



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Instituto de Ecología

**BIODEGRADACIÓN ÓPTIMA DE COMPUESTOS
FENÓLICOS EN UN REACTOR DISCONTINUO
SECUENCIAL**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. IVÁN MORENO ANDRADE

DIRECTOR DE TESIS: DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ

MÉXICO, D. F.

OCTUBRE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

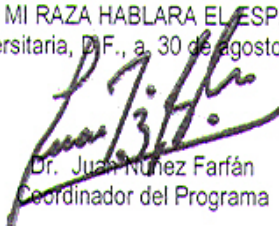
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de junio del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno **MORENO ANDRADE IVÁN** con número de cuenta **501093707**, con la tesis titulada: "**Biodegradación óptima de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial**", bajo la dirección del **Dr. Germán Buitrón Méndez**.

Presidente:	Dra. Yolanda López Vidal
Vocal:	Dr. Jaime Alberto Moreno Pérez
Vocal:	Dra. Marisa Mazari Hiriart
Vocal:	Dr. Alfonso Lugo Vázquez
Secretario:	Dr. Germán Buitrón Méndez
Suplente:	Dr. Alejandro Vargas Casillas
Suplente:	Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de agosto del 2006.



Dr. Juan Nunez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Apoyos recibidos

Este trabajo fue desarrollado en el Grupo de Investigación: Tratamiento Biológico de Aguas Residuales Industriales de la Coordinación de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

La tesis fue realizada en el marco del proyecto “Efficient Operation of Urban Wastewater Treatment Plants” (EOLI) financiado por el programa INCO de la Unión Europea (ICA4-CT-2002-10012). También se agradece el apoyo financiero proporcionado por CONACYT a través del proyecto “Degradación de compuestos recalcitrantes presentes en aguas residuales por medio de un biorreactor con membranas automatizado” (proyecto 46093 Y).

Se agradece a CONACYT y DGEP la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado.

Jurado asignado

Presidente:	Dra. Yolanda López Vidal
Vocal:	Dr. Jaime Alberto Moreno Pérez
Vocal:	Dra. Marisa Mazari Hiriart
Vocal:	Dr. Alfonso Lugo Vázquez
Secretario:	Dr. Germán Buitrón Méndez
Suplente:	Dr. Alejandro Vargas Casillas
Suplente:	Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Para Ariane y Nolwen
Gracias por todo su amor

Agradecimientos

Gracias a la Coordinación de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería de la UNAM por permitirme realizar este trabajo de tesis.

Al Dr. Germán Buitrón por abrirme las puertas de su grupo de trabajo, por guiarme en la realización del doctorado, por apoyarme y motivarme a aprender más cosas, por todo el tiempo que ocupó en enseñarme nuevos conocimientos, por todo el apoyo que me ha brindado y principalmente por ofrecerme su amistad.

Al Dr. Jaime Alberto Moreno Pérez y al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, miembros del Comité Tutoral, por sus asesorías y por sus valiosas aportaciones a este trabajo de investigación.

A la Coordinación de Automatización del Instituto de Ingeniería y muy especialmente al Dr. Manuel Betancur por el apoyo en el área de control, ya que su colaboración fue muy importante en el desarrollo de esta tesis.

Al Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina de la UNAM, por conducto de la Dra. Yolanda López Vidal y el Dr. Mauricio Castañón por toda la ayuda y el apoyo brindado en los análisis con citometría de flujo durante los experimentos con la cepa pura.

Al Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Narbonne, Francia, por medio del Dr. Jean-Jacques Godon y el Dr. Patrick Dabert por recibirme y brindarme un entrenamiento básico en técnicas de biología molecular empleadas en el área del tratamiento de aguas residuales.

A Gloria Moreno y Elia Velázquez por el apoyo técnico brindado en el laboratorio para la realización del trabajo de tesis.

Gracias a los miembros del jurado Dra. Yolanda López Vidal, Dr. Jaime Alberto Moreno Pérez, Dra. Marisa Mazari Hiriart, Dr. Alfonso Lugo Vázquez, Dr. Germán Buitrón Méndez, Dr. Alejandro Vargas Casillas, Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, Dr. Víctor Luna por sus valiosas aportaciones a esta tesis.

A mis compañeros del grupo de Grupo Tratamiento Biológico de Aguas Residuales Industriales: Maribel Quezada, Antonio Linares, Alma Corrales, David Martínez, Silvana Salazar, Karina Martínez, Dafne Gonzáles, Rodrigo Cervantes, Pancho Velarde, Leonardo Jiménez, Maribel Flores por haberme brindado su amistad y hacer ameno el trabajo de laboratorio.

Agradecimientos especiales para Jaime Pérez por toda la ayuda en el laboratorio y en general en el proyecto de investigación, además que parece que nunca se le acaba la energía para ayudar a los demás.

Por último a mi compadre por que siempre estuvo al pendiente de las cosas que estaba realizando, por la amistad, por las pláticas ociosas que no llevaban a nada, por las aventuras que vivimos a través de estos años y por que creo que nuestra amistad nos ha servido a los dos para ser mejores personas.

A todos
Gracias

Índice

Índice.....	1
Índice de tablas.....	5
Índice de Figuras.....	7
Nomenclatura.....	11
Resumen.....	15
Abstract.....	19
Organización de la tesis.....	23
1. Introducción.....	25
1.1 Motivación y relevancia.....	25
1.2 Generalidades.....	27
1.2.1 Tratamiento biológico de aguas residuales.....	27
1.2.2 Degradación de efluentes industriales.....	31
1.2.3 Reactores discontinuos en el tratamiento de aguas industriales.....	32
1.2.3.1. Tiempo de reacción.....	35
1.2.3.2. pH.....	36
1.2.3.3. Temperatura.....	36
1.2.3.4. Oxígeno disuelto.....	37
1.2.3.5. Carga de contaminantes.....	38
1.2.3.6. Concentración de compuestos tóxicos.....	39
1.2.4. Biodegradación de compuestos fenólicos.....	39
1.2.4.1. Deshalogenación oxidativa.....	42
1.2.4.2. Deshalogenación hidrolítica.....	43
1.2.4.3. Deshalogenación reductiva.....	43
2. Objetivos.....	47
2.1 Objetivo general.....	47
2.2 Objetivos particulares.....	47
2.3 Hipótesis.....	48
3. Metodología general.....	49
3.1 Estrategia experimental.....	49
3.2 Reactores piloto.....	51
3.3 Aclimatación de los microorganismos.....	54
3.4 Técnicas analíticas.....	55
3.4.1 Técnica de fenoles totales (4CF y fenol).....	55
3.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	55
3.4.3 Carbono Orgánico Disuelto (COD).....	55

3.4.4 Metabolito	55
3.4.5 Sólidos Suspendidos Volátiles y Sólidos Suspendidos Totales (SSV y SST)	56
3.4.6 Índice Volumétrico de Lodos (IVL).....	56
3.4.7 Velocidad de Sedimentación (VS).....	56
3.4.8 Respirimetría	56
3.5 Biología molecular	57
3.6 Viabilidad de las células de una cepa pura expuesta a ayunos.....	58
3.7 Análisis de toxicidad por medio del método Microtox	59
4. Aclimatación y desaclimatación de lodos activados	61
4.1 Introducción	61
4.2 Metodología	64
4.2.1 Aclimatación	64
4.2.2 Desaclimatación (Ayunos)	65
4.3 Resultados y Discusión	65
4.3.1 Aclimatación	65
4.3.2 Actividad de los microorganismos en la aclimatación.....	68
4.3.3 Producción de metabolito en la aclimatación.....	73
4.3.4 Índice volumétrico de lodos en la fase de aclimatación.....	73
4.3.5 Cambios en la comunidad durante la aclimatación.....	74
4.3.6 Desaclimatación inducida por ayuno	76
4.4. Conclusiones	79
5. Aclimatación y ayunos en una cepa pura	81
5.1 Introducción	81
5.2 Metodología	82
5.3 Resultados y Discusión	84
5.3.1 Aclimatación	84
5.3.2 Ayunos	84
5.3.3 Cambios en la viabilidad debido al ayuno	85
5.4 Conclusiones	88
6. Estrategia de control de tiempo óptimo.....	89
6.1 Introducción	89
6.2 Metodología	92
6.3 Resultados y Discusión	98
6.3.1 Estrategia ED-TOC en condiciones estándar	98
6.3.2 Estabilidad y reproducibilidad del uso de la estrategia ED-TOC a largo plazo.....	102
6.3.3 Evolución de la comunidad durante la operación con ED-TOC.....	106
6.3.4 Toxicidad del agua tratada usando la estrategia ED-TOC	108
6.3.5. Granulación de la biomasa y observaciones microscópicas.....	108
6.3.5 Funcionamiento de la estrategia ED-TOC frente a variaciones en la concentración en el influente.....	110
6.3.6 Variación del flujo de oxígeno	111
6.4 Conclusiones	113

7. Biodegradación de altas concentraciones de compuestos fenólicos	115
7.1 Introducción	115
7.2 Metodología	117
7.3 Resultados y Discusión	117
7.3.1 Degradación de altas concentraciones de 4-clorofenol	117
7.3.2 Comparación de la estrategia ED-TOC con la estrategia usual	119
7.3.3 Degradación de agua residual con altas concentraciones de fenol.....	123
7.4 Conclusiones	127
8. Conclusiones	129
9. Referencias	133
10. Publicaciones derivadas del doctorado	143
En revistas indexadas de circulación internacional	143
Artículos en extenso en congresos internacionales	144
Artículos en congresos nacionales	147

Índice de tablas

Tabla 1.1 Clasificación de las interacciones entre los microorganismos basada en sus efectos (Bull y Slater, 1982).....	29
Tabla 1.2 Dosis letal de diversos compuestos fenólicos	40
Tabla 1.3 Concentración efectiva de diversos clorofenoles sobre bacterias nitrificantes	41
Tabla 7.1 Carga orgánica aplicada con las diferentes estrategias empleadas	122
Tabla 7.2 Comparación del aire requerido durante la degradación de distintas concentraciones de 4CF por medio de la estrategias usual y ED-TOC	122

Índice de Figuras

Figura 1.1 Asociación de microorganismos (flóculo) formados en el tratamiento aerobio	30
Figura 1.2 Nichos ecológicos del tratamiento aerobio de lodos activados	30
Figura 1.3 Fases típicas de un SBR.....	33
Figura 1.4 Ruta de degradación de compuestos haloaromáticos por desalogenación oxidativa. R puede ser COOH, H, NH ₂ y X puede ser Cl, F, Br, I	43
Figura 1.5 Ruta de degradación de compuestos haloaromáticos por desalogenación hidrolítica. R puede ser COOH, OH, NH ₂ y X puede ser Cl, F, Br, I.....	43
Figura 1.6 Ruta de degradación de compuestos haloaromáticos por desalogenación reductiva. R puede ser COOH, H, OH, C ₆ H ₅ , NH ₂ y X puede ser Cl, F, Br, I	43
Figura 1.7 Vía de degradación del 4-clorofenol. Fuente: <i>Commandeur y Parsons</i> (1990).....	44
Figura 3.1 Estrategia experimental seguida	50
Figura 3.2 Reactor aerobio SBR automatizado. Reactor (1), agitador (2), bomba de llenado (3), bomba de vaciado (4), controlador de flujo másico (5), flujómetro (6), termómetro (7), interfase (8), calentador(9), tanque de almacenamiento (10), oxímetro (11).....	52
Figura 3.3 Reactor aerobio SBR para el cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	53
Figura 4.1 Cinéticas de degradación durante el proceso de aclimatación al 4CF. A) Aclimatación a 50 mg/L y B) Aclimatación a 100 mg/L.....	66
Figura 4.2 Comportamiento del oxígeno disuelto, como una función del tiempo de los ciclos de aclimatación	66
Figura 4.3 Tasa específica de degradación durante la aclimatación a 350mg/L de 4CF. Promedio de cuatro experimentos con inóculo sin aclimatar a 4CF.....	67
Figura 4.4 Evolución de la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) para los microorganismos aclimatados al 4CF. Las flechas indican el punto de cruce donde la actividad al consumo de 4CF es mayor a la actividad de consumo de acetato	69
Figura 4.5 Evolución de la tasa específica de degradación, q, como una función del tiempo de aclimatación. Es posible notar un buen ajuste de los datos experimentales con el modelo propuesto. En el caso de AC50 $q_{max}=52.5$, $n=18.2$ y $r^2= 0.994$. Para el caso de AC 100 $q_{max}=49.1$, $n=10.4$ y $r^2= 0.994$	71
Figura 4.6 Evolución de la tasa específica de degradación de una biomasa aclimatada a 100 mg4CF/L al ser expuesta en un aumento del doble de la concentración del sustrato. Es posible notar el ajuste de los datos experimentales con el modelo logarítmico propuesto. En la Figura se muestran la ecuación del gráfico y la r^2	72
Figura 4.7 A) Producción de metabolito durante la aclimatación; B) Evolución del IVL durante la aclimatación al 4CF.....	74
Figura 4.8 Análisis de la comunidad bacteriana durante la aclimatación al 4CF. La tabla muestra los microorganismos identificados de las bandas del gel de DGGE. A) Inóculo (0h), B) 24h, C) 48h, D) 72h, E) 96h, F) 120h	75
Figura 4.9 Influencia negativa del ayuno sobre el tiempo de degradación en A) DA50, 24 h de ayuno y B) DA200, 36 h ayuno.....	76

Figura 4.10 Influencia positiva del ayuno sobre el tiempo de degradación en A) DA100, 12 h de ayuno y B) DA200, 24 h ayuno.....	76
Figura 4.11 Influencia del tiempo de ayuno sobre la tasa específica de remoción. Los resultados son comparados con las condiciones iniciales antes de la perturbación.....	77
Figura 4.12 Influencia del tiempo de ayuno sobre la TECO. Los resultados después del ayuno son comparados con las condiciones iniciales antes del ayuno.....	78
Figure 5.1 Aclimatación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 a la degradación de 25mg/L de 4CF, concentración de la biomasa al final de la aclimatación 4×10^7 UFC/mL.....	84
Figura 5.2 Incremento en el tiempo de degradación debido a diferentes periodos de ayuno.....	85
Figura 5.3 Disminución de las unidades formadoras de colonias (UFC) debido al ayuno.....	86
Figure 5.4 Disminución de la tasa de degradación volumétrica del sustrato y de la viabilidad (UFC) debido al ayuno.....	86
Figure 5.5 Cambios en la viabilidad determinada por citometría de flujo debido al ayuno.....	87
Figura 6.1 Ley de Haldane. μ es la tasa específica de crecimiento y S es la concentración de sustrato dentro del reactor.....	94
Figura 6.2 Evolución del sustrato y del volumen de la estrategia de ED-TOC. El V_o indica el volumen inicial en el tanque. El flujo se alimenta al reactor de tal manera que se mantenga la tasa de degradación alrededor del valor óptimo (zona gris). Una vez que se alcance el volumen final, V_f , el reactor continúa su funcionamiento como un batch clásico con lo cual la tasa de degradación disminuye.....	96
Figura 6.3 Evolución de la concentración de sustrato, medida como 4CF y COD durante un ciclo bajo estrategia ED-TOC.....	99
Figura 6.4 Funcionamiento de la estrategia ED-TOC. Es posible observar los cambios en el valor de γ , los cuales concuerdan con los cambios en las concentraciones de OD y 4CF. El OD cambia de manera inversa a γ , debido a que el OD es empleado para la estimación de γ	100
Figura 6.5 Datos operacionales del primer bloque de experimentos del uso de ED-TOC a largo plazo. A) SST y SSV dentro del reactor. B) Evolución de la q del 4CF y DQO. C) IVL y VS de la biomasa. D) DQO en el influente (DQO_{in}) y en el efluente (DQO_{ef}).....	103
Figura 6.6 Datos operacionales del segundo bloque de experimentos del uso de ED-TOC a largo plazo. A) SST y SSV dentro del reactor. B) Evolución de la q del 4CF y DQO. C) IVL y VS de la biomasa. D) DQO en el influente (DQO_{in}) y en el efluente (DQO_{ef}).....	105
Figura 6.7 Análisis de la distribución normal de la calidad del efluente: A) DQO B) SST.....	106
Figura 6.8 Análisis de DGGE de la evaluación de la estrategia ED-TOC en 188 ciclos de operación. A) ciclo 1, inóculo (0 h), B) ciclo 41, inicio de operación de ED-TOC (biomasa aclimatada al 4CF), C) ciclo 101, D) ciclo 144, E) ciclo 188.....	107
Figura 6.9 Fotografía de gránulos aerobios observados en el microscopio (10x) durante la degradación de 4CF.....	109
Figura 6.10 Cinéticas de degradación para diferentes concentraciones iniciales de 4CF (175, 438, 525 y 613 mg4CF/L) y OD, usando la estrategia ED-TOC.....	111
Figura 6.11 Concentración de oxígeno disuelto debido a distintos flujos de aire.....	112
Figura 6.12 A) Degradación del 4CF en diferentes concentraciones iniciales de 4CF. B) la producción de metabolito para diferentes flujos de aire.....	112

Figura 7.1 Cinética de degradación de 350 mg4CF/L con la estrategia A) usual y B) ED-TOC.....	118
Figura 7.2 Degradación de altas concentraciones de 4CF por medio de la estrategia ED-TOC. Degradación de A) 3000, B) 5000 y C) 7000 mg4CF/L.....	120
Figura 7.3 Tiempo necesario para degradar distintas cantidades de 4CF por la estrategia usual y ED-TOC.....	121
Figura 7.4 Tasa específica de degradación (q), durante la operación del SBR.....	124
Figura 7.5 Cinética de degradación de la mezcla de agua residual municipal y 350 mg/L de fenol empleando la estrategia ED-TOC	124
Figura 7.6 Cinéticas de degradación de la mezcla de agua residual municipal y A) 700, B) 1500, C) 3000 y D) 7000 mg/L de fenol usando la estrategia ED-TOC.....	125
Figura 7.7 Detalle de la cinética de degradación de la mezcla de agua residual municipal y 7000 mg/L de fenol	126

Nomenclatura

4CF	4-clorofenol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin tri-fosfato
b	Tasa de decaimiento de la biomasa, h ⁻¹
CE	Concentración efectiva
CHP	Cuenta heterótrofa en placa
CL	Concentración letal
CL ₅₀	Concentración letal media
CMFDA	Diacetato de 5-clorometil fluoresceína
COD	Carbono orgánico disuelto, mg/L
d	Días
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>)
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno, mg/L
DQO	Demanda química de oxígeno, mg/L
DQO _{ef}	DQO en el efluente
DQO _{in}	DQO en el influente
EC ₅₀	Concentración efectiva que causa 50% de inhibición de microorganismos
ED- TOC	Control de tiempo óptimo dirigido por eventos (<i>Event-driven time optimal control</i>)
EPA	Environmental Protection Agency de los Estados Unidos de América
f _D	Fracción de biomasa que contribuye al decaimiento, adimensional
FTC	Estrategia de Tiempos Fijos (<i>Fixed Time Control</i>)
g	Gramo
γ	Consumo másico de oxígeno (<i>Oxygen mass uptake rate, OMUR</i>), mgO ₂ /h
h	Hora
IP	Ioduro de propidio

IVL	Índice volumétrico de lodos, mL/g
k	Coeficiente de saturación máxima, mg/L
K _i	Coeficiente de inhibición, mg/L
k _{La}	Coeficiente de transferencia de masa (del oxígeno), h ⁻¹
K _s	Coeficiente de saturación media, mg/L
L	Litro
lpm	Litros por minuto
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
n	constante de transición
nm	Nanómetros
NO ₂	Nitritos
O ₂	Oxígeno
OB-TOC	Control de tiempo óptimo basado en observadores (<i>Observer-Based Time Optimal Control</i>)
OD	Oxígeno disuelto, mg/L
O _{in}	Concentración de oxígeno disuelto en el influente, mg/L
O _s	Concentración de saturación del oxígeno disuelto, mg/L
P%	Porcentaje que le permite el control a γ desviarse de γ^*
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pH	Potencial de hidrógeno
q	Tasa de específica de degradación, mg sustrato/gSSV/h
q _{max}	Tasa de específica de degradación máxima, mg sustrato/gSSV/h
q _v	Tasa de degradación volumétrica, mg sustrato/L/h
r ₂₀	Tasa de reacción a 20 °C
Q _{in}	Flujo del influente, L/h
rpm	Revoluciones por minuto
r _T	Tasa de reacción a T °C
S*	Concentración de sustrato donde μ tiene su valor máximo, mg/L
SBR	Reactor discontinuo secuencial (<i>Sequencing Batch Reactor</i>)
S	Concentración de sustrato dentro del reactor, mg/L

S_{in}	Concentración de sustrato en el influente, mg/L
SSF	Sólidos suspendidos fijos, mg/L
SST	Sólidos suspendidos totales, mg/L
SSV	Sólidos suspendidos volátiles, mg/L
ST	Sólidos totales, mg/L
T	Temperatura, °C
TECO	Tasa específica de consumo de oxígeno, mgO ₂ /gSSV/h
VS	Velocidad de sedimentación, m/h
V	Volumen de agua del reactor, L
X	Concentración de biomasa en el reactor, mg/L
t_a	Tiempo de aclimatación
$Y_{X/O}$	Coeficiente de rendimiento biomasa /oxígeno [$Y_{X/O} = Y_{X/S}/(1-Y_{X/S})$], adimensional
$Y_{X/S}$	Coeficiente de rendimiento biomasa/sustrato, adimensional
Y_{obs}	Tasa de crecimiento de los microorganismos observada, mgSSV/mg sustrato
μ	Tasa específica de crecimiento, h ⁻¹
μ^*	Tasa específica de crecimiento máxima correspondiente a S^* , h ⁻¹
μ_{max}	Tasa específica de crecimiento máxima sin inhibición, h ⁻¹
μm	Micrómetros
θ	Coeficiente de temperatura-actividad

Resumen

Esta tesis trata acerca de la biodegradación óptima de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial. La investigación se dividió en dos grandes bloques de experimentos. El primero se centra en la evaluación de los cambios en la actividad de los microorganismos durante los procesos de aclimatación a compuestos tóxicos y desaclimatación por ayunos, tanto en lodos activados como en una cepa pura. El segundo tópico se refiere al uso de una nueva estrategia de control óptimo para la degradación de aguas residuales inhibitorias, para lo cual se evaluó la implementación práctica de la estrategia y la capacidad de esta para degradar aumentos puntuales en la concentración de compuestos fenólicos en el influente.

