el tiempo de degradación. Al comparar la actividad específica del reactor continuo y SBR se observó que éste último mostraba valores mayores lo cual indicó su potencial por el modo de operación, lo cual se debe a que este sistema se caracteriza por un consorcio de microorganismos adaptado a las variaciones cíclicas donde se seleccionaron microorganismos con una alta actividad.

Se logró una eficiente aclimatación del sistema al operarlo en modo discontinuo. Después de 27 días el reactor estaba completamente aclimatado. La etapa de aclimatación concluye cuando son constantes los tiempos de degradación, llegando hasta valores de 1.5-2 h y hay una mejora en las características de sedimentación y reproducción de la biomasa para operar de manera automática el sistema. Se logró mejorar la actividad de la biomasa al implantarse la estrategia con flujo óptimamente alimentado. Las eficiencias de remoción en todas las estrategias de SBR fueron mayores al 90% como 4-CF.

En el sistema continuo con TRH de 32 h, la actividad microbiana promedio fue de $99 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$, los $\text{SSV} = 870 \text{ mg/L}$ y el $\text{IVL mínimo} = 90 \text{ ml/g}$. Cuando se utilizó un TRH de 5 h en disminuyó la eficiencia de remoción de 4-CF en el reactor continuo indicándonos que este proceso no es capaz de trabajar con tiempos de retención hidráulica bajos, lo que implicaría volúmenes de tanque mayores.

Para el SBR operado con la estrategia de tiempo fijo y TRH de 32 h, la actividad microbiana fue de $112 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$, los $\text{SSV} = 1512 \text{ mg/L}$ y el $\text{IVL mínimo} = 65 \text{ ml/g}$. La tasa máxima de consumo de oxígeno llega hasta valores de $19.97 \text{ mgO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$. Mientras que la tasa de degradación volumétrica fue de $48 \text{ mg 4-CF/L}\cdot\text{h}$.

En la estrategia de tiempo variable la actividad microbiana fue de $99 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$, los $\text{SSV} = 2313 \text{ mg/L}$, el $\text{IVL} = 55 \text{ ml/g}$ y las tasas de degradación volumétrica fueron de $62 \text{ mg 4-CF/L}\cdot\text{h}$. Se obtuvo en la estrategia de tiempo variable una carga orgánica eliminada máxima de $2.6 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{d}$, 4 veces más a la obtenida durante la estrategia de tiempo fijo.

La actividad microbiana en la estrategia con flujo óptimamente alimentado = $166 \mu\text{m INT/gSSV}\cdot\text{h}$, los $\text{SSV} = 3220 \text{ mg/L}$ y el $\text{IVL} = 63 \text{ ml/g}$ y la tasa de degradación volumétrica = $77 \text{ mg 4-CF/L}\cdot\text{h}$. La carga orgánica eliminada llegó hasta un valor de $4 \text{ kg DQO/m}^3\cdot\text{d}$, siendo el mayor valor de todas las estrategias. Los valores de actividad microbiana muestran un incremento considerable con respecto a la estrategia de tiempo variable y tiempo fijo.

La actividad microbiana tiene buena correlación con el consumo de sustrato y OD, lo cual se observó cuando coincide la máxima actividad microbiana con el punto mínimo de concentración de sustrato y OD. Uno de los problemas al comparar los resultados obtenidos fue la escasa literatura científica y experimentación realizada en sistemas continuos y SBR que degradan clorofenoles, con

respecto a la actividad microbiana medida como INT y la diferencia en las unidades de esta medición reportadas en la literatura.

La estrategia SBR con tiempos de ciclo fijos presenta algunos inconvenientes como son: ayunos cuando el ciclo es demasiado largo y acumulación de sustrato si el tiempo de degradación es muy corto dando como resultado la inhibición de los microorganismos. Al utilizar el OD como herramienta para hacer un seguimiento de la reacción se evitaron los inconvenientes de la estrategia anterior, aunque es necesario conocer la concentración inicial de sustrato.