Se investigó la evolución de las curvas cinéticas y de actividad respiratoria de los microorganismos durante los procesos de aclimatación y desaclimatación durante la degradación de 4-clorofenol en un biorreactor aerobio discontinuo. Se encontró que existe una reducción en el tiempo de degradación cuando el proceso de aclimatación se lleva a cabo. Una vez que la aclimatación fue concluida, se encontró que existe una afinidad del consorcio de microorganismos para biodegradar el compuesto tóxico. La capacidad de biodegradar el acetato (un sustrato fácilmente biodegradable) disminuyó. El análisis de la comunidad por medio de técnicas moleculares demostró que uno de los mecanismos de adaptación de la biomasa fue la selección y multiplicación de microorganismos especializados en la degradación de 4-clorofenol.

Se observó que los ayunos generaron un decremento de la actividad de los microorganismos, así como una disminución de la tasa de remoción. Esta disminución fue entre 20 a 44 % dependiendo del tiempo de ayuno; además de una pérdida de actividad (medida como tasa específica de consumo de oxígeno) entre 26 y 35%. Se encontró que el grado de desaclimatación de los microorganismos debido al ayuno es función de la historia de la comunidad. El efecto negativo del ayuno sobre la tasa de

degradación es poco significativo cuando los microorganismos son expuestos a condiciones de ayuno, reacondicionados para recuperar su actividad inicial y después sujetos a ayuno nuevamente. Sin embargo, cuando los ayunos fueron cíclicos y no existió un período de recuperación de la actividad inicial, el efecto sobre la tasa de degradación fue significativo. En cualquier caso, es preciso tener en cuenta que un decremento de la actividad de los microorganismos, generado por la variación del compuesto tóxico, produce una desaclimatación de la biomasa, lo cual explica algunos problemas en el funcionamiento de las plantas de tratamiento industriales para degradar aguas residuales que contienen compuestos tóxicos.

En el caso de una cepa pura (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145) aclimatada a la degradación de 25 mg/L de 4-clorofenol, se observó un comportamiento similar al observado en los experimentos con lodos activados; es decir, el tiempo de degradación disminuyó después de 16 días (15 ciclos). Los resultados muestran que los microorganismos expuestos a periodos de ayuno presentan un decremento en la viabilidad y en la actividad para degradar el sustrato tóxico, en este caso el 4-clorofenol.

Se demostró satisfactoriamente la implementación práctica de una nueva estrategia del control para optimizar la tasa de degradación de compuestos tóxicos en reactores discontinuos secuenciales. La estrategia de Control de Tiempo Óptimo Dirigido por Eventos (ED-TOC, por sus siglas en inglés *Event Driven Time Optimal Control*), fue aplicada para biodegradar agua residual sintética conteniendo 4-clorofenol como compuesto inhibitorio modelo.

La estrategia ED-TOC estima la tasa de consumo másico de oxígeno, la cual está relacionada con la tasa de degradación del sustrato. El control mantiene la tasa de degradación cerca de su valor máximo el mayor tiempo posible durante la fase de reacción. El reactor presentó un buen funcionamiento ya que la mineralización del 4-clorofenol fue realizada prácticamente por completo. Durante la operación del reactor con ED-TOC las eficiencias de degradación de 4-clorofenol fueron de más del 99% y la demanda química de oxígeno removida de más del 97%. Se alcanzaron tasas de degradación de 4-clorofenol entre 45 y 62 mg_{4CF}/g SSV/h. Se observó que en el 95% de las muestras de agua tratada los sólidos suspendidos totales en el efluente fueron

menores a 26 mg/L y la demanda química de oxígeno residual fue menor a 28 mg/L. El índice volumétrico de lodos fue 80 ± 6.8 mL/gSSV; esto último indica que el lodo tuvo una excelente sedimentabilidad.

El reactor mostró ser robusto y estable en la degradación de 4-clorofenol en la operación a largo plazo del reactor. A pesar de la estabilidad observada en el sistema en relación con los parámetros fisicoquímicos, se demostró una fuerte dinámica poblacional durante la degradación del 4-clorofenol mediante el análisis por medio de la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). La estrategia de control óptimo pudo degradar concentraciones de fenoles de hasta 7000 mg/L sin inhibición.

Abstract

The optimal biodegradation of phenolic compounds in a sequencing batch reactor was studied. The research was divided in two experimental blocks; the first one is centered in the evaluation of the changes in the activity of the microorganisms during the acclimation and deacclimation (due to starvation) to 4-chlorophenol using both a mixed and a pure culture. The second topic refers to the use of a new optimal control strategy for the degradation of inhibitory wastewaters. In this case, the practical implementation of the strategy and its capacity to degrade punctual increases in the influent phenolic compound concentration was evaluated.

The evolution of the kinetic curves and respiratory activity of a mixed culture of microorganisms during the processes of acclimation and deacclimation during the degradation of 4-chlorophenol was studied in a discontinuous aerobic biorreactor. It was found that there exists a reduction in the degradation time when the acclimation process is carried out. Once the acclimation was concluded, it was found that there exists an increase in the affinity of the microorganism consortium to biodegrade the toxic compound. The capacity to biodegrade acetate (an easily biodegradable substrate) diminished. The community analysis by molecular techniques demonstrated that the main mechanism for the adaptation of the biomass was the selection and multiplication of specialized microorganisms degrading 4-chlorophenol.

In general, it was observed that starvation generates a decrease in the activity of the microorganisms. A diminution in the removal rate was observed. This diminution was between 20 and 44 % depending on starvation time. In addition, a loss of activity (measured as specific oxygen uptake rate) between 26 and 35% was observed. The degree of deacclimation of the microorganisms is affected by the history of the community. The effect of starvation on the degradation rate is less significant when the microorganisms are exposed to conditions of starvation, then reacclimated to recover to

their initial activity, and later starved again. However, when the starvation is cyclical without a recovery period, the effect on the degradation rate is significantly diminished. In any case, it must be taken into account that a decrement of the activity of the microorganisms generated by the variation of the toxic concentration, produces a deacclimatation of the biomass, which explains some problems in the operation of the industrial wastewater treatment plants degrading residual waters that contain toxic compounds.

In the case of a pure culture (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145) acclimated to degrade 25 mg/L of 4-chlorophenol, a similar behavior to the mixed culture was observed. The degradation time was reduced after 16 days of acclimation (15 cycles). Results show that the microorganisms exposed to starvation periods have a decrease in the viability and in the activity to degrade the toxic substrate, in this case 4-chlorophenol.

The practical implementation of a new control strategy to optimize the degradation rate of toxic compound in sequencing batch reactors was demonstrated. The Event-Driven Time Optimal Control strategy (ED-TOC strategy) was applied to biodegrade a synthetic wastewater containing 4-chlorophenol as the model of an inhibitory compound.

The ED-TOC strategy estimates the Oxygen Mass Uptake Rate, which is related to the substrate degradation rate. This control strategy maintains the degradation rate near its maximal value during the reaction phase. The reactor showed an excellent operation characteristics, since the mineralization of 4-chlorophenol was performed practically completely. During the operation of the reactor with ED-TOC, the efficiencies of 4-chlorophenol degradation were higher than 99% and higher than 97% as chemical oxygen demand. Degradation rates between 45 and 62 mg_{4CP}/gVSS/h were observed. The results showed that in 95% of the samples of treated wastewater, the total suspended solids concentration in the effluent was lower than 26 mg/L and the residual chemical oxygen demand was lower than 28 mg/L. The sludge volumetric index was 80 ± 6.8 mL/gVSS. This indicates that the sludge had excellent settling characteristics.

During the long term operation of the reactor it was shown to be robust and stable for 4-chlorophenol degradation. Despite the stability of the system observed in relationship with the physicochemical parameters, it was demonstrated by the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis that strong population dynamics were present during the 4-chlorophenol degradation. The optimal control strategy could also degrade phenolic compound concentrations of up to 7000 mg/L without inhibition.

Organización de la tesis

La tesis se encuentra dividida en los siguientes capítulos:

1. Introducción general

Se presenta la motivación y relevancia del trabajo de tesis, una introducción y generalidades sobre el tratamiento de aguas residuales industriales y en particular, la biodegradación de compuestos fenólicos.

2. Objetivos

Se presentan el objetivo general y los objetivos particulares, que son necesarios para cumplir el objetivo general y por último, las hipótesis planteadas para el trabajo de investigación.

3. Metodología general

Se describen de manera general los materiales y métodos empleados en la investigación

Resultados y Discusión

En los cuatro capítulos siguientes se presentan los resultados y discusión para cada uno de los objetivos particulares planteados en el presente documento. Cada sección del documento de tesis está conformada por una pequeña introducción al tema particular, la metodología seguida en esta parte de la investigación, los resultados principales, su discusión y finalmente conclusiones de esta parte del estudio. Cada uno de estos temas está basado en artículos que han sido publicados o sometidos a diversas revistas

indexadas y congresos internacionales arbitrados. A continuación se mencionan los temas tratados:

4. Aclimatación y desaclimatación en lodos activados

Se estudió la aclimatación de consorcios microbianos empleados en la degradación de 4-clorofenol, observando los cambios poblacionales y cuantificando la actividad relacionada con el consumo del compuesto tóxico. También se estudió el efecto de los periodos de ayuno sobre la actividad de los microorganismos.

5. Aclimatación y ayunos en una cepa pura

Se realizó la aclimatación de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 a 4-clorofenol y posteriormente se evaluó el efecto de los ayunos sobre la viabilidad y capacidad degradadora de la cepa.

6. Aplicación de una estrategia óptima para degradar compuestos inhibitorios

Se presenta la evaluación de una nueva estrategia de control para biodegradar aguas residuales inhibitorias. La investigación se centró en determinar el efecto de este modo de operación sobre la actividad de los microorganismos y sus propiedades en el proceso de tratamiento de aguas residuales.

7. Biodegradación de altas concentraciones de compuestos fenólicos

Se evaluó la estrategia de control óptima en la degradación de un agua residual conteniendo altas concentraciones de 4-clorofenol y de una mezcla de agua residual municipal con altas concentraciones de fenol.

Finalmente se presentan las conclusiones generales, referencias y las publicaciones derivadas del proyecto de doctorado.

Introducción

1.1 Motivación y relevancia

Hasta hace algunos años el tratamiento de aguas residuales era visto desde el punto de vista ambiental como una caja negra, donde el agua contaminada entraba al reactor y por acción de los microorganismos se eliminaba la materia orgánica. Lo importante en el diseño de este tipo de procesos era la estructura del tanque (dimensiones, materiales, etc.). Más adelante se vio la importancia de conceptos de la ingeniería química como el régimen hidráulico, el mezclado y la transferencia de oxígeno, para el caso de los procesos aerobios. Sin embargo, es claro que para que un proceso biológico sea eficiente, la actividad de los microorganismos debe ser adecuada. No es hasta años recientes, que los estudios se han enfocado hacia la explicación de lo que ocurre con la comunidad microbiana dentro del reactor para resolver preguntas como: ¿qué microorganismos actúan en la degradación de los contaminantes y, en particular, de ciertos compuestos tóxicos?, ¿cuál es la estructura y eco-fisiología de las poblaciones microbianas en una planta de tratamiento?, ¿cuál es la dinámica poblacional dentro del biorreactor?, ¿cómo reaccionan los microorganismos frente a condiciones anormales de operación (estrés)?, ¿qué pasa con la comunidad microbiana al operar un reactor a largo plazo? Para

resolver estas preguntas se ha explorado el uso de herramientas microbiológicas como el seguimiento de la actividad de los microorganismos, el empleo de técnicas de microscopía avanzada, uso de técnicas de biología molecular, el seguimiento de las enzimas que participan en la biodegradación, etc.

Si bien es importante conocer qué pasa con los microorganismos presentes en un reactor, no es el fin último que persigue esta investigación. Conocer qué pasa a nivel microbiológico en un reactor abre las puertas al empleo de conocimientos para el desarrollo de tecnologías más eficientes. Por ejemplo, el desarrollo de control de los procesos biológicos para tener una eficiente degradación de sustancias tóxicas.

Por lo anterior, es necesario que microbiólogos, químicos, ingenieros en control colaboren en forma tal que los conocimientos sean empleados para el desarrollo de nuevas tecnologías. Por ejemplo, las aguas residuales industriales contienen compuestos muy complejos que usualmente son difíciles de degradar por medio de procesos biológicos. Este es el caso que atañe a este trabajo de investigación.

El trabajo de investigación se centra en dos tópicos. El primero es investigación básica y se enfoca a los aspectos microbiológicos de la aclimatación de los microorganismos y cómo son afectados al estar expuestos a condiciones de estrés, como los ayunos. Algunas de las preguntas que se intentan responder son: ¿qué sucede con la actividad de los microorganismos durante la aclimatación a compuestos tóxicos?, ¿existe selección de poblaciones durante la aclimatación?, ¿cómo reaccionan los microorganismos al estar expuestos a condiciones de estrés?, ¿qué pasa con la viabilidad de los microorganismos en condiciones de ayuno?

El segundo tópico se refiere a la evaluación de una estrategia de control óptimo desde el punto de vista microbiológico y del proceso. Sobre este tema, el principal aporte de este trabajo de investigación fue determinar si es posible emplear de manera práctica una estrategia de control en un biorreactor discontinuo para degradar compuestos inhibitorios, evaluar las limitaciones del sistema, conocer la respuesta del biorreactor ante los incrementos puntuales de sustrato, evaluar el comportamiento de los

parámetros fisicoquímicos y biológicos así como determinar la dinámica de la comunidad microbiana (bacterias) al operar bajo la estrategia de control a largo plazo.

Es importante resaltar que en esta investigación colaboraron especialistas de distintas áreas del conocimiento y que gracias al trabajo en equipo fue posible el desarrollo de la nueva tecnología. Esta tesis se centra sobre la microbiología y el proceso del biorreactor sin entrar en los detalles del trabajo realizado por los colegas del área de control de procesos.

1.2 Generalidades

1.2.1 Tratamiento biológico de aguas residuales

Los principales objetivos del tratamiento biológico de aguas residuales son transformar los componentes disueltos o partículas biodegradables en productos finales menos complejos o incluso la mineralización de ellos, capturar o incorporar sólidos coloidales suspendidos o no sedimentables en un flóculo o en una biopelícula y, en algunos casos, remover trazas de compuestos orgánicos (Metcalf & Eddy, 2003).

Los tratamientos biológicos se pueden clasificar dependiendo de las funciones metabólicas de los microorganismos en: procesos aerobios, en los cuales el oxígeno es el principal aceptor de electrones; procesos anóxicos, que se realizan en ausencia o a muy bajas concentraciones de oxígeno molecular, por lo cual los microorganismos emplean el oxígeno ligado a otros elementos, por ejemplo el NO_2 ; y por último, los procesos anaerobios, que se realizan en ausencia de oxígeno.

Un proceso biológico de tratamiento de aguas residuales consta de dos fases principales. En la primera fase se lleva a cabo la degradación de la materia orgánica por los microorganismos agrupados en flóculos. Después, en una segunda etapa, el agua tratada es separada de los microorganismos. En un proceso continuo estas dos etapas se llevan a cabo en dos tanques: el primero es el reactor biológico y el segundo es un sedimentador. Si el proceso es discontinuo, en un solo tanque se lleva a cabo, primero la reacción, seguida de una fase de sedimentación.

Por otra parte, dependiendo de la forma de asociación de los microorganismos se puede clasificar como crecimiento fijo (biopelículas) o en suspensión. En procesos con biomasa fija los microorganismos crecen adheridos a un material inerte. En los procesos de biomasa suspendida los flóculos se mantienen en suspensión gracias al mezclado. El proceso aerobio con biomasa suspendida es comúnmente conocido como lodos activados por los especialistas del área.

Los microorganismos que llevan a cabo la degradación de la materia orgánica tienden a organizarse en un consorcio microbiano, el cual se puede definir como un sistema de dos o más miembros donde cada organismo hace algo en beneficio del otro (Madigan *et al.*, 1997). Debido a esta sinergia en los consorcios es posible que un mismo microorganismo prolifere con mayor velocidad comparado con su respectivo cultivo puro.

Una de las características principales de los lodos activados es la formación de flóculos, los cuales son agregados de bacterias de entre 50 a 200 μm . Los flóculos son separados del medio acuoso por acción de la gravedad (sedimentación). En los flóculos de los lodos activados existe una dinámica poblacional muy grande; sin embargo, para entender las interacciones entre las poblaciones microbianas se puede considerar un esquema muy simplificado. Por ejemplo, las descripciones más comunes emplean interacciones entre dos poblaciones con la comunidad (tabla 1.1). Sin embargo, si se consideran sólo las interacciones individuales de los microorganismos dentro del flóculo, estas pueden revelar muy poca información del comportamiento de una comunidad compleja, ya que cada población dentro de la comunidad puede estar involucrada en varias interacciones (Bull y Slater, 1982). Además, estas interacciones están en constante cambio y son sujetas a cambios debidos al ambiente, es decir, las poblaciones están en constante adaptación. Debido a las dificultades asociadas a interacciones específicas basadas en los efectos de las comunidades microbianas, muchos investigadores han identificado los miembros de las comunidades por sus funciones básicas (Grady, 1985). Madigan *et al.*(1997) divide a las especies de microorganismos por su interacción ya sea en dominantes, asociadas e incidentales. Las dominantes son aquellas poblaciones que tienen un impacto importante en la comunidad, las asociadas dependen de las dominantes para su sobrevivencia y las

incidentales son aquellas especies más o menos indiferentes a las acciones de las dominantes o de las asociadas.

Tabla 1.1 Clasificación de las interacciones entre los microorganismos basada en sus efectos (Bull y Slater, 1982)

Efecto del microorganismo a en el microorganismo b	Efecto del microorganismo b sobre el microorganismo a		
	Positivo	Ninguno	Negativo
Positivo	Mutualismo	Comensalismo	Parasitismo y depredación
Ninguno	Comensalismo	Neutralismo	Amensalismo
Negativo	Parasitismo y depredación	Amensalismo	Competición

Los procesos aerobios por lodos activados están formados por bacterias, hongos, protistas y nemátodos. En los procesos de tratamiento aerobios las bacterias que actúan en la degradación generalmente son gram negativas e incluyen miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium* y nitrificantes como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. Adicionalmente se pueden presentar formas filamentosas tales como *Sphaerotilus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Leptomitus*, *Leucothrix* y *Geotrichum*. Las bacterias gram positivas reportadas en sistemas aerobios pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Micrococcus* (Lewandowski, 1990).

Por lo general las bacterias realizan la función de degradar el sustrato. Sin embargo, las actividades metabólicas de otros organismos son igualmente importantes; por ejemplo, los protozoarios y rotíferos actúan como depuradores del efluente. Los protozoarios actúan como predadores de bacterias dispersas que no han floculado y los rotíferos consumen cualquier partícula biológica que no ha sedimentado. Los hongos también pueden ser degradadores como por ejemplo los géneros *Phanerochaete* y *Rhizopus*.

La Figura 1.1 muestra una fotografía del agrupamiento de los microorganismos que se presenta en los procesos por lodos activados. La asociación de microorganismos presentada en la Figura 1.1 esta descrita esquemáticamente en la Figura 1.2.

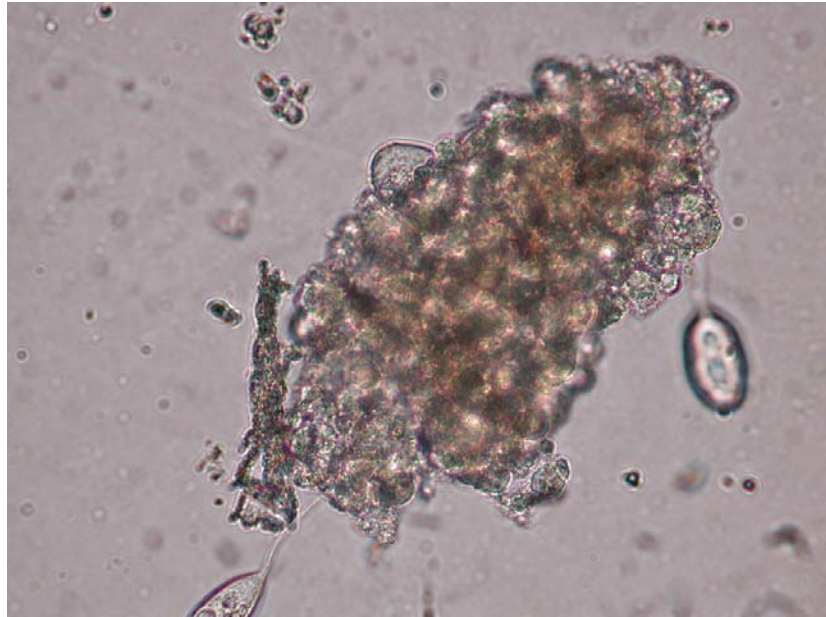


Figura 1.1 Asociación de microorganismos (flóculo) formados en el tratamiento aerobio

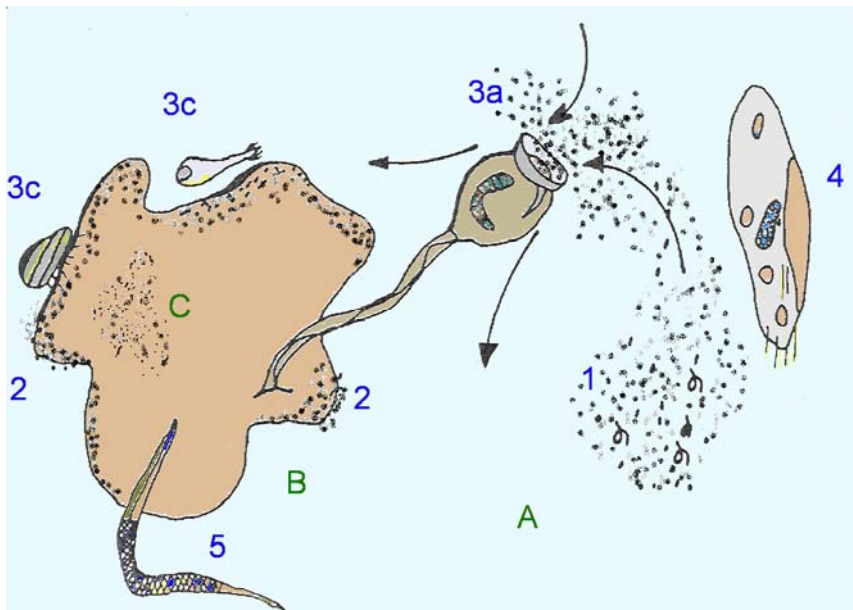


Figura 1.2 Nichos ecológicos del tratamiento aerobio de lodos activados. Fuente: modificado de González, 1996

- A) Líquido intersticial
- B) Superficie del flóculo
- C) Materia orgánica (puntos), Interior del flóculo
- 1) Bacterias y zooflagelados libres
- 2) Bacterias de la superficie del flóculo (o formadoras del flóculo)
- 3) Organismos típicos: peritricos fijados al flóculo que hacen la función de filtradores y depredadores de bacterias y algas como *Vorticella* (3a), *Phyllopharyngia* como *Chilodonella* (3b) que son predadores de bacterias, algas en la superficie del flóculo y ciliados como *Aspidisca* (3c).
- 4) Fauna de acompañamiento del flóculo (*Paramecium*), que son bacterivoros
- 5) Fauna detritívora, saprófagos (nemátodos) los cuales devoran la materia orgánica inerte o en descomposición

A pesar de que la estructura de los flóculos es similar en el tratamiento biológico de aguas residuales, existen diferencias en las poblaciones microbianas que realizan la función de degradadores, dependiendo de las características propias del efluente a tratar. Por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales municipales la diversidad de microorganismos es mucho mayor que en una planta de tratamiento de efluentes industriales. Lo anterior es debido a que en el tratamiento de aguas residuales industriales existe una selección de microorganismos especializados en la degradación de los compuestos específicos que se encuentran en la descarga industrial.