Las medidas de control de la concentración de sustrato y la tasa de respiración no son suficientes para describir el final de los procesos de biodegradación. Al parecer la actividad microbiana dentro de la célula continúa por un periodo de tiempo mayor. Es necesario permitir el final de las reacciones metabólicas para evitar fallas en el sistema.

Se sugiere el poder escalar la experimentación en sistemas donde sea posible acercarse más al modo de funcionamiento de una PTAR real.

REFERENCIAS

- Adani, F., G. Gigliotti, F. Valentini y R. Laraia. (2003). Respiration index determination: a comparative study of different methods. *Comp. Sci. Util.* 11(2). 144-151.
- AFNOR. Evaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles, Normalisation française, (1985). NFT 90-312.
- Alexander, M. Biodegradation and Bioremediation. (1999) 2^a edición. Academic Press. San Diego, Cal. 17-40.
- Antreottola, G., Baldassarre, L., Collivignarelli, C., Pedrazzani, R., Principi, P., Sorlini, C., Ziglio, G. (2002) A comparison among different methods for evaluating the biomass activity in activated sludge systems: preliminary results. *Wat. Sci. Tech.* **46** (1-2), 413-417.
- Arbuckle W.B. y M.S. Kennedy (1989) Activated sludge response to a parachlorophenol transient. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, **61**, 476-480.
- Atlas, R. M., y R. Bartha (1993) Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. The Benjamin/Cummings. EUA. 383-399.
- Bauer, E., C. Pennerstorfer, P. Holubar, C. Plas y R. Braun. (1991) Microbial activity measurement in soil – a comparison of methods. *J. Micro. Meth.* **14**, 109-117.
- Bazaldúa, R., L. García, G. Buitrón. (1996) Operación de un proceso discontinuo secuencial (SBR) adicionado con carbón activado granular para la biodegradación de compuestos fenólicos. Memorial del XXV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. **1** (2), 601-607.
- Bernal-Martínez, A., Ó. González-Barceló y S. González-Martínez (2000) Nutrient removal and sludge age in a sequencing batch reactor. *Bio. Eng.* **23**, 41-45.
- Bitton, G., B. Koopman, K. Jung, G. Voiland. (1993) Modification of the standard epifluorescence microscopic method for total bacterial counts in environmental samples. *Wat. Res.* **27** (7), 1109-1112.
- Buitrón, G., Capdeville B y Horny P. (1994) Improvement and control of the microbial activity of a mixed population for degradation of xenobiotic compounds. *Wat. Sci. Tech.*, **29**, 317-326.
- Buitrón, G., Capdeville B. (1995) Enhancement of the biodegradation activity by the acclimation of the inoculum. *Environ. Tech.*, **16**, 1175-1184.
- Buitrón, G., González A. y López-Marín L.M. (1997) Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. 2nd International Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes, Berkeley, 21-23 July.
- Buitrón, G. (1993) Biodégradation de composés xénobiotiques par un procédé discontinu de type SBR. Tesis de Doctorado, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Francia. 108-164.
- Buitrón, G. y A.R. Torres (1998) Influencia de la variación temporal del sustrato sobre la biodegradación de compuestos tóxicos. XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Lima, Perú.
- Buitrón, G., Moreno G. y Quezada, M. (2000) Operación de una planta de lodos activados; medidas y diagnósticos rápidos. Manual. Tomo 1-2. Centro mexicano de capacitación en agua y saneamiento, A.C. México.
- Buitrón, G., Schoeb, M.E., y Moreno, J. (2003) Automated sequencing batch bioreactor under extreme peaks of 4-chlorophenol. *Wat. Sci. Tech.* **47** (10), 175-181.
- Buitrón, G., Schoeb, M.E., Moreno-Andrade, I., y Moreno, J. (2005) Evaluation of two control strategies for a sequencing batch reactor degrading high concentration peaks of 4-chlorophenol. *Wat. Res.* **39**, 1015-1024.

- Caravelli, A., L. Giannuzzi y N. Zaritzky (2004) Effect of chlorine on filamentous microorganisms present in activated sludge as evaluated by respirometry and INT-dehydrogenase activity. *Wat. Res.* **38**. 2395-2405.
- Coello, M.D. J.A. López-Ramírez, D. Sales, y J.M. Quiroga (2003) Evolution of an activated sludge system under starvation conditions. *Chem. Engin. Journal.* **94**. 139-146.
- Coopley, S.D. (2000). Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. *Tren. Biochem. Sci.* **25**. 261-265.
- Chang-won, B., Koopman, G. Bitton. (1994) INT-Dehydrogenase activity test for assessing chlorine and hydrogen peroxide inhibition of filamentous pure cultures and activated sludge. *Wat. Res.* **28** (5), 1117-1121.
- Dudley, J., D.L. Russel, Y. Amerlinck. (2004). Models SBRs. *Wat. Environ. Tech.* **16** (9), 63-67
- Engelen, B., K. Meinken, K., F. von Wintzingerode, H. Heuer, H.P. Malkomes y H. Backhaus (1998) Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Micro.* **64**. 2814-2821.
- Eckenfelder, Jr., W.W. y Musterman, J.L. (1995) Activated sludge treatment of industrial wastewater. Technomic Publishing Company. Lancaster. Pennsylvania.
- Fetzner, S. y F. Lingens. (1994) Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Micro. Rev.* **58** (4).
- Franta, J., P.A. Wilderer, K. Miksch y V. Sykora (1994) Effects of operation conditions on advanced COD removal in activated sludge systems. *Wat. Sci. Tech.* **29** (7), 189-192.
- Frolund, B., T. Griebe y P.H. Nielsen. (1995) Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl. Micro. Biotech.* **43**, 755-761.
- Hill, G.A., B.J. Milne, y P.A. Nawrocki (1996) Cometabolic degradation of 4-chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Micro. Biotech.* **46**, 168-168.
- Hutzinger, O., y W. Veerkamp. Xenobiotic Chemicals with Pollution Potential. en Leisinger, T., R. Hütter, A.M. Cook, J. Nüesch. (1981) Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. Academic Press.
- Inbar, Y., M.J. Boehm, y H.A.J. Hoitink (1991) Hydrolysis of fluorescein diacetate in sphagnum peat container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Soil Biol. Biochem.* **23**, 479-483.
- Ishiyama, M., M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizoguchi, P. He. (1993) A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem. Pharm. Bull.* **41** (6), 1118-1122.
- Jansson, J.K. y J.I. Prosser (1997) Quantification of the presence and activity of specific microorganisms in nature. *Mol. Biotech.* **7**, 103-120.
- Johnsen, A.R., K. Bendixen y U. Karlson. (2002). Detection of microbial growth on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Microtiter Plates by using the respirator indicator WST-1. *Appl. Environ. Micro.* **68** (6), 2683-2689.
- Jorgensen, P.E., T. Eriksen y B.K. Jensen. (1992) Estimation of viable biomass in water research and activated sludge by determination of ATP, oxygen utilization rate and FDA hydrolysis. *Wat.Res.* **26** (11), 1495-1501.
- Karl, D.M. (1993) Total microbial biomass estimation derived from the measurement of particulate adenosine-5'-triphosphate, p. 359-368. P.F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, y J. J. Cole (ed), Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Lewis Publishers, Boca Raton, Flo.
- Katsifas, E.A., T.G. Koraki y A.D. Karagouni. (2000) Determination of metabolic activity of streptomycetes in soil microcosms. *J. Appl. Micro.* **8**, 178-184.