1.2.2 Degradación de efluentes industriales

Las aguas residuales industriales son caracterizadas por la alta variación en su composición y flujo. La composición del agua residual es muy específica para cada industria. En general el flujo de las aguas residuales industriales es difícil de predecir. Muchas de las industrias generan cantidades de agua residual relativamente constantes durante la producción, pero los flujos cambian drásticamente cuando existe limpieza o paro de la maquinaria de operación. Cuando la producción interna cambia, puede bajar el flujo de descarga de aguas residuales (por ejemplo en una farmacéutica, la demanda de los productos es la que dicta qué sustancia debe procesarse primordialmente). Por otra parte una expansión de la fábrica o una mayor producción pueden producir aumento en el flujo de descarga.

La gran mayoría de las aguas residuales industriales se pueden degradar por medio del empleo de microorganismos. Sin embargo existen más de 70,000 compuestos químicos orgánicos sintéticos (compuestos xenobióticos), muchos de los cuales son muy difíciles de degradar por procesos biológicos. Generalmente, cuando algunos de estos compuestos se encuentran en un agua residual industrial, el tratamiento biológico presenta problemas debido a la poca biodegradabilidad y los efectos tóxicos que estos pueden tener sobre la biomasa (y en general sobre los seres vivos). Sin embargo, en la mayoría de los casos, los compuestos orgánicos pueden ser biodegradados pero la degradación es muy lenta, y son requeridas condiciones ambientales muy específicas (pH, potencial redox, temperatura, etc.). La posibilidad de que un compuesto tóxico sea degradado depende principalmente de la presencia de un microorganismo

especializado y de la aclimatación (Aelion *et al.*, 1989). Las principales vías de degradación de este tipo de compuestos son: a) el compuesto sirve como sustrato de crecimiento, b) la sustancia sirve de donador de electrones, o c) el compuesto es degradado por cometabolismo (el compuesto degradado no es parte del metabolismo del microorganismo).

En general los procesos continuos por lodos activados son empleados para realizar el tratamiento de aguas residuales industriales (Eckenfelder, 1995). Sin embargo, debido a que las aguas industriales son muy variables en el flujo y concentración de compuestos inhibitorios, estos presentan bajas eficiencias de remoción. Para solventar este problema cada vez es más frecuente el uso de reactores discontinuos secuenciales (Wilderer *et al.*, 2001).

1.2.3 Reactores discontinuos en el tratamiento de aguas industriales

Con el fin de evitar los problemas de los procesos continuos al degradar efluentes industriales, se ha propuesto el uso de reactores discontinuos o SBR (*Sequencing Batch Reactor*, por sus siglas en inglés). El término SBR es empleado como sinónimo para el tratamiento de aguas residuales donde el volumen del tanque del reactor es variable en el tiempo. En este tipo de sistemas hay una alimentación y vaciados cíclicos (Irvine y Ketchum, 1989). Usualmente los biorreactores SBR operan bajo cinco fases bien definidas que son: llenado, reacción, sedimentación, vaciado y tiempo muerto (Figura 1.3). Las diferentes versiones de los SBR incluyen influentes continuos y/o periódicos y distintas fases de reacción, sedimentación y vaciado (Wilderer *et al.*, 2001). El proceso SBR puede trabajar con biomasa suspendida, fija o una mezcla de ambos (Wilderer y McSwain, 2004).

Un ciclo de reacción comienza con la fase de llenado, en la cual el reactor es alimentado con el agua residual a degradar. Dependiendo del objetivo del proceso esta fase puede subdividirse en un llenado estático (no existe agitación, permitiendo la acumulación del sustrato), llenado con mezclado (no existe suministro de aire, por lo cual este existe en mínima cantidad, esto permite la posibilidad de obtener ambientes anóxicos o anaerobios en el reactor) y el llenado con aeración (mezclado con aire, lo cual deriva en

reacciones aerobias durante el llenado). En general la degradación de los sustratos comienza durante la fase de llenado y continúa durante la fase de reacción.

En la fase de reacción el sustrato es degradado por la acción de los microorganismos y puede dividirse en sub-fases, como pueden ser la reacción con mezclado sin aeración (la cual puede producir reacciones anóxicas o anaerobias) o una reacción aerobia.

La sedimentación es la separación de la biomasa del agua tratada. Esto se realiza dejando el tanque en reposo, de tal manera que la biomasa se vaya al fondo del tanque. Durante el vaciado, el agua clarificada (que se encuentra en la parte superior del reactor) es drenada, con lo cual en el tanque de reacción solo queda la biomasa con un remanente de agua. El porcentaje de líquido drenado (y en un nuevo ciclo alimentado) es conocido como volumen de intercambio. Generalmente se considera que un ciclo de SBR termina con la fase de vaciado.

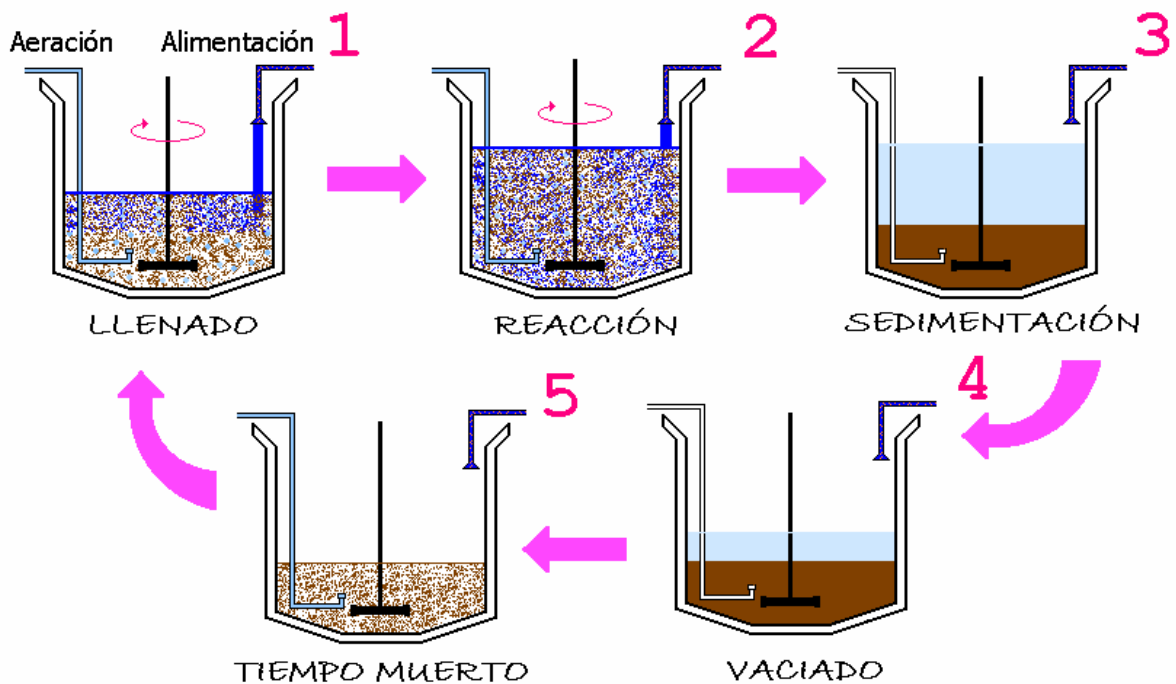


Figura 1.3 Fases típicas de un SBR

El tiempo muerto es el tiempo entre el vaciado y el llenado (si el sistema tiene una capacidad superior a la necesaria para tratar el agua residual que entra a la planta, el tiempo muerto será mayor). Esta etapa del SBR puede ser eliminado o reacomodado entre otras fases de acuerdo a las necesidades del proceso. Más detalles acerca de los reactores SBR pueden encontrarse en Wilderer *et al.* (2001).

Los sistemas SBR han demostrado ser una excelente alternativa para el tratamiento de aguas residuales conteniendo altas concentraciones de compuestos xenobióticos (Buitrón *et al.*, 2003), para tratar efluentes inhibitorios muy variables y compuestos específicos presentes en aguas residuales industriales (Torrijos *et al.*, 2004). Adicionalmente el empleo de reactores SBR ha demostrado ser un medio eficiente costo-efectivo y de energía para degradar compuestos orgánicos.

En general al comparar los procesos continuos con los SBR se pueden numerar las siguientes ventajas: en los procesos discontinuos se establecen comunidades con actividad degradadora alta y estable; son flexibles en su operación, tal que se puede reaccionar rápidamente al existir aumentos puntuales en la concentración de compuestos tóxicos; se puede manipular el tiempo de duración de las fases para aumentarla o reducirla dependiendo de la velocidad a la que se esta realizando la degradación; se disminuyen los costos de inversión puesto que se elimina el sedimentador secundario (el mismo tanque funciona como reactor y como sedimentador); se obtienen lodos con excelentes características de sedimentabilidad debido a la actividad cíclica del reactor; se controla el problema de esponjamiento de lodos ya que los microorganismos filamentosos son controlados por la alta variación en la concentración de sustratos; debido a su flexibilidad es posible la total automatización y aplicación de estrategias de control en el reactor.

Para que un reactor opere de manera eficiente se deben controlar factores ambientales tales como temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto. Así mismo, las características del agua residual como la concentración de sustratos, co-sustratos, compuestos inhibidores, salinidad o la carga orgánica y características propias del proceso que incluyen el tiempo de retención hidráulica, la edad de los lodos, la

velocidad de llenado y vaciado, la transferencia del oxígeno al medio y la velocidad de agitación.

En general la actividad metabólica de los microorganismos durante el tratamiento de aguas residuales se centra en la conversión de materia orgánica soluble o coloidal en componentes celulares o nuevas células, CO₂ y agua. La actividad de los microorganismos en los SBR está ligada al estado fisiológico del consorcio microbiano, es decir, debe existir una actividad metabólica colectiva que va a producir una buena estructura de la biomasa para formar flóculos o gránulos, lo cual va a permitir una adecuada separación de la biomasa del agua tratada en la fase sedimentación.

Se ha observado que en los reactores SBR se pueden generar gránulos aerobios con propiedades de sedimentación mucho mejores que los flóculos. Los gránulos aerobios son poblaciones de microorganismos asociados de forma muy compacta y han sido reportados recientemente en los SBR (Mc Swain *et al.*, 2004a). Las principales ventajas de la formación de los gránulos son la alta sedimentabilidad y una mayor área superficial (de Kreuk y van Loosdrecht, 2004).

Como consecuencia de la variación en la concentración de sustrato en cada ciclo del SBR (la concentración disminuye conforme avanza el tiempo de reacción), la tasa de crecimiento de los microorganismos cambia de alta a baja durante el ciclo. Debido a lo anterior hay una fuerte selección de la comunidad microbiana, donde las especies que pueden sobrevivir bajo estas condiciones permanecen en el reactor desplazando a las demás. Esto es muy importante cuando se quiere degradar un agua residual que contiene compuestos tóxicos, ya que los microorganismos especializados en la degradación de este compuesto son seleccionados.

Existen otros factores que afectan el funcionamiento de los reactores SBR. Entre los principales se encuentran los siguientes:

1.2.3.1. Tiempo de reacción

El tiempo de reacción es un parámetro que afecta la eficiencia del proceso. Si es corto, la materia orgánica no se remueve totalmente (eficiencias bajas) y si es demasiado largo

pueden presentarse periodos de ayuno que disminuyen la actividad de los microorganismos (Buitrón y Moreno, 2004). De igual manera, el tiempo de ciclo para degradar una carga es un parámetro importante a tomar en cuenta ya que entre más eficiente sea un proceso de degradación, el tamaño del reactor será menor, con lo cual la construcción y gasto de energía de la planta serán menores. Para obtener esto, se busca que los microorganismos consuman el sustrato a la máxima velocidad de degradación posible, con lo cual se los tiempos de reacción serian menores. Recientemente, con el uso de estrategias del control de los procesos SBR los problemas precedentes pueden ser superados.

1.2.3.2. pH

El pH es un factor importante pues es clave en el crecimiento de los microorganismos en las plantas de tratamiento de aguas residuales, ya que la mayoría no pueden tolerar niveles por encima de 9.5 o por debajo de 4. Por lo general el pH óptimo para el crecimiento de las bacterias de un reactor se encuentra entre 6.5 y 7.5 (Metcalf y Eddy, 2003). A nivel celular las reacciones catalizadas por enzimas dependen del pH y la temperatura, ya que afectan las estructuras secundarias y terciarias de estas. Muchas enzimas tienen una actividad óptima a pH neutro y la actividad aumenta o disminuye con la variación correspondiente a su pH óptimo (Rittmann y McCarty, 2001).

1.2.3.3. Temperatura

La temperatura determina la velocidad de reacción biológica. La temperatura no solo influye en las actividades metabólicas de la población microbiana, sino también tiene profundo efecto sobre factores tales como la velocidad de transferencia de gases (por ejemplo el coeficiente de transferencia del oxígeno dentro del reactor), y las características de sedimentación de la biomasa (Metcalf & Eddy, 2003).

Se ha observado que la velocidad de degradación de los microorganismos aumenta con la temperatura, duplicándose cada 10°C hasta alcanzar la temperatura límite (Rittmann y McCarty, 2001). Las bacterias aerobias usadas en los procesos por lodos activados tienen una temperatura óptima de degradación entre 20 y 25 °C. El efecto de la

temperatura en la tasa de reacción de los procesos biológicos se expresa usualmente de la siguiente forma:

$$r_T = r_{20} \theta^{(T-20)} \quad (1.1)$$

donde: r_T = tasa de reacción a T °C, r_{20} = tasa de reacción a 20 °C, θ = coeficiente de temperatura-actividad, T = temperatura, °C. El valor típico de θ para el proceso de lodos activados es de 1.04 (intervalo entre 1.00 a 1.08)

1.2.3.4. Oxígeno disuelto

La necesidad o tolerancia al oxígeno depende de cada tipo de microorganismo, pero, para este caso se resaltarán solo las necesidades de oxígeno en reactores aerobios. Los microorganismos aerobios son aquellos que realizan sus funciones de crecimiento en ambientes con más del 21% de oxígeno disuelto en relación a la saturación (Madigan *et al.*, 1997). Se ha observado que el oxígeno disuelto (OD) afecta la tasa específica de crecimiento (Metcalf & Eddy, 2003), la cual se reduce cuando los microorganismos aerobios son expuestos a bajos niveles de OD. El OD es un factor limitante de la tasa de crecimiento cuando el nivel de OD es menor de la concentración crítica de OD. La concentración crítica de oxígeno se encuentra entre 5% a 10% del oxígeno de saturación para bacterias y hongos (Shuler y Kargi, 1992). Para el caso de los procesos por lodos activados se recomienda trabajar por arriba de 2 mg/L de oxígeno disuelto para evitar problemas de limitación.

El oxígeno usualmente es introducido en el reactor por medio de burbujas de aire (aeradores). La transferencia de oxígeno de las burbujas de gas a las células está limitada por la tasa de transferencia de oxígeno (de la fase gaseosa a la líquida), el cual está determinado por:

$$\frac{dO}{dt} = k_L a (C^* - C_L) \quad (1.2)$$

donde: dO/dt es la tasa de transferencia de oxígeno (mg O₂/L/h), k_L es el coeficiente de transferencia (cm/h), a es el área de interfase gas-líquido (cm²/cm³), $k_L a$ es el coeficiente de transferencia de masa del oxígeno (h⁻¹), C^* es la concentración de saturación del OD

(mg/L) y C_L es la concentración actual de OD en el reactor (mg/L) (Shuler y Kargi, 1992). Cuando en el medio líquido existen microorganismos, existe un consumo del oxígeno determinado por la tasa de consumo de oxígeno (TCO):

$$TCO = q_{O_2} X = \frac{\mu X}{Y_{X/O_2}} \quad (1.3)$$

donde: q_{O_2} es la tasa específica de consumo de oxígeno (mg O₂/g células/h), Y_{X/O_2} es el coeficiente de rendimiento (g células/g O₂) y X es la concentración de células (g de células/L). Cuando la transferencia de oxígeno es una limitante en el proceso, la tasa de consumo de oxígeno es igual a la tasa de transferencia. Es importante cuidar el suministro de oxígeno en un reactor aerobio, puesto que de este dependerá el que los microorganismos pueden realizar sus funciones metabólicas.

1.2.3.5. Carga de contaminantes

El producto de la concentración por el caudal, en un sitio específico se denomina carga y generalmente se expresa en unidades de kg/d. Toda fuente receptora o sistema de tratamiento, tiene una capacidad específica de asimilación de un contaminante, por lo cual si se excede la capacidad de tratamiento por carga muy probablemente perderá su capacidad de remoción (por la disminución de la actividad de los microorganismos) y las eficiencias de remoción disminuirán (Romero, 2002).

Existen dos parámetros muy importantes a tomar en cuenta, la relación F/M (*food to microorganism ratio*) y la carga orgánica volumétrica. La relación F/M es un parámetro comúnmente usado para caracterizar el diseño y las condiciones operacionales de un proceso. Los valores típicos de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) varían de 0.04 g sustrato/g biomasa/d para procesos con aeración extendida y de 1 g sustrato/g biomasa/d para procesos de alta tasa. La relación F/M es muy utilizada en sistemas donde el proceso se basa en el tiempo de retención de los lodos en el reactor (Metcalf y Eddy, 2003).

La carga orgánica volumétrica es definida como la cantidad de DBO o DQO aplicada al volumen del tanque de aeración por día. Las cargas orgánicas, expresadas como kg de

DBO o DQO/m³/d pueden variar entre 0.3 a más de 3. En general, altas cargas orgánicas van a requerir altas tasas de transferencia de oxígeno por unidad de volumen en el sistema de aeración, de no ser así el proceso no será eficiente (Metcalf y Eddy .2003).

1.2.3.6. Concentración de compuestos tóxicos

En las plantas de tratamiento de aguas residuales industriales que funcionan correctamente, los microorganismos están aclimatados a la degradación de ciertos compuestos químicos. Pero en las industrias, cuando se limpian los tanques y reactores, un pico en la concentración de las sustancias tóxicas (aumento de concentración repentino) llega a la planta de tratamiento de aguas residuales. Después de que este aumento repentino, hay una disminución de la concentración del compuesto tóxico. Estas variaciones del sustrato del compuesto tóxico tienen un efecto importante en la actividad de los microorganismos (Moreno-Andrade *et al.*, 2003). Se ha observado que estas variaciones en la concentración de un sustrato a otro provocan la desaclimatación de los microorganismos perdiendo parcial o totalmente la actividad llegando incluso a la muerte (Coello Oviedo *et al.*, 2003).

1.2.4. Biodegradación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son contaminantes tóxicos comunes del ambiente los cuales son encontrados en aguas residuales de la industria papelera, farmacéutica, química, petroquímica, producción de conservadores de madera, plaguicidas, herbicidas, fungicidas, etc. En general, estos compuestos son xenobióticos, es decir, se producen de forma sintética por el hombre. Por ejemplo, más del 99% del fenol producido en el mundo es derivado de un proceso químico. En el 2001 la producción mundial de fenol fue de cerca de 6.4 millones de toneladas métricas (Kirk-Othmer, 2004).

Para evaluar la toxicidad de un compuesto en particular se determina la concentración a la cual la actividad de los microorganismos es reducida en un 50%. Este valor se denomina concentración efectiva o CE. También existen otros parámetros llamados concentración letal (CL) que es la concentración de la sustancia con la cual se produce inmovilidad o reducción del crecimiento en los organismos considerados, generalmente expresada como la media (CL₅₀), es decir cuando es afectado el 50% de los organismos

(APHA, 1992). La dosis letal es la cantidad estimada de una sustancia que produce la muerte de un organismo. Usualmente, la dosis letal se expresa como DL₅₀, la cual es la dosificación de un material que es mortal a 50% por ciento de una población evaluada. DL₅₀ es la manera estándar de determinar la toxicidad química.

Los compuestos fenólicos presentan diversos valores de toxicidad, la tabla 1.2 presenta los valores típicos de la DL₅₀ de diversos fenoles evaluados en laboratorio por vía oral en diversos organismos (NCBI, United States National Library of National Institutes of Health). Es posible observar que los compuestos clorofenólicos presentan valores entre de 27 y 670 mg/kg dependiendo del compuesto y el organismo evaluado. Esto implica que a bajas concentraciones, los compuestos fenólicos pueden presentar toxicidad si son vertidos sin un previo tratamiento.

Tabla 1.2 Dosis letal de diversos compuestos fenólicos

Compuesto	Organismo	DL ₅₀ (mg/kg)
Fenol	Rata	317
4-clorofenol	Mamíferos	500
	Ratón	367
	Rata	670
2-clorofenol	Mamíferos	440
3-clorofenol	Ratón	521
	Rata	570
4-nitrofenol	Mamíferos	247
4-aminofenol	Aves	56
	Mamíferos	1530
Pentaclorofenol	Hamster	168
	Ratón	36
	Rata	27

Fuente NCBI, United States National Library of National Institutes of Health:
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

En el caso de microorganismos, el efecto nocivo de los compuestos fenólicos se produce a muy bajas concentraciones. La tabla 1.3 presenta valores de CE₅₀ y CE₁₀ de varios clorofenoles sobre bacterias nitrificantes. La reducción de la actividad de los microorganismos se determinó por medio de la reducción de la tasa de consumo de oxígeno. Los valores reportados para EC₅₀ oscilan entre 0.1 y 8.1 mg/L durante 1 hora de exposición a los diferentes compuestos. Se puede observar que los valores de EC₅₀ son muy bajos ya que el clorofenol es muy tóxico para las bacterias nitrificantes, lo cual muestra que no son resistentes a la presencia de compuestos fenólicos.

Cuando las aguas residuales que contienen compuestos fenólicos son descargadas en cuerpos receptores de agua pueden producir cambios metabólicos en los seres vivos. Se ha reportado que estos compuestos presentan propiedades carcinogénicas y teratogénicas. La exposición del hombre a estos compuestos son casos de estudio recientes, por ejemplo, cerca de 50 fenoles bromados y clorados fueron encontrados en el plasma de donadores de sangre en Suecia (Hovander *et al.*, 2002).

Tabla 1.3 Concentración efectiva de diversos clorofenoles sobre bacterias nitrificantes

Compuesto	EC ₅₀ (mg/L)		EC ₁₀ (mg/L)	
	Tantasut <i>et al.</i> , 2006	Blum y Speece, 1991	Tantasut <i>et al.</i> , 2006	Inui <i>et al.</i> , 2002
2-clorofenol	0.7	2.7	0.1	0.9
3-clorofenol	0.2	0.	0.1	1.4
4-clorofenol	0.9	0.73	0.2	4.1
2,3-diclorofenol	0.3	0.42	0.1	12
2,4-diclorofenol	1.6	0.79	0.2	31
2,5-diclorofenol	0.3	0.61	0.1	7.6
2,6-diclorofenol	3.1	8.1	0.2	59
3,4-diclorofenol	2.0	N.R.*	0.8	32

*N.R. No reportada

Los clorofenoles son una de las familias de compuestos fenólicos más importantes debido a sus características inhibitorias. Los mono-clorofenoles se pueden formar por la cloración de aguas residuales y como resultado de la ruptura de plaguicidas y compuestos aromáticos clorados (Pritchard *et al.*, 1987). Los clorofenoles pueden migrar fácilmente de un ambiente acuoso a otro debido a relativamente alta solubilidad. Debido a sus características físicas y químicas es considerado sustancia peligrosa, por lo cual es importante realizar un tratamiento para la remoción de esta del agua residual. Adicionalmente a los efectos carcinogénicos mostrados por los compuestos fenólicos, se ha observado que los clorofenoles pueden causar fallas en el sistema respiratorio, atrofia de huesos y daños en la piel de animales (Kintz *et al.*, 1992) además de conferir un sabor y olor desagradable a alimentos y agua potable. Debido a las grandes cantidades producidas de estos compuestos, los efectos nocivos en animales y humanos así como para las cualidades organolépticas, los clorofenoles han sido catalogados por la EPA (Environmental Protection Agency, USA) como contaminantes prioritarios (Wentz, 1989).

Uno de los compuestos más importantes desde el punto de vista ambiental es el 4-clorofenol (4CF), debido a que es formado de la cloración del agua residual, durante la cloración para blanquear la pulpa para la fabricación de papel y de la ruptura de herbicidas fenólicos como por ejemplo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Pritchard *et al.*, 1987). El 4CF es también un producto de la degradación anaerobia de los fenoles más altamente clorados como el pentaclorofenol, que son utilizados intensivamente en el tratamiento de madera (Madsen y Aamand, 1992). Se ha reportado que el 4CF es un compuesto inhibitorio (con características similares a los fenólicos). Además, se ha reportado que los clorofenoles actúan como disruptores endocrinos, ya que provocan interferencia en el transporte de hormonas tiroideas (van den Berg, 1990).

Los clorofenoles son tóxicos para células individuales incluyendo bacterias, pues desacoplan la respiración de la célula (Escher *et al.*, 2001). Este efecto se debe a que los fenoles son solubles en lípidos, por lo cual pueden atravesar la membrana de la célula, además de ser ácidos débiles, con lo cual forman iones fenolato cuando el hidrógeno del grupo del hidroxilo se disocia del compuesto original. El tipo de sustituyentes del fenol afecta la constante de disociación (pKa) del compuesto. Por ejemplo, el fenol sin sustituir tiene un pKa de 10.0, mientras que para el caso de otros compuestos fenólicos monoclorados como el 4-clorofenol es de 9.4. Un ión de fenolato puede tomar un protón en el exterior de la membrana celular, pasar a través de la membrana y depositar el protón en el citoplasma de la célula. El ión de fenolato se puede difundir hacia afuera a través de la membrana celular, terminando un ciclo. El problema se complica debido a que los fenoles pueden formar dímeros que participan en este ciclo de desacoplamiento (Escher *et al.*, 1996). El efecto nocivo del desacoplamiento debido al fenol se incrementa ya que estos compuestos son letales para los microorganismos a cierta concentración (dependiendo del compuesto fenólico y el tipo de microorganismo). Existen tres rutas metabólicas para la degradación de compuestos aromáticos halogenados (como el 4CF) descritas por Commandeur y Parsons (1990) y sintetizadas a continuación.

1.2.4.1. Deshalogenación oxidativa

En esta ruta, el halógeno es perdido de forma fortuita durante la oxigenación del anillo. Esta reacción ocurre solamente bajo condiciones aerobias (Figura 1.4).

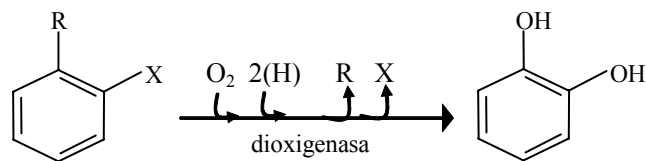


Figura 1.4 Ruta de degradación de compuestos haloaromáticos por desalogenación oxidativa. R puede ser COOH, H, NH₂ y X puede ser Cl, F, Br, I

1.2.4.2. Deshalogenación hidrolítica

En este caso el halógeno es remplazado específicamente por un grupo hidroxilo. El átomo de oxígeno en el grupo hidroxilo es derivado del agua en lugar del oxígeno. Esta reacción ocurre bajo condiciones aerobias y desnitrificantes (Figura 1.5).

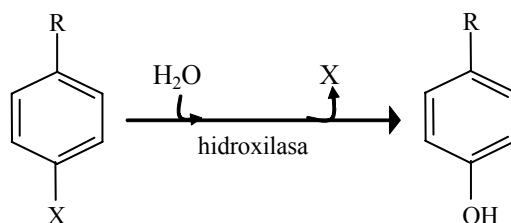


Figura 1.5 Ruta de degradación de compuestos haloaromáticos por desalogenación hidrolítica. R puede ser COOH, OH, NH₂ y X puede ser Cl, F, Br, I

1.2.4.3. Deshalogenación reductiva

El halógeno es remplazado por un hidrógeno. Esta reacción ocurre casi exclusivamente bajo condiciones anaerobias (metanogénicas o sulfato-reductoras). Se ha propuesto que los compuestos aromáticos halogenados actúan como aceptor terminal de electrones (Figura 1.6). En algunos casos se ha mostrado que la deshalogenación reductiva está unida al crecimiento y formación de ATP y puede ser referida a la respiración, también conocida como halorespiración.

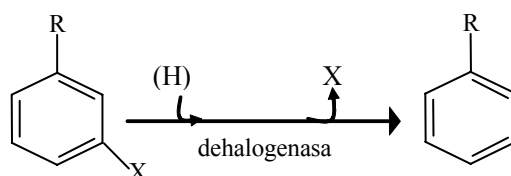


Figura 1.6 Ruta de degradación de compuestos haloaromáticos por desalogenación reductiva. R puede ser COOH, H, OH, C₆H₅, NH₂ y X puede ser Cl, F, Br, I

En el caso en particular de los compuestos fenólicos halogenados, se han identificado tres vías de degradación. Mono- y di-clorofenoles son oxigenados a clorocatecoles, mientras que los fenoles altamente clorados son hidroxilados para formar hidroxiquinonas cloradas. La ruta metabólica propuesta para la biodegradación del 4CF (Figura 1.7) consiste en una monooxigenación para formar clorocatecol, una posterior ruptura del anillo *orto* transforma el compuesto en ácido cloromucónico, una lactonización con la pérdida del cloro provoca la subsiguiente degradación del compuesto (Commandeur y Parsons, 1990).

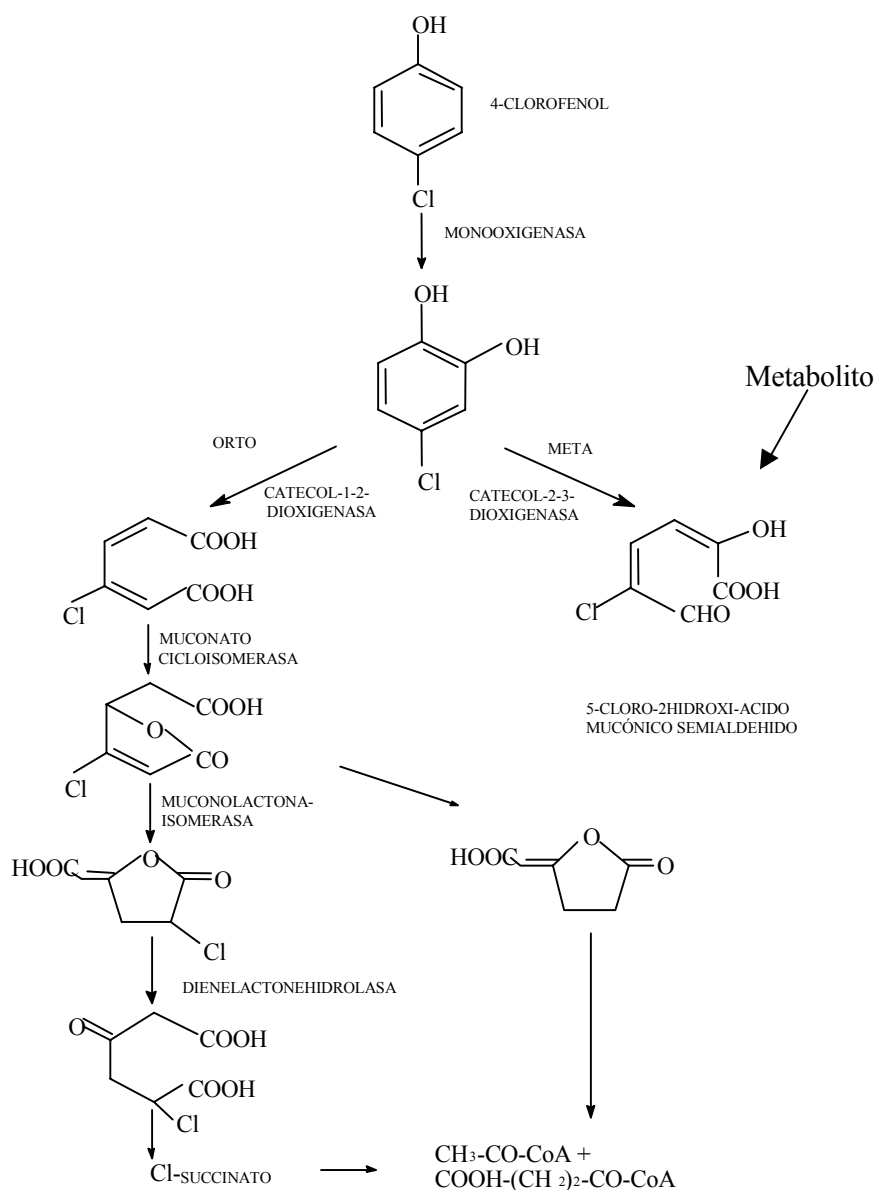


Figura 1.7 Vía de degradación del 4-clorofenol. Fuente: Commandeur y Parsons (1990)

Sin embargo, cuando la biomasa se encuentra en estrés (por ejemplo bajo picos de concentración de compuestos tóxicos o en condiciones de ayuno), los microorganismos pueden cambiar la vía de degradación de un sustrato. Este es el caso de la degradación del 4CF. Cuando la biomasa está bajo condiciones de estrés, existe la acumulación de un metabolito tóxico formado durante una ruta de degradación alterna. Este compuesto puede ser inhibitorio para los microorganismos a bajas concentraciones provocando que la degradación del 4CF sea poco eficiente (Westmeier y Rehm, 1987). En esta ruta alterna, la ruptura del anillo se realiza en la posición meta del clorocatecol, por medio de la catecol 2-3-dioxigenasa y produce el metabolito 5-cloro-2hidroxi-ácido mucónico semialdehído (Comandeur y Parsons, 1990). En este caso el medio adquiere una coloración verde-amarillenta.

Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar los mecanismos que afectan a la comunidad microbiana durante la biodegradación de compuestos fenólicos presentes en aguas residuales industriales con el fin de optimizar su tratamiento.

2.2 Objetivos particulares

- Evidenciar los cambios en la actividad de un consorcio de microorganismos (lodos activados) en la degradación de 4-clorofenol durante el proceso de aclimatación y desaclimatación por ayunos utilizando los parámetros cinéticos y respirométricos, así como técnicas de biología molecular (DGGE).
- Evaluar los cambios en la actividad y viabilidad de una cepa pura debido al ayuno durante la degradación de 4-clorofenol por medio del monitoreo de los parámetros cinéticos y citometría de flujo.

-
- Evaluar la aplicación práctica de una nueva estrategia de control y su efecto sobre la actividad de los microorganismos que llevan a cabo la biodegradación de aguas residuales inhibitorias por medio del monitoreo de los parámetros cinéticos.
 - Evaluar la dinámica de la comunidad bacteriana presente en el reactor durante la operación a largo plazo bajo la estrategia de control óptimo, utilizando técnicas de biología molecular (DGGE).
 - Estimar la aplicabilidad de la estrategia de control óptimo en la biodegradación de altas concentraciones de compuestos fenólicos con objeto de determinar la robustez del sistema ante incrementos puntuales de sustrato y los posibles efectos sobre los microorganismos.

2.3 Hipótesis

- Si se incrementa la actividad de los microorganismos por medio de la aclimatación, y ésta se mantiene cerca de su valor máximo, es posible llevar a cabo la biodegradación de compuestos fenólicos de manera óptima.

Metodología general

3.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental se divide en dos bloques (Figura 3.1). El primero de ellos es el estudio de los procesos de aclimatación y desaclimatación por ayunos en los microorganismos que llevan a cabo la degradación de 4-clorofenol con el fin de conocer los cambios en su actividad durante la degradación de compuestos tóxicos. También se estudió la evolución poblacional debido a los periodos de ayuno y abundancia que habitualmente existen en las plantas de tratamiento de aguas residuales industriales.

Se evaluaron los cambios en la actividad de los microorganismos en la degradación de 4-clorofenol durante la aclimatación y su posterior exposición a periodos de ayuno. Los estudios se realizaron con dos clases de inóculo: con lodos activados (cultivo mixto) y con una cepa pura (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145). En ambos casos se estudiaron los cambios durante la aclimatación de los microorganismos al 4-clorofenol utilizando los parámetros cinéticos, fisicoquímicos y respirométricos. Adicionalmente, para el caso

de los lodos activados se realizó un análisis de los cambios en la comunidad durante la aclimatación por medio de métodos de biología molecular. En el caso de la cepa pura se realizó la evaluación de la pérdida de viabilidad de las células debido a la exposición de la población a periodos de ayuno. Este análisis se realizó por medio de la técnica de cuenta heterótrofa en placa y por citometría de flujo.

El segundo bloque se refiere al empleo de una estrategia de control óptimo para la degradación de compuestos inhibitorios utilizando los conocimientos adquiridos en el primer bloque. El fin de esta estrategia es mantener a los microorganismos alrededor de su máxima tasa de degradación, es decir a la máxima actividad sin que exista inhibición por la concentración de compuestos tóxicos y así evitar su ayuno. Se evaluó la implementación práctica a largo plazo de la estrategia en la degradación de 4CF. Se expuso el reactor controlado a la degradación de aumentos puntuales de la concentración de 4CF (3000, 5000 y 7000 mg/L). También se probó el uso de la estrategia en la degradación de aguas residuales municipales mezcladas con diferentes concentraciones de fenol. Para este bloque de experimentos se emplearon microorganismos aclimatados a la degradación de 4CF y fenol, respectivamente.

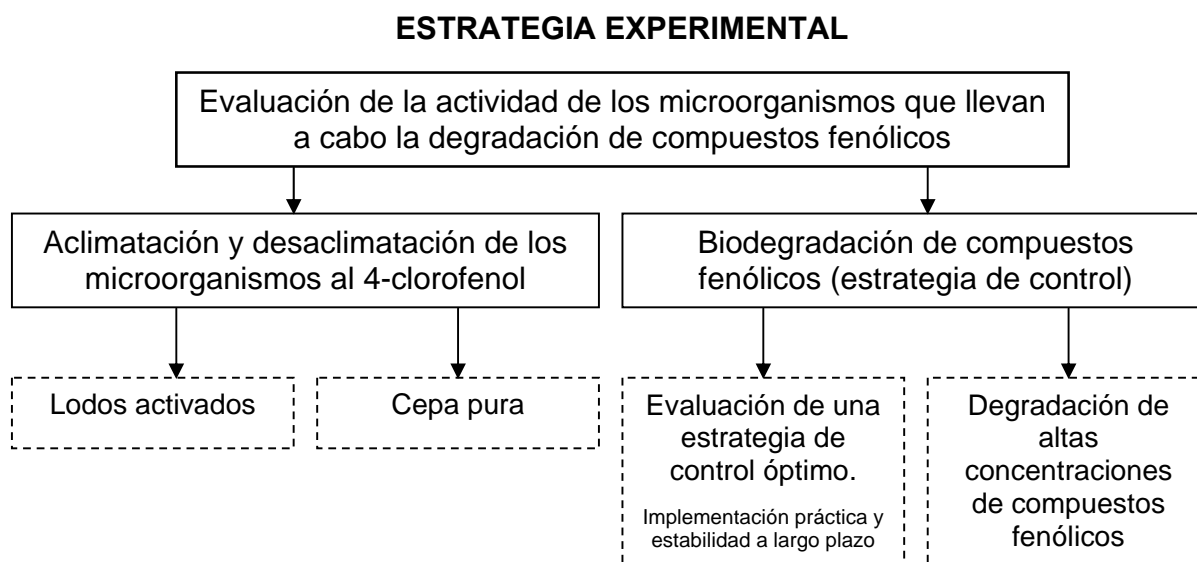


Figura 3.1 Estrategia experimental seguida

3.2 Reactores piloto

Se emplearon dos SBR aerobios para la realización de los experimentos. El primero fue usado para los experimentos con lodos activados descritos en los capítulos 4, 6 y 7. El segundo reactor se operado exclusivamente en los experimentos con la cepa pura (capítulo 5).

El primer SBR es un biorreactor aerobio instrumentado y automatizado, con una capacidad de 10L, un volumen útil de 7L y un volumen de intercambio de 57% (Figura 3.2). El flujo de aire empleado fue de 1.5 lpm y la temperatura fue controlada a 20°C dentro del reactor a través de la recirculación de agua con un calentador. El reactor fue equipado con un sensor en línea de oxígeno disuelto y temperatura Hendress+Hauser Modelo COS4 equipado con un transmisor (Liquisys-M COM223-DX1105. Las bombas de alimentación y vaciado fueron Cole-Parmer modelo 7523-50 (0-100 rpm) y 523-40 (0-600 rpm) Masterflex, respectivamente. El SBR fue operado con los siguientes tiempos en cada etapa: preaeración: 15 min; llenado: 5 min; reacción: variable dependiendo del tiempo necesario para conseguir una eficiencia de remoción de 4CF de 99%; sedimentación: 12 a 30 min. El tiempo de degradación fue determinado por medio de la medición de la observación del perfil de la concentración de oxígeno disuelto presente en el reactor (Buitrón *et al.*, 2003).

El biorreactor fue inoculado con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (2000 mg de sólidos suspendidos volátiles/L). Se empleo un agua sintética que contenía 4CF (Aldrich, pureza $\geq 99.0\%$) como única fuente de carbono y energía. Durante los experimentos de aclimatación y ayunos se agregaron los siguientes nutrientes por cada litro de agua preparada: 25.5 mg KH_2PO_4 , 32.6 mg K_2HPO_4 , 75.4 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 7.5 mg NH_4Cl , 22.5 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 36.4 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.25 mg $\text{Fe}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.036 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.057 mg H_3BO_3 , 0.02 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0347 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.055 mL EDTA y 0.045 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, de acuerdo con AFNOR (1985). Para el caso de la evaluación de los picos de concentración se agregaron los mismos nutrientes (excepto $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, EDTA y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) respetando la misma relación concentración de fenol/nutrientes.