- Kim, C.W., B. Koopman y G. Bitton (1994) INT-dehydrogenase activity test for assessing chlorine and hydrogen peroxide inhibition of filamentous pure cultures and activated sludge. *Wat. Res.* **28** (5), 1117-1121.
- Koonin, E.V., K.S. Makarova and L. Aravin (2001). Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Ann. Rev. Micro.* **55**. 709-742.
- Lopez, J. M., B. Koopman y G. Bitton (1986) INT-Dehydrogenase test for activated sludge process control. *Biotech. Bioeng.* **28**. 1080-1085.
- Magbanua, B.S., J.C. Stanfill, S.M. Fehniger, B.F. Smets, F. Farkas y C.P.L. Grady. (2004). Relative efficacy of intrinsic and extant parameters for modelling biodegradation of synthetic organic compounds in activated sludge: dynamic systems. *Wat. Environ. Res.* **76** (3), 256-267.
- Mäklén, P.M., T.J. Theno, J.F. Ferguson, J.E. Ongerth, y J.A. Puhakka (1993) Chlorophenol Toxicity Removal and Monitoring in Aerobic Treatment: Recovery from Process Upsets. *Environ. Sci. Tech.* **27**, 1434-1439.
- Marsili-Libelli, S y F. Tabani (2002). Accuracy analysis of a respirometer for activated sludge dynamic modelling. *Wat. Res.* **36**, 1181-1192.
- Marx, R.B., R. L. Irvine y D. Irvine (2003) Bioreactor Troubleshooting. *Poll. Eng.* **35** (2), 24-29
- Manias, J.M. (1991) Viabilite-activite de microorganismes fixes. D.E.A. Institut National des Sciences Appliquees de Toulouse.
- Mendoza, C. y G. Buitrón (1998). Actividad de deshidrogenasa como medida de la actividad microbiana en un proceso biológico usado para la degradación de compuestos tóxicos. Memorias del 1er. Simposio Latinoamericano de Tratamiento de Agua y Residuos Industriales. Tomo I. México.
- Merlin, G., T. Lissolo, V. Morel, D. Rossel, y J. Tarradellas (1995) Precautions for routine use of INT-reductase activity for measuring biological activities in soil and sediments. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* **10** (3), 185-192.
- Moreno, J. y G. Buitrón. (1996) Optimización de la biodegradación de efluentes contaminados con compuestos tóxicos. XXV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y ambiental. 3-7 Noviembre. Ciudad de México. **1** (2), 816-819.
- Moreno, J. y G. Buitrón (1998) Respirometry based optimal control of an aerobic bioreactor for the industrial waste water treatment. *Wat. Sci. Tech.* **38** (3), 219-226.
- Moreno J. y G. Buitrón (2002) Optimización de un biorreactor aerobio para el tratamiento de aguas residuales industriales. Computación y Sistemas. Revista Iberoamericana de Investigación, Número Especial, diciembre, 74-82.
- Moreno, G., Buitrón, G. (2004). Influence of the origin of the inoculum and the acclimation strategy on the degradation of 4-chlorophenol. *Biores. Tech.* **94**, 215-218.
- Moreno-Andrade, I., G. Buitrón (2004). Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Wat. Sci. Tech.* **50** (10), 251-258.
- Müller, R.H. y W. Babel (1994). Phenol and its derivatives as heterotrophic substrates for microbial growth- an energetic comparison. *Appl. Micro. Biotech.* **42**, 446-451.
- Nakhla, G.F., I.M. Al-Harazin y S. Farooq. (1993) Organic loading effects on the treatment of phenolic wastewaters by sequencing batch reactors. *Wat. Environ. Res.* **65** (5).
- Nordin, K. (2004). Doctoral Thesis. 4-Chlorophenol biodegradation by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. Department of Biochemistry and Biophysics. Stockholm University. 1-72.
- Nordlund, I., J. Powlowski, A. Hagström y V. Shingler. (1993) Conservation of regulatory and structural genes for a multi-component phenol hydroxylase within phenol-catabolizing bacteria that utilize a meta-cleavage pathway. *J. Gen. Micro.* **139**, 2695-2703.