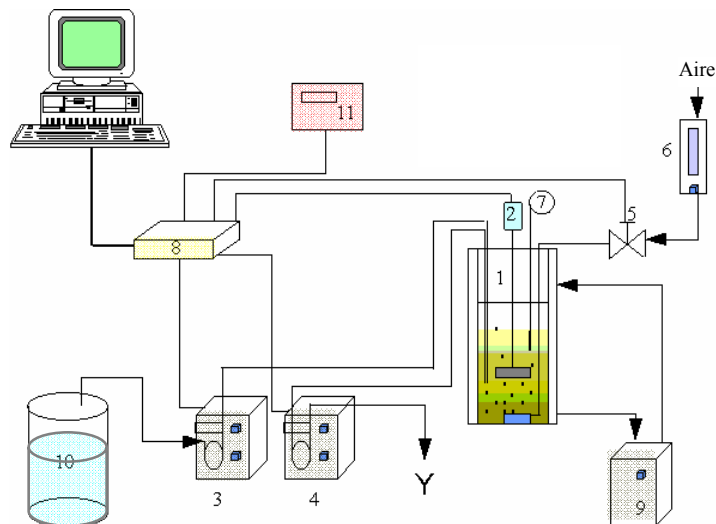
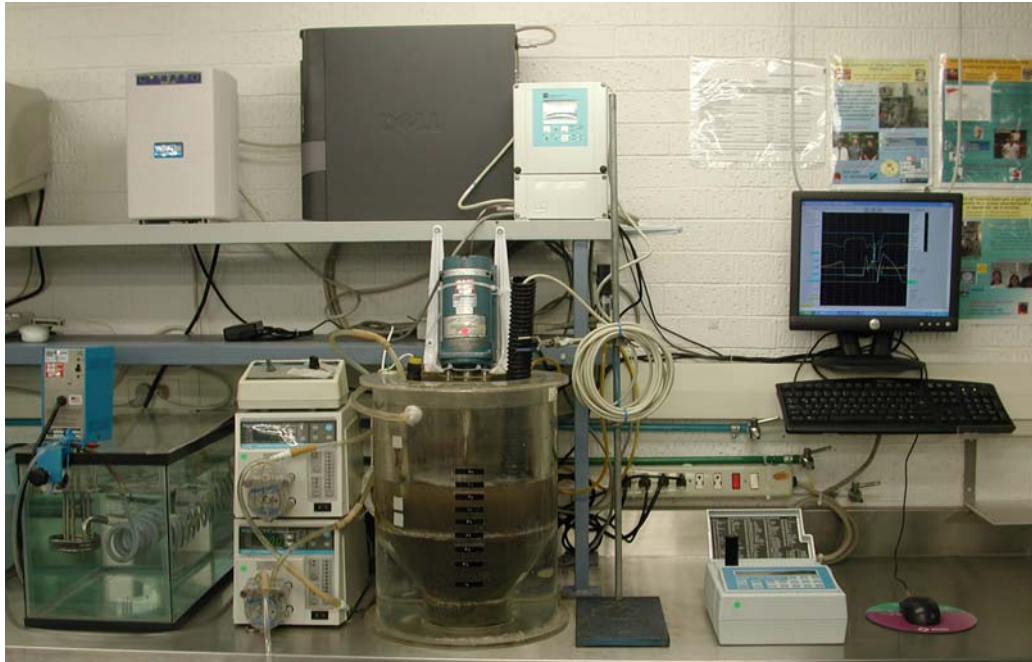


Figura 3.2 Reactor aerobio SBR automatizado. Reactor (1), agitador (2), bomba de llenado (3), bomba de vaciado (4), controlador de flujo másico (5), flujómetro (6), termómetro (7), interfase (8), calentador(9), tanque de almacenamiento (10), oxímetro (11)

El segundo reactor es un SBR esterilizable (Applikon, con chaqueta de control de temperatura) con capacidad de 7L y un volumen útil de 4L (Figura 3.3). El flujo de aire empleado fue de 1.5 litros por minuto y la temperatura fue mantenida en $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$ dentro del reactor por medio de una resistencia controlada. El reactor estaba conectado a un BioControlador (Applikon ADI 1030 Bio Controller), el cual controlaba su temperatura, así como la agitación (150 rpm), el oxígeno disuelto (70% del valor de

saturación del medio líquido) y el pH dentro del mismo (7 ± 0.2). El tiempo de degradación fue seguido midiendo la concentración de sustrato en el medio utilizando una técnica colorimétrica que se describiera más adelante (ver sección 3.1.3.1).



Figura 3.3 Reactor aerobio SBR para el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

El biorreactor fue esterilizado e inoculado con una cepa pura (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145). La pureza de la cepa fue corroborada por pruebas de morfología colonial y la prueba de identificación API 20-E. Este último sistema consta de 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas (API 20E, 1990). Como sustrato se empleó un agua sintética que contenía 25 mg/L de 4CF (Aldrich, pureza $\geq 99.0\%$) como única fuente de carbono y energía. Nutrientes como nitrógeno, fósforo y oligoelementos se agregaron siguiendo la técnica recomendada por AFNOR (1985). El sustrato y nutrientes fueron adicionados al reactor por medio de un filtro estéril Millex GS de 0.22 μm (Millipore) filtrado con un filtro de 0.45 μm , con el fin de que no existiera contaminación del medio. El sistema de aeración contaba con filtros de aire esterilizables Millex FG₅₀ de 0.20 μm (Millipore) con lo cual se aseguró la esterilidad del aire en el reactor. La parte superior del reactor contó con una salida para gas con un condensador de gases y un filtro de aire de 0.20 μm estéril Millex FG₅₀ de 0.20 μm (Millipore), para evitar la acumulación de presión y evitar la contaminación de la cepa.

3.3 Aclimatación de los microorganismos

La aclimatación de los microorganismos en todos los casos se realizó por medio de la estrategia de tiempos de reacción variables (y eficiencias fijas) descrita por Moreno y Buitrón (2004).

Al inicio se pone una cantidad conocida de biomasa en el reactor (en este caso 2000 mgSSV/L). En general es recomendable obtener el inóculo de una planta de lodos activados que trate aguas municipales, ya que este tipo de inóculos contiene una mayor diversidad bacteriana. Para evaluar si es posible la aclimatación de la biomasa a un sustrato es importante conocer la biodegradabilidad del compuesto o agua residual por medio de pruebas de biodegradabilidad y conocer qué concentraciones del compuesto o cargas orgánicas puede soportar la biomasa para evitar inhibición.

Es recomendable comenzar la aclimatación a bajas concentraciones de sustrato para que una vez que los microorganismos se adapten al tipo de sustrato se aumente la concentración del tóxico a la que están expuestos (poco a poco a través de los ciclos, en nuestro caso se realizó una aclimatación a 50 mg₄CF/L y a 100 mg₄CF/L para posteriormente aumentar la concentración a 200 mg₄CF/L). En la estrategia seguida para aclimatar (tiempos de reacción variables) la fase de reacción fue variable y detenida cuando la remoción del sustrato (en este caso el compuesto fenólico) es igual o mayor al 95% (en nuestro caso >99%).

Por lo anterior se debe evaluar continuamente la cinética de degradación para que cuando el compuesto tóxico sea removido, se continúe inmediatamente con la fase de sedimentación y vaciado, para posteriormente iniciar un nuevo ciclo. Con esto se evitan los problemas asociados con periodos prolongados de ayunos. Una vez que los tiempos de degradación se han estabilizado y la actividad de los microorganismos ya no aumenta, es posible decir que la aclimatación de los microorganismos se ha llevado a cabo.

3.4 Técnicas analíticas

3.4.1 Técnica de fenoles totales (4CF y fenol)

La concentración de sustrato fue medida por medio de muestreo y su posterior procesamiento fuera de línea por medio de la técnica colorimétrica usando 4-aminoantipirina (APHA, 1992). La muestra fue preservada bajando el pH de la muestra a menos de 2 adicionando 20 μL de una solución de ácido fosfórico (1:20). Los compuestos fenólicos reaccionan con la 4-aminoantipirina a un pH de 7.9 +/- 0.1 en presencia de un medio alcalino para formar un complejo de color que va del amarillo al naranja, la absorbancia es determinada en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm. La concentración del compuesto fenólico (fenol o 4-clorofenol) es proporcional a la absorbancia, por lo cual es necesario hacer previamente una curva de calibración.

3.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Las muestras fueron filtradas con filtros de microfibra de vidrio (*glass microfibre*) GFA (Whatman). Posteriormente fueron procesadas de acuerdo con las técnicas de HACH, Micrométodo para determinación de DQO (420 COD Low Range y 430 COD Low Range).

3.4.3 Carbono Orgánico Disuelto (COD)

Las muestras fueron filtradas con filtros Millipore (Durapore membrane filters 0.45 μm HV). El carbono orgánico disuelto (COD) fue determinado por medio del sistema Shimadzu TOC-5050. Este análisis se llevó a cabo con el fin de evaluar la mineralización de los compuestos fenólicos.

3.4.4 Metabolito

El metabolito, 5-cloro-2hidroxi-ácido mucónico semialdehído, el cual es formado por una ruta de degradación alternativa por los microorganismos, inhibitoria para ellos mismos (Comandeur y Parsons, 1990), fue determinada por medio de espectrofotometría a 380 nm usando un espectrofotómetro HACH.

3.4.5 Sólidos Suspendidos Volátiles y Sólidos Suspendidos Totales (SSV y SST)

Los sólidos suspendidos volátiles y totales (SSV y SST) se determinaron de acuerdo a APHA (1992) por métodos gravimétricos.

3.4.6 Índice Volumétrico de Lodos (IVL)

El IVL es una prueba que evalúa la capacidad de sedimentación o compactación del lodo. Se define como el volumen que ocupa un gramo de lodos, después de sedimentar durante 30 min., sus unidades son en mL/g. El IVL se determinó de acuerdo a Standard Methods (1992).

3.4.7 Velocidad de Sedimentación (VS)

La velocidad de sedimentación indica la rapidez con la que sedimenta un lodo expresado como m/h. La velocidad de sedimentación se determinó de acuerdo a APHA (1992). Para obtener el valor de VS se emplearon los datos obtenidos del IVL con la ecuación 3.1:

$$VS = \left(\frac{m(IVL)}{At} \right) (0.6) \quad (3.1)$$

donde m es la pendiente máxima obtenida en el experimento de IVL (cm^3/min), At es el área transversal de la probeta (cm^2) obtenida por $\pi \times r^2$, 0.6 es el factor de conversión de tiempo y volumen (conversión de min a h y cm a m, 60 min/1 h y 1 m/100 cm).

3.4.8 Respirometría

Con el fin de conocer la evolución de la actividad respirométrica, la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) fue medida por medio de un mini reactor de 160 mL al cual se le agregaron 10 mL de los microorganismos del SBR, estos se tomaron justo después de que la degradación llegara a su fin.

Una solución saturada de oxígeno con nutrientes y sustrato (acetato o 4CF) fue añadida y se monitoreo la cantidad de oxígeno disuelto en el reactor durante 15 minutos. La respiración endógena fue medida utilizando solo nutrientes. La TECO fue determinada por medio de la pendiente obtenida al graficar la concentración de oxígeno en función del tiempo y dividida por la concentración de SSV.

La TECO reportada representa el consumo exógeno debido a la degradación del sustrato y fue calculada con la ecuación 3.2:

$$TECO = TECO_T - TECO_{end} \quad (3.2)$$

donde: TECO es la tasa específica de consumo de oxígeno exógena, $TECO_T$ es la tasa específica de consumo total (evaluada en la respirometría con sustrato) y $TECO_{end}$ es la tasa específica de consumo endógeno (evaluada en la respirometría sin sustrato).

3.5 Biología molecular

Se emplearon técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polimerase Chain Reaction*), Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*), clonado y secuenciación. El ADN total fue extraído a partir de muestras de 2 mL del lodo activado usando un kit de aislamiento de ADN (Ultra clean™ Soil DNA isolation kit, MoBio). La amplificación por PCR fue realizada de acuerdo con un ciclo de temperatura recomendado por BioRad, con el siguiente programa: activación inicial 95°C (15 min), 35 ciclos de: desnaturización 94°C (1 min), 53°C para alineación (1 minuto) y elongación a 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (1 min). Los primers universales GC-338F y 518R fueron utilizados para la amplificación de acuerdo con Muyzer *et al.* (1995).

Los productos de PCR fueron separados por la técnica de DGGE usando el sistema D-code universal mutation detection system (BioRad, Hercules, CA) según lo descrito por Muyzer *et al.* (1995). Las porciones centrales de las bandas seleccionadas fueron cortadas y los amplicons extraídos fueron utilizados como plantilla para la re-amplificación. Estos productos de PCR fueron clonados en el plásmido PCR2.1-TOPO (Invitrogen,

USA.). Los clones positivos fueron secuenciados con el primer M13 reversa (5'-CAGGAAACAGCTATGAC) en un secuenciador ABI Prism 3100 DNA sequencer. La identificación de los clones se realizó por medio de una búsqueda en la base de datos GenBank por medio del software BLAST (del NCBI, *National Center for Biotechnology Information*).

3.6 Viabilidad de las células de una cepa pura expuesta a ayunos

Se emplearon dos técnicas con el fin de conocer los cambios en la viabilidad de las células. La primera de ellas fue la cuenta heterótrofa en placa (CHP) de acuerdo con APHA (1998). Con la CHP es posible estimar el número de bacterias heterótrofas en el agua con lo cual se pueden medir los cambios en la capacidad de las células vivas para reproducirse. El problema de esta técnica es que las células vivas que perdieron la capacidad de reproducirse no son cuantificadas.

La segunda técnica empleada fue la citometría de flujo. De acuerdo con el estado fisiológico de las células se pueden dividir en vivas y muertas. Las células vivas incluyen aquellas que están metabólicamente activas, que pueden ser viables (con posibilidad de duplicarse) o no viables (pérdida de la viabilidad, es decir, ya no pueden duplicarse). Las células vivas son coloreadas por diacetato de 5-clorometil fluoresceína (CMFDA) la cual mide la actividad de las esterazas por la hidrólisis de la CMFDA y es comúnmente usada para medir la actividad de la membrana de células intactas. Las células muertas adquieren el colorante de yoduro de propidio (IP). Las células en transición o vivas no viables (con membrana dañada pero no muertas) son coloreadas por IP y CMFDA (Davey y Kell, 1996). Las muestras fueron expuestas a los diferentes colorantes y posteriormente fueron analizadas en un citómetro de flujo (Beckman Coulter Epics Altra Flow Cytometry), el cual analiza la intensidad de la fluorescencia de cada célula.

El mecanismo del citómetro de flujo hace pasar una muestra de células alineadas una por una frente a un haz láser. El impacto del láser en cada célula produce señales que

corresponden a diferentes parámetros de la célula, los cuales son determinados por diferentes detectores. Estas medidas se transforman en señales eléctricas que posteriormente son digitalizadas en una medición simultánea de las células, con los cuales se construyen gráficas para la evaluación de la viabilidad.

3.7 Análisis de toxicidad por medio del método Microtox

Se realizaron pruebas para determinar la toxicidad del efluente y del influente durante la operación del reactor con la estrategia de control, por medio de un análisis con un Microtox (Model 500 Analyzer, AZUR Environmental). Este método es una herramienta muy útil para estimar la toxicidad de diferentes compuestos químicos y efluentes tóxicos, se basa en medir la reducción de la producción de luz de la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*. La reducción de luminosidad es resultado de la exposición del microorganismo al compuesto tóxico.

Para realizar el análisis, se colectaron muestras de la solución de alimentación y del efluente del reactor en frascos ámbar, con tapa de teflón. Los frascos se llenaron hasta el borde para evitar la pérdida de los compuestos volátiles. El pH de la muestra fue de 7. La muestra del influente (100 mg/l de 4-clorofenol más nutrientes) se analizó sin y con dilución (100% y 50%). Para cada una de éstas se hicieron 3 diluciones. Las pruebas se llevaron a cabo a 20°C en condiciones controladas. Como referencia se empleó una solución estándar de fenol (100 mg fenol/L). El fenol generalmente presenta una EC₅₀ entre 13 y 26 mg/L a las 24 h.

La toxicidad total de las muestras fue medida con el método básico de toxicidad de Microtox (Acute Toxicity Test y Basic Method), esta es una técnica standard (ASTM D-5660-96, 2004) y la (ISO 11348-3, 1998). Los valores de EC₅₀ se determinaron con tiempos de contacto de 5 y 15 minutos utilizando como químico de referencia una solución de fenol (100 mg/L) a una temperatura constante de 20°C ± 1°C. Todas las muestras se corren por duplicado y en forma simultánea con la muestra de referencia.

Aclimatación y desaclimatación de lodos activados

4.1 Introducción

En general el primer paso para biodegradar sustancias tóxicas en una planta de tratamiento de aguas residuales es la adaptación de los microorganismos a la degradación de los sustratos (aclimatación). Cuando los microorganismos se ponen en contacto con compuestos tóxicos, en un ambiente favorable, se puede llevar a cabo la aclimatación de los microorganismos a esos compuestos (Aelion *et al.*, 1989).

Publicaciones en revistas internacionales derivadas de este capítulo:

Moreno-Andrade I. y Buitrón G. (2004). Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology*. 50 (10), 251-258.

En los sistemas batch, los microorganismos están expuestos a presiones de selección por el comportamiento cíclico del proceso discontinuo (por ejemplo etapas con falta de aeración, como la sedimentación y vaciado), el cual favorece a los microorganismos que pueden resistirlo.

Debido a esta selección de microorganismos, los reactores SBR han mostrado ser eficientes en la remoción de nitrógeno, fósforo, compuestos orgánicos de aguas residuales industriales, residuos peligrosos y control de bacterias filamentosas (Irving y Ketchum, 1989). La selección y distribución de los microorganismos en los reactores discontinuos son influenciados por la naturaleza de los sustratos, la magnitud de la variación de la tasa de crecimiento, el tiempo que los microorganismos están expuestos a condiciones de abundancia y ayuno, el tiempo que los microorganismos están expuestos a condiciones aerobias, anaerobias o anóxicas y por los subproductos generados en el sistema.

Diversos fenómenos se han propuesto para explicar la fase de la aclimatación. Wiggings *et al.* (1987) sugirieron que existe una selección y multiplicación de microorganismos especializados durante esta fase. Además pueden existir transformaciones fisiológicas en el sistema metabólico de los microorganismos, es decir, alteraciones a nivel regulación y producción enzimática, mutaciones, etc. Los mecanismos que pueden ocurrir durante la aclimatación son los siguientes (Buitrón y Capdeville, 1995):

- **Mecanismo enzimático.** Los microorganismos no poseen las enzimas inducidas a menos que el compuesto este presente en el medio. Un metabolito fortuito se produce cuando existe una enzima que suele tener una actividad catalítica hacia un sustrato nuevo (Stephenson *et al.*, 1984).
- **Multiplicación de microorganismos especializados.** En este caso, la aclimatación es el tiempo necesario para que exista una multiplicación de una población inicial pequeña de microorganismos activos que pueden degradar el sustrato presente (Ventullo y Larson, 1986). En esta fase hay una selección de los microorganismos degradadores.

-
- **Cambios genéticos.** Cambios genéticos o mutaciones han sido asociados a algunos casos de aclimatación (Subba-Rao *et al.*, 1982). Estos pueden ser fenotípicos o genotípicos. En el primer caso, la información genética de la célula permanece sin cambios; solo el grado de expresión de los genes es modificado. En los cambios genotípicos la modificación es a nivel de los genes y es heredable.
 - **Toxicidad.** Durante la aclimatación los microorganismos degradadores se acostumbran a toxinas o inhibidores en su ambiente, con lo cual pueden degradar el sustrato debido a esta tolerancia (Wiggings *et al.*, 1987).

La duración de la aclimatación se ve afectada por varios factores ambientales como la temperatura, el pH, la concentración de macronutrientes (nitrógeno y fósforo), la concentración del compuesto que está siendo metabolizado, incremento o decremento de salinidad, aumento o disminución de pH, radiación ultravioleta y distintos compuestos tóxicos (incluyendo antibióticos, compuestos fenólicos, etc.). Los períodos de aclimatación pueden variar de varias horas y varios días dependiendo de las características del agua residual (Wiggings *et al.*, 1987) y de las características iniciales del inóculo (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004).

Se ha demostrado que la aclimatación no es permanente (Buitrón y Moreno, 2004). La exposición de la comunidad aclimatada a períodos prolongados de inanición (ayuno) produce una disminución de la actividad e incluso la muerte de algunos de los microorganismos (Coello Oviedo *et al.*, 2003). Buitrón *et al.* (1994) encontraron un efecto negativo en la actividad de los microorganismos en lodos activados debido a la exposición de ayunos al 4CF en un SBR. En ese estudio la aeración se extendió entre 20 y 23 horas después de la degradación completa del tóxico, encontrando que el tiempo de degradación se incrementó seis veces (de 0.7 a 4.5 h) como resultado del ayuno. Esta pérdida en la capacidad de degradación de los microorganismos fue atribuida a una disminución de la actividad enzimática y de la viabilidad de las células en suspensión (Buitrón *et al.*, 1994). Actualmente no es claro por qué una comunidad microbiana aclimatada a un sustrato en particular pierde su actividad; esto puede resultar de una disminución en el número de los microorganismos responsables o en una pérdida de la actividad metabólica en la ausencia un sustrato específico (Alexander, 1999).

El objetivo de este capítulo es evidenciar los cambios en la actividad de un consorcio de microorganismos en la degradación de 4-clorofenol, durante los procesos de aclimatación y desaclimatación por ayunos, empleando los parámetros cinéticos y respirométricos, así como técnicas de biología molecular (DGGE).

4.2 Metodología

Para los experimentos descritos en este capítulo se empleó el reactor discontinuo de lodos activados descrito en el capítulo 3.

4.2.1 Aclimatación

El reactor fue inoculado con lodos activados provenientes de una planta de tratamiento de lodos activados municipal conteniendo una cantidad de 2000 mgVSS/L. La biomasa fue aclimatada por medio de la estrategia de ciclos variables, en la cual la duración de la fase de reacción fue variable y detenida cuando la remoción de 4CF fuera igual o mayor a 95%.

El diseño experimental consideró tres diferentes bloques de experimentos, con concentraciones iniciales de 4CF de 50, 100 y 200 mg/L (llamados AC50, AC100 y AC200, respectivamente). Cada experimento fue iniciado con lodos activados recientes, es decir directamente de la planta, a excepción del caso AC200, en el cual el inóculo fue previamente aclimatado a la degradación de 100 mg/L. Adicionalmente se evaluó la tasa específica de degradación de cuatro aclimataciones a 350 mg4CF/L en la alimentación y distintas biombras iniciales (entre 1500 y 2000 mgSSV/L).

Durante una aclimatación a 350 mg4CF/L en el influente y 2000 mgSSV/L, se tomaron muestras del reactor durante el periodo de aclimatación cada 24 h durante 5 días, es decir, las muestras fueron colectadas en 24, 48, 72, 96 y 120 h, para determinar la diversidad y la dinámica de la comunidad microbiana por medio del análisis de DGGE.

4.2.2 Desaclimatación (Ayunos)

La biomasa aclimatada fue expuesta a diferentes periodos de ayuno, los cuales fueron introducidos manteniendo la aeración el tiempo necesario después de que la degradación del 4CF fue completada. En otras palabras, los microorganismos se mantuvieron en condiciones endógenas. Para cada biomasa aclimatada a 50, 100 y 200 mg/L (DA50, DA100 y DA200) fueron estudiados distintos tiempos de ayuno: para DA50: 8, 12 y 24h; para DA100: 12 y 24 h; y para DA200: 12, 24 y 36 h. En cada experimento, se siguieron las cinéticas de degradación (DQO, COD, 4CF); la TECO antes y después del periodo de ayuno. Para cada bloque de condiciones se utilizó el mismo reactor.

En cada una de las condiciones de ayuno la biomasa fue recuperada a su actividad inicial máxima, es decir, la actividad observada antes de ser expuesta al ayuno, esto se realizó integrando una fase de aclimatación pequeña hasta recobrar el tiempo de degradación observado antes del ayuno.

4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Aclimatación

Para las dos primeras concentraciones de 4CF empleadas, la aclimatación fue obtenida en 10 ciclos de degradación. Durante la aclimatación, el 4CF fue degradado con eficiencias mayores al 99% como 4CF y mayor de 95% como DQO y COD. Durante la aclimatación de los lodos activados la relación entre la concentración residual del 4CF y el tiempo de degradación fue cambiando gradualmente y una vez alcanzada la máxima actividad se volvió constante. En el caso de AC50, el tiempo de degradación se redujo de 40 h a 50 min, después de 75 h (del ciclo 1 al ciclo 10) (Figura 4.1 A). Para AC100 (Figura 4.1 B) el tiempo de degradación se redujo de 52 a 1.16 h, después de 125 h (del ciclo 1 al 10). Se observó que existe un incremento proporcional en el periodo de aclimatación cuando la concentración inicial del tóxico es incrementada de 50 a 100 mg/L (75 vs 125 h).

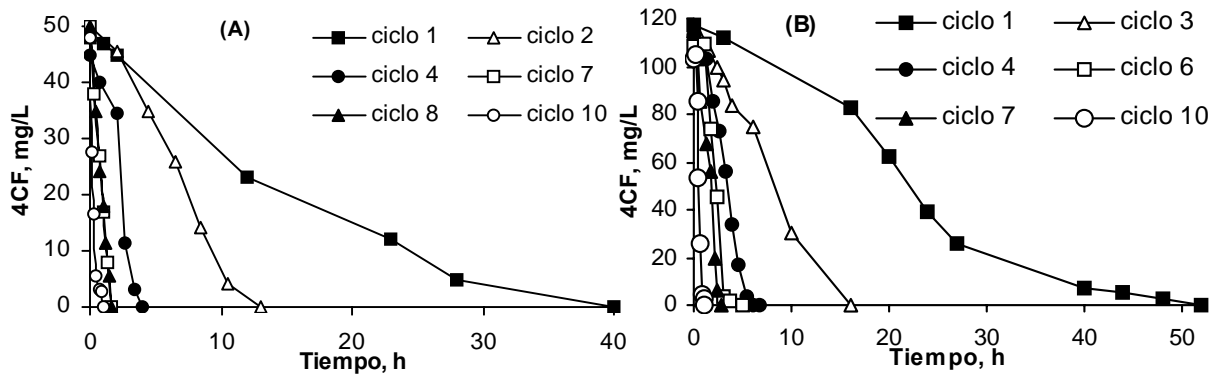


Figura 4.1 Cinéticas de degradación durante el proceso de aclimatación al 4CF. A) Aclimatación a 50 mg /L y B) Aclimatación a 100 mg/L

En la Figura 4.2 se puede observar el comportamiento del oxígeno disuelto (OD) en función del tiempo durante la aclimatación. Durante el primer ciclo prácticamente no hay cambios en la concentración de OD puesto que la eliminación de 4CF es muy lenta. En el ciclo 2 es posible notar un mínimo en la concentración de OD. Este punto corresponde a la actividad máxima de degradación de los microorganismos. Una vez que se ha degradado el compuesto el OD tiende a la saturación, con lo cual la actividad de los microorganismos es mínima. Por lo anterior, es posible predecir el final de la fase de la reacción observando el respirograma. Podemos considerar que la degradación de 4CF se completa una vez que el OD ha pasado por un valor mínimo y ha alcanzado otra vez el valor de la saturación. Una vez que la aclimatación se ha alcanzado el comportamiento del OD es repetitivo para cada ciclo. Así mismo, el tiempo de degradación puede ser correlacionado con el comportamiento del OD.

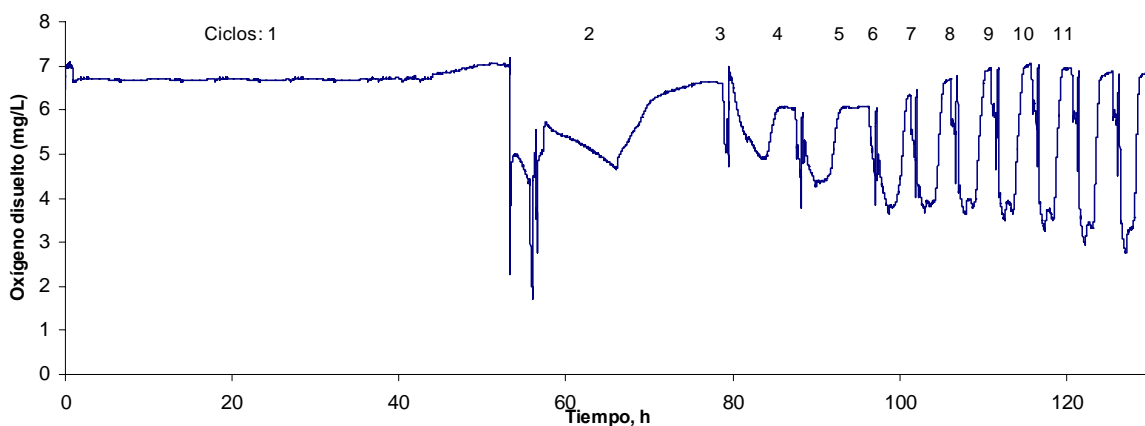


Figura 4.2 Comportamiento del oxígeno disuelto, como una función del tiempo de los ciclos de aclimatación

Cuando el inóculo pre-aclimatado a 100 mg/L de 4CF (AC200) fue expuesto a un incremento del 100% de la concentración inicial, la degradación fue afectada levemente. El primer ciclo de degradación de AC200 llevó solamente 2.5h para remover el 100% de la concentración inicial de 4CF. Después de 5 ciclos, el tiempo de degradación fue reducido a 1.75 h (del ciclo 1 al 6). Este resultado indica que durante la aclimatación AC200 los microorganismos que se multiplican en esta fase desarrollan la actividad enzimática necesaria para la degradación del tóxico. Se observó que al duplicar la concentración inicial de 4CF solo generó un incremento proporcional en el tiempo de degradación.

La Figura 4.3 muestra el aumento de la tasa de específica de degradación (q) durante la aclimatación a 350 mg/L de 4CF (los datos son el promedio y la desviación estándar de 4 aclimataciones con las mismas condiciones iniciales y biomasa inicial distintas). La q aumenta a medida que la aclimatación se presenta, llegando a un máximo alrededor de 40 mg4CF/gSSV/h. Este máximo se presentó cuando la aclimatación fue alcanzada.

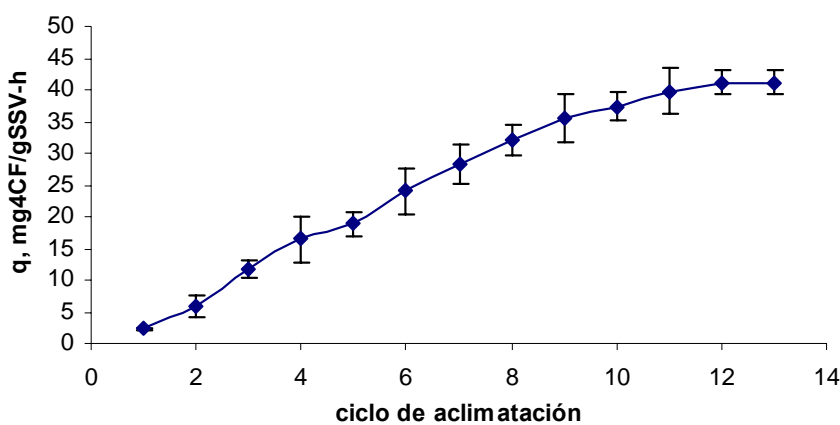


Figura 4.3 Tasa específica de degradación durante la aclimatación a 350mg/L de 4CF. Promedio de cuatro experimentos con inóculo sin aclimatar a 4CF

Al comparar los resultados con la literatura es posible observar que dependiendo de las condiciones bajo las cuales se realice la degradación, se pueden obtener distintas tasas de degradación. Hu *et al.* (2005) obtuvieron tasas de degradación de 0.2 mg/4CF/mgSSV/h en una mezcla sintética de varios compuestos orgánicos. Los resultados de Kargi *et al.* (2005) al emplear un lodo sin aclimatar, muestran tasas de degradación de 0.6 mg/4CF/mgSSV/h. Por otra parte, Moreno y Buitrón (2004) reportan

la degradación de 100 mg/L de 4CF con distintos inóculos, en condiciones similares a las empleadas en este trabajo de investigación, obteniendo tasas de degradación de entre 35 y 58 mg/4CF/mgSSV/h, las cuales corresponden a las obtenidas en el presente estudio.

Cuando la biomasa fue completamente aclimatada al 4CF, los ciclos siguientes mostraron una curva de degradación similar, independientemente de la concentración inicial de la aclimatación. Se ha observado que los microorganismos aclimatados podrían degradar concentraciones de 4CP hasta 1050 mg/L (Buitrón *et al.*, 2003).

4.3.2 Actividad de los microorganismos en la aclimatación

La Figura 4.4 presenta la evolución de la TECO registrada durante la aclimatación al 4CF. La respirometría se evaluó en dos experimentos en paralelo; en el primero la TECO fue medida en un mini-reactor utilizando acetato como sustrato y 4CF en el segundo. En ambos casos el sustrato fue empleado como única fuente de carbono y energía. La respiración endógena fue evaluada y utilizada para obtener la TECO exógena (ecuación 3.2).

Cuando la aclimatación concluye, se observa un incremento en la TECO del 4CF. En caso de la TECO del acetato la respuesta fue contraria a la del 4CF. En la Figura 4.4 se puede observar el punto de cruce a las 60 h y 80 h para el caso de AC50 y AC100, respectivamente. Se puede considerar que después de este punto, la afinidad del consorcio es mayor hacia el compuesto tóxico, que hacia un sustrato fácilmente biodegradable como lo es el acetato. Se ha discutido que cuando una comunidad está aclimatada a degradar un compuesto químico, la actividad de los microorganismos se orienta hacia el consumo de ese compuesto. Este estado en la actividad se mantiene por algún tiempo, esto es, el potencial de actividad continuará alto en comparación con los microorganismos que no han adquirido esta capacidad (Alexander, 1999). En nuestro caso la actividad degradadora hacia el acetato se ve desplazada ya que los microorganismos orientan su metabolismo hacia la degradación del 4CF al que se mantienen continuamente inducidos. Cabe recordar que durante la aclimatación la única fuente de carbono y energía fué el 4CF. El acetato únicamente fué puesto en contacto con los microorganismos unos minutos para realizar la prueba de actividad

respirométrica. Sería lógico pensar que si se vuelven a mantener los microorganismos en presencia de acetato, éstos tendrán una readaptación al mismo.

La Figura 4.5 presenta la tasa específica de degradación, q , como una función del tiempo de aclimatación. En general, se puede observar que para todos los casos existe un aumento en la tasa de degradación debido a la aclimatación. La tendencia de la q durante el período de aclimatación adopta una relación sigmoideal. Resultados similares fueron observados con lodos anaerobios al ser aclimatados a la degradación de clorofenoles (Ye y Shen, 2003).

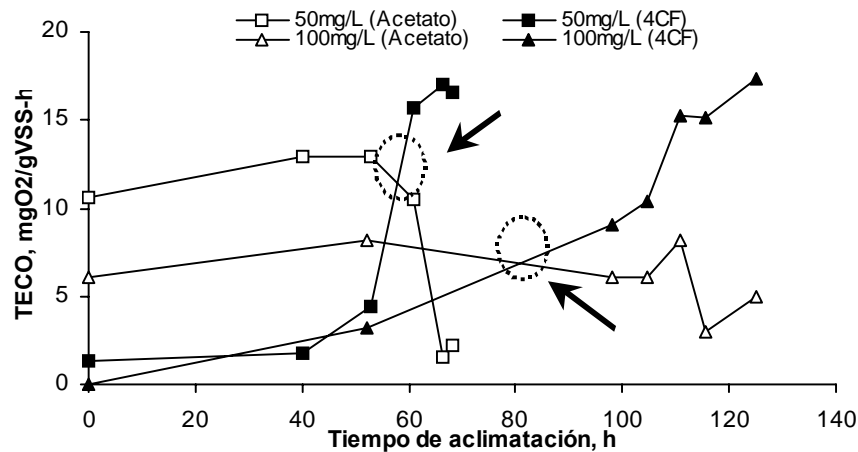


Figura 4.4 Evolución de la tasa específica de consumo de oxígeno (TECO) para los microorganismos aclimatados al 4CF. Las flechas indican el punto de cruce donde la actividad al consumo de 4CF es mayor a la actividad de consumo de acetato

El comportamiento observado en el actual trabajo sugirió que la adaptación se pudo haber causado por el crecimiento de una nueva población. Este efecto es claro para el lodo activado que fue puesto en contacto por primera vez al 4CF (AC50, AC100). Sin embargo, este comportamiento no fue observado para el caso donde había solamente un aumento de la concentración del compuesto tóxico (AC200), puesto que la biomasa se encontraba aclimatada al mismo. En este caso, la tendencia de la q , es un comportamiento de una relación logarítmica. Después de que la aclimatación es completada, no existe más el crecimiento en la q , por lo cual se estabiliza en un punto donde el valor es el mayor. Debido a lo anterior, es posible proponer un modelo

matemático que describa el proceso de aclimatación como una curva sigmoideal, la cual es definida a continuación:

$$q = \frac{q_{\max} \left(\frac{ta}{K_s} \right)^n}{1 + \left(\frac{ta}{K_s} \right)^n} \quad (4.1)$$

donde q es la tasa específica de degradación, ta es el tiempo de aclimatación (h), q_{\max} es la tasa máxima específica de degradación, K_s es la constante de velocidad media y n es la constante de transición.

La Figura 4.5 muestra el ajuste de los datos experimentales de la q al modelo propuesto. El ajuste se realizó empleando el software Excel con la herramienta Solver. El coeficiente de variación se calculó por medio de la ecuación 4.2:

$$r^2 = 1 - \frac{SS_E}{SS_{TC}} \quad (4.2)$$

$$SS_E = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (4.3)$$

$$SS_{TC} = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (4.4)$$

donde r^2 es el coeficiente de correlación, SS_E es la suma de cuadrados del error, SS_{TC} es la suma corregida total de cuadrados, y_i son los datos experimentales, \bar{y} es el promedio de los datos, \hat{y}_i son los datos predichos por el modelo.

Es posible observar que después del punto de cruce discutido anteriormente, la q se incrementa exponencialmente (ver el caso de la aclimatación a 100 mg/L). Por lo anterior, podemos considerar que existe un punto en donde la afinidad de las comunidades puede girar bruscamente a la degradación de compuestos tóxicos, con lo cual la tasa de degradación se incrementa rápidamente. Una vez que la aclimatación está llegando a su fin, la q se estabiliza (parte final de la curva), indicando que la máxima tasa de degradación se ha obtenido y si el biorreactor continúa operando en modo

estable, la tasa de degradación también permanecerá estable. El comportamiento fue similar para el caso del COD, por lo cual la tasa específica de degradación es correlacionada la mineralización del compuesto.

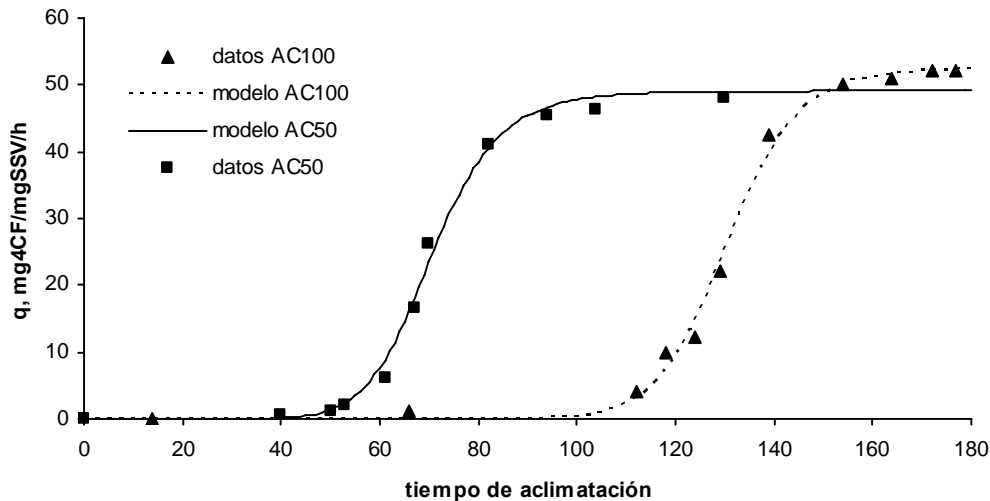


Figura 4.5 Evolución de la tasa específica de degradación, q , como una función del tiempo de aclimatación. Es posible notar un buen ajuste de los datos experimentales con el modelo propuesto. En el caso de AC50 $q_{\max}=52.5$, $n=18.2$ y $r^2= 0.994$. Para el caso de AC 100 $q_{\max}=49.1$, $n=10.4$ y $r^2= 0.994$

Después de que la aclimatación es completada no existe más el crecimiento en la tasa específica de degradación. La q se estabiliza en el punto máximo, lo cual relaciona con la máxima actividad metabólica de los microorganismos.

Por lo anterior, podemos concluir que durante la aclimatación se maximiza la actividad de los microorganismos a la degradación de algún sustrato en particular. Esta actividad se mantendrá siempre y cuando las condiciones de operación del biorreactor sean las adecuadas, es decir si no existen condiciones de estrés, como el aumento repentino en la concentración del sustrato tóxico o la exposición de la biomasa a largos periodos de ayuno.

Cuando los microorganismos aclimatados a 100 mg/L fueron expuestos a un aumento del doble de concentración de sustrato, la q se redujo de 50 a 38 $\text{mg}_4\text{CF}/\text{gSSV}/\text{h}$, lo cual indica que existe una inhibición de los microorganismos. En los siguientes ciclos la q aumenta (debido a la adaptación de los microorganismos a esta nueva concentración de

sustrato), estabilizándose en un valor cercano a 60 (Figura 4.6). En este caso, el comportamiento seguido por la biomasa se puede explicar por medio de un modelo logarítmico representado por la ecuación 4.5:

$$q = m \ln(ta) + b \quad (4.5)$$

donde q es la tasa específica de degradación, m es la pendiente, ta es el tiempo de aclimatación y b es la ordenada de origen.

La Figura 4.6 muestra los resultados del ajuste de los datos experimentales al modelo logarítmico. A diferencia del modelo sigmoideal que sigue la aclimatación de los microorganismos cuando nunca han estado en contacto con el compuesto tóxico, el aumento logarítmico en la tasa de degradación es debido a que existe una readaptación de las células para consumir esta concentración de sustrato y evitar ser inhibidas por este aumento en la concentración. Sin embargo, esta capacidad de readaptación tiene un límite. Por ejemplo, para el caso de la degradación de 4CF en SBR (con una comunidad aclimatada a la degradación de 200 mg/L), un aumento repentino de la concentración del 4CF a más de 500 mg/L produce una total inhibición de los microorganismos (Buitrón *et al.*, 2003). Esta inhibición a altas concentraciones es irreversible, causando la muerte de los microorganismos.

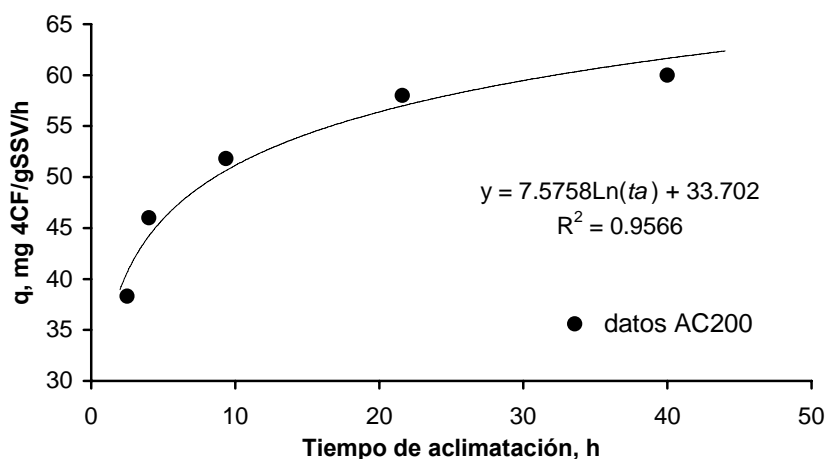


Figura 4.6 Evolución de la tasa específica de degradación de una biomasa aclimatada a 100 mg4CF/L al ser expuesta en una aumento del doble de la concentración del sustrato. Es posible notar el ajuste de los datos experimentales con el modelo logarítmico propuesto. En la Figura se muestran la ecuación del gráfico y la r^2 .

Se debe tener cuidado cuando la aclimatación es realizada, ya que si se ingresa una cantidad elevada de tóxico (mayor a la concentración inhibitoria) existirán problemas y la aclimatación no se llevaría a cabo. Moreno-Andrade y Buitrón (2003) observaron que esta inhibición no solo es función de la concentración inicial del compuesto tóxico, sino también de la concentración inicial de biomasa. En general, una concentración baja de biomasa puede producir un alto grado de inhibición. Por esta razón la aclimatación se debe realizar con valores bajos de la relación sustrato/microorganismos (menores de 0.4).

4.3.3 Producción de metabolito en la aclimatación

El metabolito 5-cloro-2hidroxi-ácido mucónico semialdehído (Comandeur y Parsons, 1990) es un compuesto formado como una vía alterna de degradación del 4CF por los microorganismos y puede ser inhibitorio a bajas concentraciones. La Figura 4.7A, muestra la producción de metabolito durante la aclimatación. Con el fin de tomar en cuenta la producción de metabolito, se cuantificó por medio de la absorbancia evaluada durante el ciclo de degradación (el área bajo la curva), es decir, el metabolito se contabilizó como absorbancia/hora. Se observó que las cantidades más altas de metabolito se generaron al inicio de la aclimatación. Cuando las bacterias se adaptan, la producción del metabolito tóxico disminuyó de 0.053 a 0.016 (para AC50) y de 0.110 a 0.018 (para AC100) unidades de absorbancia/hora. La aparición de metabolito también es un indicativo de problemas durante la operación de un reactor que degrada clorofenoles, debido a una desaclimatación de los microorganismos.

4.3.4 Índice volumétrico de lodos en la fase de aclimatación

Cuando la aclimatación es concluida el índice volumétrico de lodos (IVL) disminuye significativamente (Figura 4.7B). Es claro que las bacterias filamentosas que se encontraban en el inóculo usadas en el experimento AC100 fueron eliminadas por el compuesto tóxico. En general, los microorganismos que degradan el 4CF tienen excelentes propiedades de sedimentación. Incluso para un inóculo con baja sedimentabilidad (por ejemplo el empleado en AC100), el IVL disminuye de 500 a 240 mL/g después de 10 ciclos de operación, y a 70 después de 20 ciclos más (ver valores para 200 mg 4CF/L).