- Nguyen, A.L., J.B. Duff, J.B. y J.B. Sheppard (2000). Application of feedback control based on dissolved oxygen to a fixed-film sequencing batch reactor of brewery wastewater. *Wat. Environ. Res.* **72** (1), 75-83.
- Ochman, H., J.G. Lawrence, y E.A. Groisman. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nat.* **405**. 299-304.
- Parson, J.R. y L.C.M. Commandeur (1990) Degradation of halogenated aromatic compounds. *Biodeg.* 207-220.
- Qureshi, S., B.K. Richards, A.G. Hay, C.C. Tsai, M.B. McBride, P. Baveye y T.S. Steenhuis. (2003). Effect of microbial activity on trace element release from sewage sludge. *Environ. Sci. Tech.* **37**, 3361-3366.
- Rebillard, J.P., y M. Torre. (1993) Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT: application à un cas concret. *Revue des sciences de l'eau*. **6**, 153-174.
- Ryckeboer, J., J. Mergaert, J. Coosemans, K. Deprins y J. Swings. (2003) Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl. Micro.* **94**, 127-137.
- Rozsak, D. B. y R.R. Colwell (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Micro. Rev.* **51**, 365-379.
- Rozzi, A., E. Ficara y A. Rocco. (2003). Dissolved oxygen-stat titration respirometry: principle of operation and validation. *J. Environ. Eng.* July. 602-609.
- Rubio, M.A., K.H. Engesser y H. Knackmuss. (1986) *J. Arch. Microbiol.* **145**, 116-122.
- Schwieb, U., y Schmidt, E. (1982) *Appl. Environ. Micro.* **44**, 33-39.
- Seigneur, Ch., V. Mottier, C. Pulgarin, N. Adler y F. Péringier. (1993) Biodegradation of xenobiotics in a fixed bed reactor. *Environ. Prog.* **12** (4).
- Shamas, J.Y., y A.J. Englade (1992) Use of the immediate maximum specific oxygen uptake rate as an activated sludge process control parameter. *Wat. Sci. Tech.* **25** (1), 123-132.
- Shimp, R. J., y F.K. Pfaender (1987) *Appl. Environ. Micro.* **53**, 1496-1499.
- Soto, G. (1999). Tesis de maestría. Biodegradación de compuestos tóxicos en un proceso SBR controlado por medio del oxígeno disuelto. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-91.
- Spanjers, H., P. Vanrolleghem y G. Olsson (1996) Respirometry in control of the activated sludge process. *Wat. Sci. Tech.* **34**: 3-4, 117-126.
- Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (1992). American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 18th ed., New York.
- Steinmetz, H., J. Wiese y T.G. Schmitt. (2002) Efficiency of SBR technology in municipal wastewater treatment plants. *Wat. Sci. Tech.* **46** (4-5), 293-299.
- Stubberfield, L.C.F., P.J.A. Shaw. (1990) A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measures of microbial activity. *J. Microb. Meth.* **12** (3-4), 151-162.
- Tan, H.M. (1999). Bacterial catabolic plasmids. *Appl. Micro. Biotech.* **51**. 1-12.
- Tarighian, A., G. Hill, J. Headley y S. Pedras. (2003). Enhancement of 4-chlorophenol biodegradation using glucose. *Clean Techn. Environ. Policy.* **5**. 61-65.
- Torres, A.R. (1999) Influencia del período de ayuno en la biodegradación de compuestos fenólicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Trevors, J. T. (1984) The measurement of electron transport system (ETS) activity in freshwater sediment. *Wat. Res.* **18** (5), 581-584.
- Vargas, A., G. Soto, J. Moreno, J y G. Buitrón (2000) Observer-based time-optimal control of an aerobic SBR for chemical and petrochemical wastewater treatment. *Wat. Sci and Tech.* **42** (5-6), 163-170.

- Wiggings B.A., S.H. Jones y M. Alexander (1987) Explanation for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *App. Environ. Micro.*, **53**, 791-796.
- Yoong, E.T., P.A. Lant y P.F. Greenfield (2000) In Situ Respirometry in an SBR treating wastewater with high phenol concentrations. *Wat. Res.* **34** (1), 239-245.
- Yu, H.Q., G.W. Gu y L.P. Song. (1996) The effect of fill mode on the performance of SBR treating various wastewaters. *Biores. Tech.* **58**, 49-55.