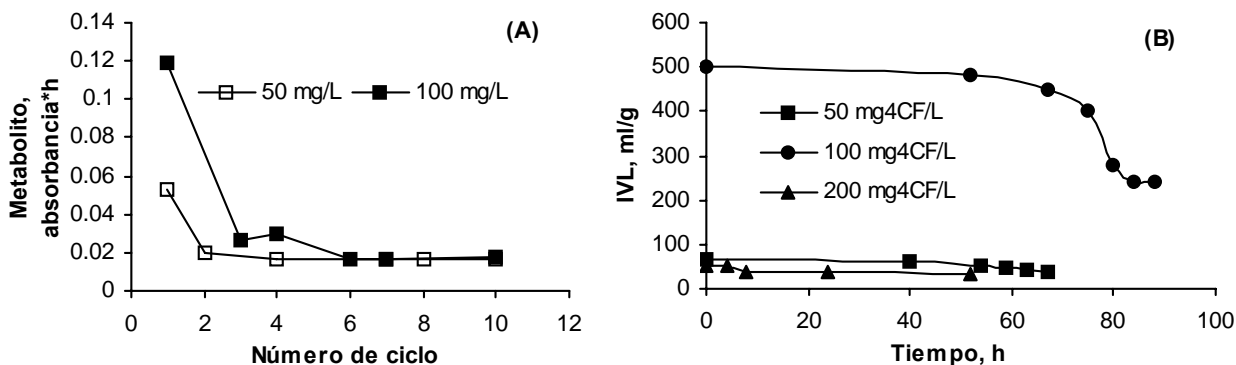


Figura 4.7 A) Producción de metabolito durante la aclimatación; B) Evolución del IVL durante la aclimatación al 4CF

4.3.5 Cambios en la comunidad durante la aclimatación

Se obtuvo la región hipervariable V3 del gen del ARNr 16S por medio de la amplificación por PCR usando el ADN total obtenido con un kit de extracción de ADN de suelos. Fragmentos de 200-pb derivados del producto de la amplificación por PCR fueron obtenidos según lo esperado. El número de las bandas individuales obtenidas en el DGGE se puede relacionar con el número de especies bacterianas en la muestra.

La Figura 4.8 muestra la huella genética de la comunidad obtenida por DGGE durante el proceso de la aclimatación. Este análisis reveló una diversidad bacteriana moderada en la comunidad, 11 bandas del DGGE fueron visibles, lo cual sugiere que un mínimo de 11 especies bacterianas estaban presentes. Seis de las bandas detectadas fueron cortadas del gel y secuenciadas. Se determinaron las secuencias con una mayor relación a los patrones de la base de datos *GenBank Nucleotide Database* (NCBI).

Es posible observar en la Figura 4.8 que las especies que correspondían a las bandas 1, 3, 4, 5 y 6 fueron mantenidas durante todo el período de la aclimatación. La tabla en la Figura 6 presenta los microorganismos asociados a cada banda del gel de DGGE. La banda 2 (*Pseudomonas* sp.) fue observada hasta el segundo día de la aclimatación, posteriormente esta banda prevaleció hasta el final de la aclimatación, indicando la reproducción de esta especie. En general el género *Pseudomonas* ha sido reportado por varios investigadores como microorganismos especializados en la degradación de

clorofenoles como única fuente de carbono y energía (Westerberg *et al.*, 2000), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el análisis de la comunidad estudiada.

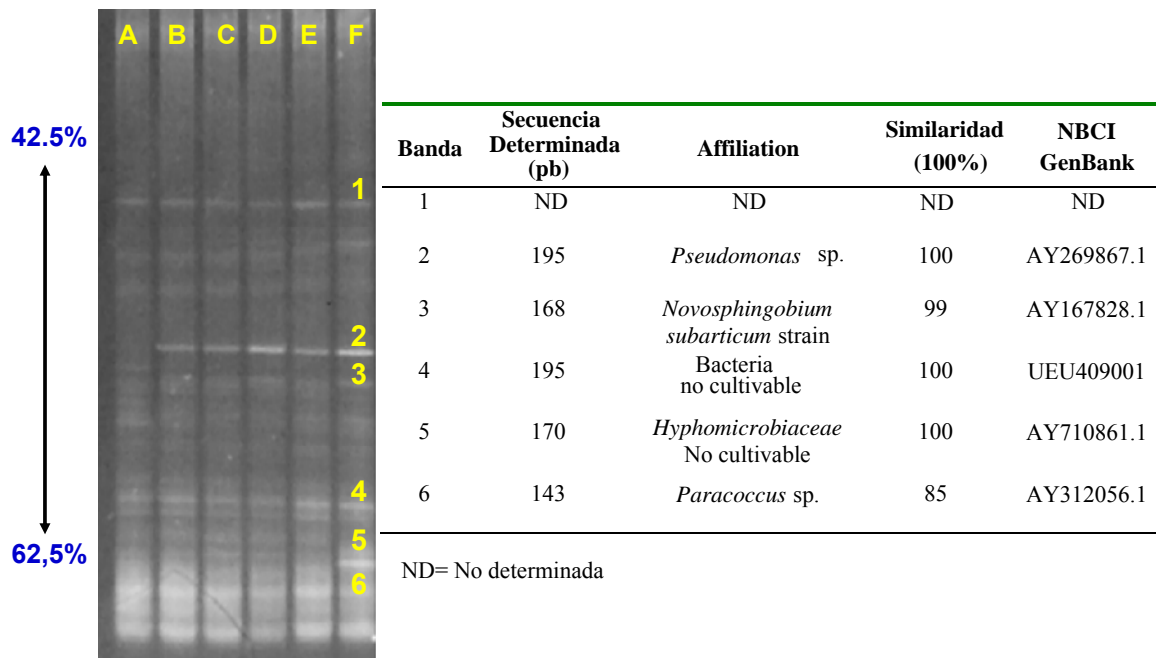


Figura 4.8 Análisis de la comunidad bacteriana durante la aclimatación al 4CF. La tabla muestra los microorganismos identificados de las bandas del gel de DGGE. A) Inóculo (0h), B) 24h, C) 48h, D) 72h, E) 96h, F) 120h

Debido a lo anterior, se puede discutir que los mecanismos de aclimatación que predominan son la selección y multiplicación microorganismos especializados en la degradación de 4-clorofenol. En este caso existió un aumento (multiplicación) de una población inicial pequeña de microorganismos del género *Pseudomonas* durante la aclimatación.

Lo anterior coincide con la literatura, donde se ha reportado que los microorganismos del género *Pseudomonas* presentan la capacidad de degradar el clorofenoles como única fuente de carbono (Radehaus y Schmidt, 1992). Al final de la aclimatación, la banda que representa a esta población es intensa comparada con las bandas de los ciclos anteriores (en el DGGE), lo cual puede indicar que debido a las características degradadoras del microorganismo se transformó en una especie dominante en la comunidad.

4.3.6 Desaclimatación inducida por ayuno

La desaclimatación de los microorganismos se puede deber a varios fenómenos, por ejemplo a variaciones puntuales en la concentración de sustancias tóxicas, cambio de los sustratos en el agua residual o por la exposición de la biomasa a periodos de ayuno. Para los fines prácticos de esta tesis, se empleará el término desaclimatación para referirse al ayuno. Las figuras 4.9 y 4.10 presentan las cinéticas de degradación obtenidas para algunos de los experimentos de ayuno. La Figura 4.9 presenta el caso donde la introducción de un periodo de ayuno es negativa para la biomasa. Se puede observar que después del ayuno el tiempo necesario para realizar la degradación del 4CF por los microorganismos es mayor. Por otro lado, la Figura 4.10 presenta las cinéticas de degradación donde se nota que el ayuno tuvo un efecto positivo en la actividad de los microorganismos. En este caso la degradación del 4CF después del ayuno se llevó a cabo en menor tiempo que el observado en la biomasa antes del ayuno.

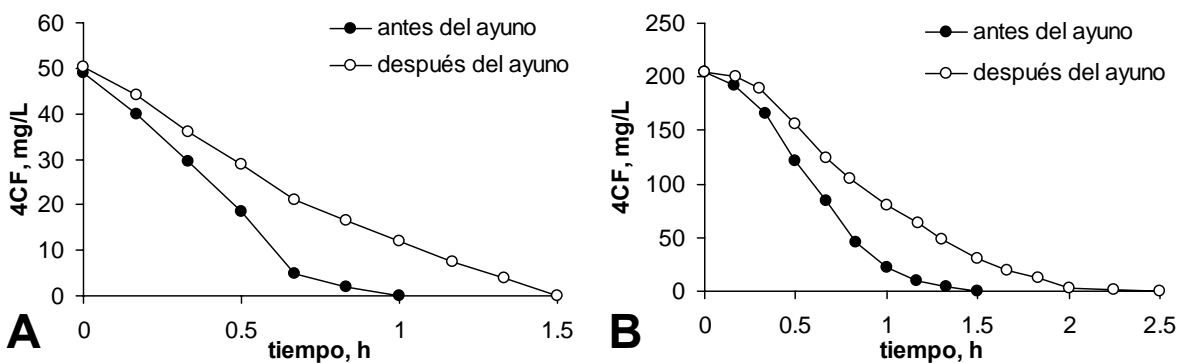


Figura 4.9 Influencia negativa del ayuno sobre el tiempo de degradación en A) DA50, 24 h de ayuno y B) DA200, 36 h ayuno

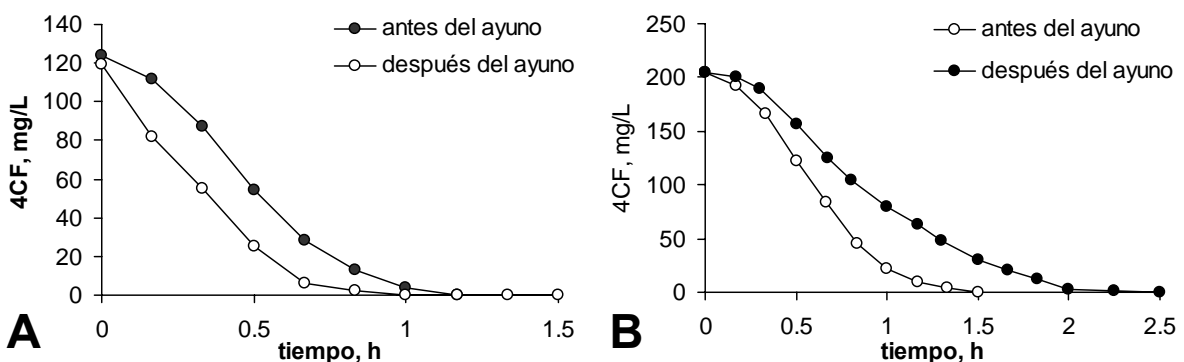


Figura 4.10 Influencia positiva del ayuno sobre el tiempo de degradación en A) DA100, 12 h de ayuno y B) DA200, 24 h ayuno

Las Figuras 4.11 y 4.12 presentan la influencia del ayuno en la q y la TECO. Es posible notar que los ayunos disminuyen gradualmente la actividad microbiana. En general un decremento de 21 a 44% se observó en la q debido a la introducción de periodos de ayuno, y de 26 a 35% de pérdida de actividad medida como TECO (Figura 4.12). Se encontró que la q está altamente correlacionada con la exponencial negativa del tiempo de ayuno, independientemente de la concentración inicial a la que estaba aclimatado el consorcio (Figura 4.11).

Es interesante notar que la estrategia de realización de los ayunos influye sobre los resultados obtenidos. Buitrón *et al.* (1994) realizaron ayunos en un mismo reactor empleando diversos y consecutivos periodos de ayuno de 24 h, observando que el tiempo de degradación se incrementó a más de 6 veces del valor inicial, generando una reducción del 80% en la q . En el presente estudio, la biomasa en el reactor fue aclimatada, y después se realizaron diversos experimentos de desaclimatación para cada concentración. Entre cada ayuno, se realizaron varios ciclos más, con los cuales se recuperó la actividad inicial de la biomasa (es decir, antes del ayuno). Posteriormente se aplicaba el siguiente ayuno. Este procedimiento de desaclimatación controlada aparentemente genera una biomasa más resistente a los periodos de ayuno debido a su historia.

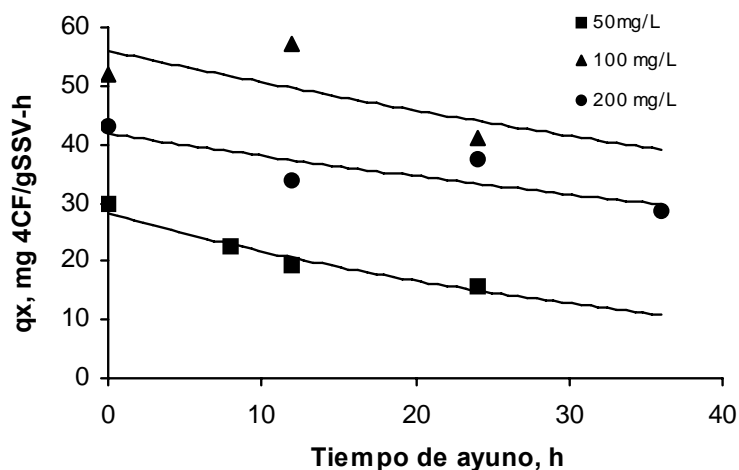


Figura 4.11 Influencia del tiempo de ayuno sobre la tasa específica de remoción. Los resultados son comparados con las condiciones iniciales antes de la perturbación

En la Figura 4.11 para el caso de DA100 (12 h) y DA200 (24 h) es posible observar que después de un ciclo de ayuno existe un incremento en el valor de q , indicando una reducción en el tiempo de degradación. En este caso se observa una influencia positiva debido a la aplicación de ayunos.

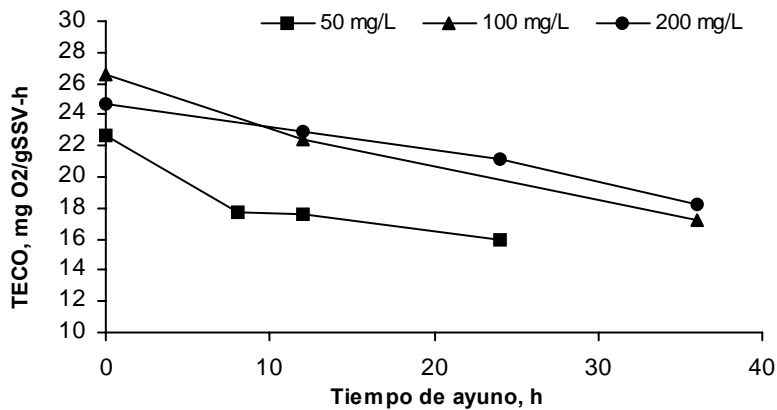


Figura 4.12 Influencia del tiempo de ayuno sobre la TECO. Los resultados después del ayuno son comparados con las condiciones iniciales antes del ayuno

Algunos estudios han examinado los efectos de un pre-ayuno en la supervivencia de las células inoculadas. Se ha reportado que el ayuno ayuda a incrementar la supervivencia de estas células (van Elsas *et al.*, 1994), mientras que otro estudio ha documentado que el pre-ayuno no ejerció ningún efecto significativo sobre la supervivencia (van Overbeek *et al.*, 1995). La inconsistencia pudo haber sido debido a las diversas condiciones del ayuno usadas en esos estudios. El punto a ser considerado es que durante el ayuno existe una disminución de la densidad de la población, de la tasa de respiración, de la actividad deshidrogenasa y de la actividad hacia el consumo de compuestos tóxicos, lo cual puede afectar el funcionamiento de una planta de tratamiento de aguas residuales. Watanabe *et al.* (2000) también demostraron un aumento en la hidrofobicidad de la superficie de la célula y la capacidad de la adherencia del flóculo debido al ayuno. Por lo tanto, es posible considerar que los microorganismos, conforme están sujetos a los ciclos de ayuno-recuperación del ayuno, cambiaron con el fin de protegerse y aumentar su sobrevivencia. Hay una reducción mínima en la actividad microbiana en este caso. Sin embargo, en la práctica, las plantas de tratamiento de aguas residuales industriales están sujetas a los cambios al azar de la concentración tóxica que aumentan el riesgo del desaclimatación de los microorganismos por una variación importante de la actividad de los microorganismos.

4.4. Conclusiones

Los resultados demostraron una reducción en el tiempo de la degradación debido al proceso de aclimatación. En el caso de 50 mg 4CF/L, el tiempo de la degradación fue reducido de 40 h a 50 minutos. Se observó que hay un incremento proporcional en el tiempo de aclimatación con la concentración inicial del tóxico cuando se aumento de 50 a 100 mg/L. Una vez que la biomasa fue aclimatada, se encontró un aumento en la afinidad del consorcio para biodegradar el 4CF, mientras que la capacidad de biodegradar acetato disminuyó. Existe una disminución en la producción del metabolito tóxico cuando las bacterias estuvieron adaptadas a la degradación de 4CF. La aclimatación al 4CF también aumenta la capacidad de sedimentación de la biomasa.

Los resultados del análisis de la comunidad por medio del DDGE mostraron que durante la aclimatación existió un aumento (multiplicación) de una población inicial pequeña de microorganismos del género *Pseudomonas* sp. En general la dinámica poblacional en el reactor es intensa. Es posible concluir que durante la aclimatación existió una selección y multiplicación microorganismos especializados en la degradación de 4-clorofenol.

El ayuno generó una disminución en la actividad microbiana. En general, un decremento de 21 a 44% fue observado en la q debido a la introducción de los períodos del ayuno, de 26 a 35% de pérdida de actividad medida como TECO. El grado del desaclimatación de los microorganismos en ayuno parece ser determinado por la historia de la biomasa. El efecto del ayuno sobre la tasa de degradación es menos significativo cuando los microorganismos son puestos en condiciones de ayuno, recuperados y después sujetos a ayuno otra vez, no así en el caso donde los ayunos son cíclicos y no hay un período de recuperación. En cualquier caso, existe una disminución de la actividad de los microorganismos generado por la variación del tóxico, por lo cual una desaclimatación de la biomasa aclimatada afectaría el funcionamiento de las plantas de tratamiento.

Aclimatación y ayunos en una cepa pura

5.1 Introducción

El capítulo anterior abordó la problemática relacionada con el ayuno de los microorganismos. Al respecto, Buitrón *et al.* (1994) discutieron que la pérdida de capacidad de degradación del 4CF de los lodos activados después del ayuno es atribuida a la disminución de la capacidad enzimática de los microorganismos. Cuando este tipo de comunidad microbiana es expuesta a condiciones de estrés existe una selección de poblaciones (por ejemplo el caso de la aclimatación) y la muerte de algunas especies involucradas en la dinámica poblacional de la comunidad degradadora.

Publicaciones en revistas internacionales derivadas de este capítulo:

Moreno-Andrade I., López-Vidal Y. y Buitrón G. (2006). Effect of the starvation in the activity and viability of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 acclimated to degrade 4-chlorophenol in a discontinuous reactor. *Water Science and Technology*. En prensa.

Con el fin de comprobar que existe una disminución de la actividad degradadora de los microorganismos, además de la selección o muerte de poblaciones, es necesario eliminar esta última posibilidad, es decir evitar la selección de especies. Para ello se empleó una cepa pura capaz de degradar el 4CF como única fuente de carbono y energía. Al emplear sólo una especie se puede determinar si existe pérdida de la actividad y/o de la viabilidad debida al ayuno

Se ha reportado que muchos microorganismos tienen la capacidad de degradar clorofenoles como única fuente de carbono. Entre estos se encuentran diferentes especies del género *Pseudomonas* (Westerberg *et al.*, 2000), *Comamonas* (Hollender *et al.*, 1994), *Streptomyces* (Yee y Wood, 1997), *Phanerochaete* (Pérez *et al.*, 1997) y especies especializadas como *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apajalahti *et al.*, 1986), *Herbaspirillum chlorophenolicum* (Wan-Taek *et al.*, 2004), *Arthrobacter chlorophenolicus* (Westerberg *et al.*, 2000). Sin embargo no existe información disponible con respecto a los cambios en la actividad y viabilidad de microorganismos especializados como *Pseudomonas* sp. en la degradación de clorofenol cuando están expuestos a ayunos.

El objetivo de este capítulo fue estimar los cambios en la actividad y viabilidad de una cepa pura, debido al ayuno durante la degradación de 4-clorofenol por medio del monitoreo de los parámetros cinéticos y citometría de flujo.

5.2 Metodología

Se empleó el reactor Applikon^{MR} para el cultivo de cepas puras descrito en el capítulo 3. El reactor fue inoculado con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, la cepa fue obtenida del cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Esta cepa fue aclimatada a la degradación de 25 mg4CF/L por medio de la estrategia de tiempos variables. Cada vez que el 4CF fue consumido, se agregó una nueva cantidad de 4CF (ciclos sin sedimentación).

Una vez que la biomasa fue aclimatada y los tiempos de degradación se redujeron a 4 h, la biomasa fue expuesta a ayuno prolongado. El reactor fue dejado en condiciones de

ayuno, solamente con suministro de aire (respiración endógena). Se evaluó el efecto de diferentes tiempos de ayuno (24, 48, 72, 96, 132 y 156 h) sobre la biomasa. En cada uno de los tiempos de ayuno que se evaluaron, 250 mL del volumen del reactor conteniendo los microorganismos expuestos al ayuno fue trasladado a pequeños reactores de 500 mL donde se expuso la biomasa a la degradación de 25 mg/L de 4CF. El traslado y realización del experimento se realizó en condiciones de esterilidad en igualdad de condiciones que el reactor que contenía la totalidad de la biomasa expuesta al ayuno. Con lo anterior fue posible comparar los cambios en la capacidad de degradación del 4CF.

Para cada tiempo de ayuno se evaluaron los cambios en la viabilidad y en la capacidad de degradación del 4CF por medio de la cuenta heterótrofa en placa y citometría de flujo. Para la citometría se emplearon cuatro muestras de 10 mL, a las cuales se agregaron diferentes colorantes: a la primera se agregaron 10 μ L de diacetato de 5-clorometil fluoresceína (CMFDA) y se incubó durante 30 min a 37°C. A la segunda muestra se le añadieron 50 μ L de ioduro de propidio (IP) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. A la tercera muestra se adicionaron 10 μ L CMTDA y se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente se agregaron 50 μ L de IP y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. La cuarta muestra funcionó como control, es decir no se añadió colorante.

Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (Beckman Coulter Epics Altra Flow Cytometry), empleando el discriminador en un valor de 30. La calibración del alineamiento, estandarización y calidad de control del sistema se realizó con 10 μ L de esferas de silicón fluorescentes (COULTER Flow-Check Fluorospheres, 5×10^5 y 5×10^6 partículas por μ L). Se alineó el láser y se ajustaron los fotomultiplicadores de tal manera que la fluorescencia de las esferas presentaran reflejos con el menor coeficiente de variación en cada uno de los filtros. Cuando se corrieron las muestras del reactor, se modificó el voltaje para ajustar la sensibilidad del análisis. Los resultados del citómetro se obtienen en forma de gráficas donde se observan los porcentajes de células que adquirieron coloración. Estas posteriormente pueden ser interpretadas como porcentajes de la población celular que se encuentran en distintos estados fisiológicos.

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Aclimatación

Se siguieron las cinéticas de los ciclos de aclimatación de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 al 4CF. Para una concentración de 25 mg/L la aclimatación se llevó a cabo en 15 ciclos de degradación. Durante la aclimatación, el 4CF fue degradado con eficiencias mayores al 99% como 4CF. El tiempo de los ciclos se fue reduciendo a medida que la aclimatación se fue dando, por lo cual el tiempo se redujo de 52 h a 4 h, después de 156h de operación del reactor (ciclos 1 al 15) (Figura 5.1). A partir del ciclo 15 la duración de los ciclos se estabilizó.

Si comparamos el tiempo de degradación del primer ciclo cuando los microorganismos no estaban aclimatados (52 horas) con el tiempo de degradación reportado en la literatura, encontramos que la degradación se llevó a cabo en un tiempo relativamente corto, ya que Howard *et al.* (1991) reportan que la degradación de clorofenoles en medios acuosos con biomasa no aclimatada puede llevarse a cabo en periodos que van de 66 a 200 h, incluso llegando a ser de 1680 h para el 2,4,6-triclorofenol y 4272 h para el pentaclorofenol.

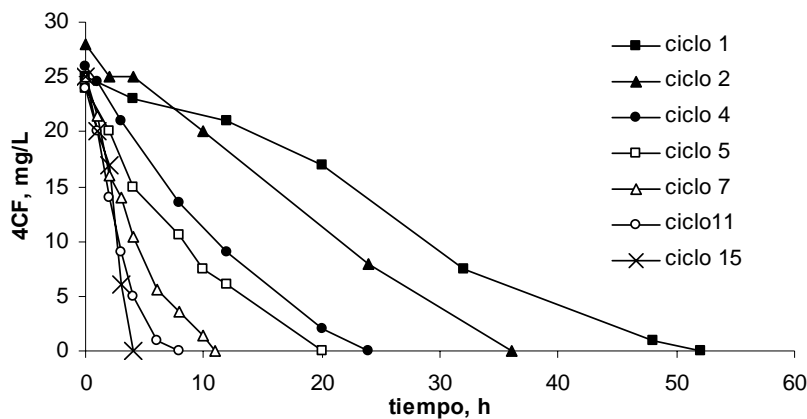


Figure 5.1 Aclimatación de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 a la degradación de 25mg/L de 4CF, concentración de la biomasa al final de la aclimatación 4×10^7 UFC/mL

5.3.2 Ayunos

Una vez que la biomasa fue aclimatada a la degradación de 25 mg4CF/L en 4 h, se introdujeron los ayunos. En la Figura 5.2 es posible observar el efecto del tiempo de

ayuno sobre la actividad degradadora de *Pseudomonas aeruginosa*. Los tiempos de degradación aumentaron como consecuencia de la disminución de la actividad de los microorganismos.

El tiempo necesario para la degradación total del 4CF aumentó de 4 h (biomasa sin ayuno) a más de 100 h, cuando la población fue expuesta a un periodo de ayuno mayor a 96 h. En el caso de un ayuno de 156 h, los microorganismos expuestos nuevamente a la cantidad inicial de 4CF sólo pudieron degradar el 10% de la concentración inicial del clorofenol, en este caso, *P. aeruginosa* fue inhibida por el 4CF. Este es un cambio dramático, ya que las *P. aeruginosa* aclimatadas presentan una tasa de degradación de 6.3 mg4CF/L/h, y por otra parte, después de 132 h de ayuno la tasa se redujo a 0.14 mg4CF/L/h y a 0.06 mg4CF/L/h en el caso de 156 h.

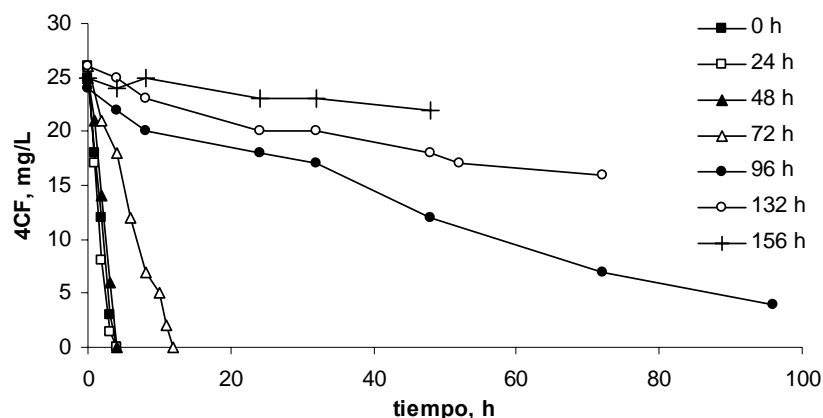


Figura 5.2 Incremento en el tiempo de degradación debido a diferentes periodos de ayuno

5.3.3 Cambios en la viabilidad debido al ayuno

El análisis de la cuenta heterótrofa en placa (CHP) demostró que existe pérdida en la viabilidad de las bacterias (Figura 5.3). Después de 42 h de ayuno, los microorganismos comienzan a perder su viabilidad. Existe un decremento en la cantidad de bacterias viables de 4.0×10^7 UFC/mL a 2.4×10^6 UFC/mL después de un ayuno de 96 h. Los resultados de la CHP coinciden con los resultados obtenidos con el análisis por citometría de flujo (Figura 5.5). En este caso, es posible observar que el porcentaje de células viables se reduce en 85% después de un ayuno de 96 h, y las células vivas no viables (problemas de membrana dañada o en el potencial de la membrana) aumentan

en un 35% después de 48 h de ayuno, lo cual indica que las células, aunque siguen vivas, han perdido la capacidad de reproducirse. Este tipo de microorganismos están en transición hacia la muerte o hacia la recuperación de la integridad de su membrana.

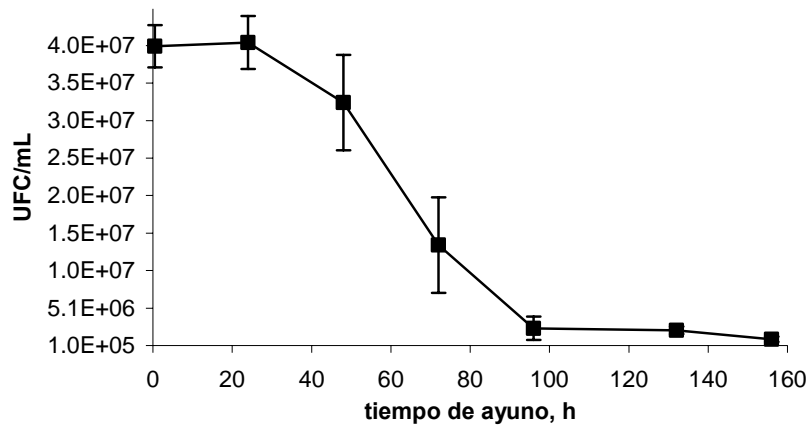


Figura 5.3 Disminución de las unidades formadoras de colonias (UFC) debido al ayuno

Para analizar la tasa de degradación volumétrica, q_v (mg4CF/L/h) como función de la disminución del número de células viable (UFC), debemos normalizar los datos para hacerlos equiparables. Esto se puede hacer comparando los porcentajes de disminución de los valores de q_v y las UFC en relación al valor donde no existe efecto del ayuno, esto es, el primer punto de los experimentos (Figura 5.4). Es posible observar que existe un comportamiento similar en los dos parámetros evaluados. Se evaluó la correlación aplicando la ecuación 4.2, encontrando una buena correlación entre sus valores ($r^2=0.987$). Esto indica que la q_v es dependiente de la viabilidad de los microorganismos. En este caso, la pérdida de la capacidad de los microorganismos a degradar el sustrato tóxico es proporcional a la pérdida de viabilidad debida al ayuno.

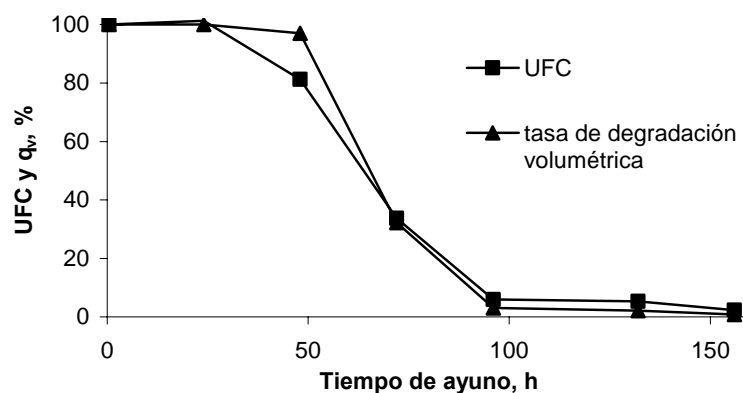


Figure 5.4 Disminución de la tasa de degradación volumétrica del sustrato y de la viabilidad (UFC) debido al ayuno

En la Figura 5.5 es posible observar los resultados obtenidos con la citometría de flujo. Existe un rápido incremento en el porcentaje de células muertas entre las 72 y 96 h de ayuno (16% de la población muere). Este fenómeno coincide con la disminución de las células viables en un 80%. Para este caso, periodos de ayuno superiores a 72 h producen severos cambios en la viabilidad de las células, ya que menos del 10% de la población se mantiene viable.

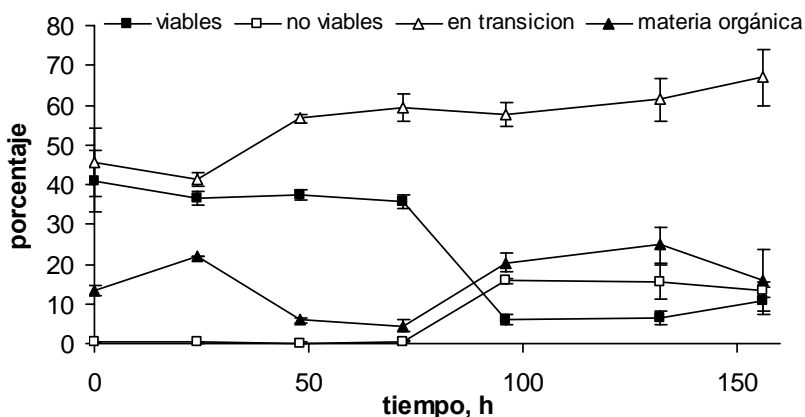


Figure 5.5 Cambios en la viabilidad determinada por citometría de flujo debido al ayuno

Si los resultados de la viabilidad son correlacionados con los tiempos de degradación, el tiempo necesario para la degradación total del 4CF se incrementa de 4 h (biomasa antes del ayuno) a más de 100 h cuando *Pseudomonas aeruginosa* fue expuesta a un periodo de ayuno de 96 h (Figura 5.2). Este incremento está correlacionado con la pérdida de la viabilidad de las células. Un punto de discusión interesante es que para el caso de más de 96 h de ayuno, aunque los porcentajes de las células viables y no viables se estabilizan, mientras que la actividad de los microorganismos para degradar el 4CF continúa disminuyendo. Por ejemplo, después de 96, 132 y 156 h la viabilidad de las células no presenta cambios significativos, pero la tasa de degradación disminuye más de 10 veces con respecto a la observada después de 72 h. La tasa específica de degradación mostró que existe un decremento de 16×10^{-8} a 6.51×10^{-8} mg4CF/UFC/h debido a la exposición de la biomasa aclimatada a un ayuno de 132 horas. Esto demuestra que existe disminución en la tasa de degradación relacionada con la pérdida de la actividad degradadora de la biomasa. Para el caso de 132 y 156 h de ayuno, la biomasa fue seriamente inhibida y se presentó un residual de 4CF de 78 y 84% respectivamente. Esto indica que no solamente existe un decremento de la viabilidad de

las células durante al ayuno, sino también existe disminución de la actividad para degradar 4CF.

5.4 Conclusiones

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, aclimatada a la degradación de 4CF, mostró un comportamiento similar a los lodos activados, es decir, el tiempo de degradación se redujo en varios ciclos de operación. No sólo existe pérdida de la viabilidad de los microorganismos expuestos a periodos de ayuno, sino también en la actividad para degradar el sustrato tóxico. Los resultados muestran que para el caso particular de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, periodos de ayunos mayores a 96 h producen cambios drásticos en la actividad de las células, ya que aunque existe una estabilización en la pérdida de viabilidad, la tasa de degradación disminuye más de 10 veces con respecto a la observada después de 72 h de ayuno.

Con los resultados obtenidos es posible concluir que en una planta de tratamiento, cuando los microorganismos están expuestos a periodos de ayunos, no sólo existe un cambio en la comunidad, es decir algunas especies mueren y otras toman un rol dominante, sino que también existen cambios a nivel celular como la pérdida de la actividad degradadora y la pérdida de viabilidad de las células, lo cual es reflejado en bajas eficiencias de degradación del sustrato.

Estrategia de control de tiempo óptimo

6.1 Introducción

El modo de operación en los reactores SBR se refiere a la manera en que la duración de sus fases se fija y tiene un impacto fundamental en las características del reactor. En el modo convencional de operación, la duración de cada una de estas fases es determinada típicamente por un experto, basado en su experiencia y pruebas exhaustivas en el laboratorio con una planta experimental.

Publicaciones en revistas internacionales derivadas de este capítulo:

Moreno-Andrade I., Buitrón G., Betancur M.J., Moreno J.A. (2006) Optimal degradation of inhibitory wastewaters in a fed-batch bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **81**, 713-720.

Moreno-Andrade I., Betancur M.J., Moreno J. A., Buitrón G. (2006). Long term stability of an automated SBR degrading a phenolic compound. *2nd International Water Conference*. 12-14/06/2006. Porto, Portugal.

Betancur M.J., Moreno J.A., Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2006). Practical optimal control of fed-batch bioreactors for the wastewater treatment. *International Journal of Robust Nonlinear Control*. **16**,173–190.

Betancur M.J., Moreno J.A., Buitrón G., Moreno-Andrade I. (2006). Event-driven time-optimal control for a class of discontinuous bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **94** (4),803-14.

Generalmente, la fase de la reacción se fija de forma que sea suficientemente larga para permitir que las sustancias tóxicas sean degradadas. Las fases de sedimentación y vaciado son fijadas por las características del lodo activado y la geometría del reactor.

Esta estrategia operacional, aplicada usualmente en los SBR, se puede nombrar como Estrategia de Tiempos Fijos o FTC (del inglés *Fixed Time Control*). A pesar de las ventajas inherentes de los procesos discontinuos en lo referente a la biodegradación de las sustancias tóxicas (Chiavola *et al.*, 2004), los SBR que funcionan bajo estrategia FTC presentan varias dificultades cuando se aplican en la degradación de aguas residuales tóxicas: inhibición de los microorganismos, problemas debidos a picos de concentración de compuestos tóxicos, desaclimatación, y problemas de ayuno de los microorganismos. Estos fenómenos causan bajas eficiencias con respecto a la eliminación de los compuestos tóxicos y falta de robustez en el funcionamiento de las plantas que operan bajo estas condiciones (Buitrón *et al.*, 2003, 2004).

Para superar estos problemas se han propuesto varios modos de operación alternativos, por medio del uso de la medición de la concentración del oxígeno disuelto (OD) o el bióxido de carbono (Scheppard y Copper, 1990; Buitrón *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 2000). Moreno y Buitrón (1998) presentaron una metodología que, basada en un modelo matemático simplificado del proceso, garantiza que la biodegradación de aguas residuales en un reactor discontinuo se lleva a cabo en el mínimo posible de tiempo. La ley de control de tiempo óptimo, descrita por Moreno (1999), controla el caudal de entrada en el llenado, de manera que el tiempo de reacción total sea tan corto como sea posible. Esto requiere que la concentración del sustrato dentro del SBR sea mantenida en el valor donde los microorganismos alcanzan máxima velocidad de degradación durante toda la fase de llenado. La implementación de esta ley de control óptimo requiere medir la concentración del sustrato en línea, y el conocimiento de varios parámetros de la planta, pero esto es difícil en la práctica.

Para resolver el problema, Vargas *et al.* (2000) propusieron estimar la concentración del sustrato por medio de la medición de la concentración del oxígeno disuelto en línea usando un observador (filtro de Kalman extendido). Vargas *et al.* (2000) presentaron la calibración del observador y la validación experimental de la estrategia de control; a esta

estrategia se le llamó Control de Tiempo Óptimo Basado en Observadores u OB-TOC (del inglés *Observer Based Time Optimal Control*). Las desventajas de esta estrategia son la necesidad de saber exactamente la concentración del sustrato en el influente y del valor de las constantes cinéticas de un modelo que describe la degradación de compuestos tóxicos y que se estudiará más adelante (Buitrón *et al.*, 2005). Esto hace a la estrategia OB-TOC difícil de aplicarse en la práctica. Además, como ya se ha discutido en los dos capítulos precedentes, pueden existir variaciones en la actividad de los microorganismos debidas a la aclimatación o desaclimatación, lo que complica aún más el uso de los modelos generalmente empleados para describir la biodegradación de los compuestos tóxicos.

Para evitar las limitaciones de la estrategia OB-TOC, Betancur *et al.* (2004a) propusieron una nueva estrategia llamada Control de Tiempo Óptimo Dirigido por Eventos o ED-TOC (del inglés *Event Driven- Time Optimal Control*). La estrategia de ED-TOC solamente requiere la medida de la concentración de oxígeno disuelto en línea y el volumen del reactor, para controlar el caudal del influente de modo que la tasa de degradación del sustrato se mantenga alrededor de su valor máximo durante la toda la fase de llenado y reacción. La estrategia ED-TOC no requiere un observador, ni un modelo matemático exacto del reactor, ni el conocimiento de todos los parámetros cinéticos para poder operar, lo que la hace fácilmente aplicable en una planta de tratamiento. Por otra parte, la estrategia ED-TOC es estable y robusta contra perturbaciones en la concentración de compuestos tóxicos en el influente así como de errores o incertidumbres de los parámetros cinéticos y en el modelo. Estas características fueron probadas matemáticamente en la tesis de doctorado de Manuel Betancur (2006) y reportadas en la literatura (Betancur *et al.* 2004a, 2004b).

En la literatura se han descrito otras estrategias de control de la fase de llenado para mejorar la operación de los reactores SBR empleados en la remoción de nitrógeno en aguas residuales y para el caso de la maximización de la productividad en el campo de la biotecnología. Coelho *et al.* (2000) estudiaron la optimización de la productividad en un proceso biológico de remoción de nitrógeno en un SBR. Sus resultados demostraron que el uso de una estrategia discreta de llenado, la cual consiste en llenar con pulsos simétricos de aguas residuales puede reducir hasta en un 36% el tiempo total del ciclo,

para un nivel dado de remoción de nitrógeno. En el campo de la biotecnología, un método de optimización para la fermentación repetida en un reactor fed-batch para mejorar la producción de albúmina del suero recombinante humano empleando la levadura *Pichia pastoris* fue presentado por Ohya *et al.* (2005). En este estudio se presenta un modelo y las simulaciones en computadora de un reactor fed-batch empleando una estrategia de alimentación óptima de metanol calculada por un método de programación dinámica empleando cinco periodos de alimentación de metanol. Las simulaciones de este método predicen un 47% de aumento en la producción cuando la fermentación se encuentra en un estado estabilizado. Debido a que en el tratamiento de aguas residuales industriales no existen muchas estrategias de control óptimo, es necesario el desarrollo de alternativas para satisfacer las necesidades del tratamiento de aguas residuales tóxicas.

El objetivo de este capítulo es demostrar la aplicación práctica de una nueva estrategia de control (ED-TOC) y su efecto sobre la actividad de los microorganismos que llevan a cabo la biodegradación de aguas residuales inhibitorias.

6.2 Metodología

La estrategia ED-TOC es una implementación práctica de la ley de control óptimo descrita por Moreno (1999). Para describirla se debe considerar la siguiente descripción matemática de las fases de llenado y reacción del SBR (Grady *et al.*, 1999):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - bX - X \frac{Q_{in}}{V} \quad (6.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \mu X + (S_{in} - S) \frac{Q_{in}}{V} \quad (6.2)$$

$$\frac{dO}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/O}} \mu X - (1 - f_D) bX + k_L a (O_s - O) + (O_{in} - O) \frac{Q_{in}}{V} \quad (6.3)$$

$$\frac{dV}{dt} = Q_{in} \quad (6.4)$$

En estas ecuaciones diferenciales, μ es la tasa específica de crecimiento (h^{-1}), X es la concentración de biomasa en el reactor (mg/L), b es la tasa de decaimiento de la biomasa (h^{-1}), Q_{in} es el flujo del influente (L/h), V es el volumen del reactor (L), $Y_{X/S}$ es el coeficiente de rendimiento biomasa/sustrato (adimensional), S_{in} es la concentración de sustrato en el influente (mg/L), S es la concentración de sustrato dentro del reactor (mg/L), $Y_{X/O}$ es el coeficiente de rendimiento biomasa /oxígeno [$Y_{X/O} = Y_{X/S}/(1-Y_{X/S})$], adimensional, f_D es la fracción de biomasa que contribuye al decaimiento (adimensional), k_{La} es el coeficiente de transferencia de masa (del oxígeno, h^{-1}), O_s es la concentración de saturación del oxígeno disuelto (mg/L), O es la concentración del oxígeno disuelto en el reactor (mg/L) y O_{in} es la concentración de oxígeno disuelto en el influente (mg/L).

Todas las concentraciones están en unidades de DQO, es decir mgO_2/L , y las concentraciones de oxígeno dadas como O_2 . En el caso de sustratos tóxicos, se sabe que el comportamiento de la tasa de crecimiento de la biomasa (μ), en función de la concentración del sustrato tóxico (S), se puede describir por la ley de Haldane (ecuación 6.5):

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + S^2/K_i} \quad (6.5)$$

donde μ es la tasa específica de crecimiento (h^{-1}), μ_{max} es la tasa específica de crecimiento máxima (h^{-1}), S es la concentración de sustrato dentro del reactor (mg/L), K_s es el coeficiente de saturación media (mg/L) y K_i es el coeficiente de inhibición (mg/L).

La Figura 6.1 representa la forma de la ley de Haldane.

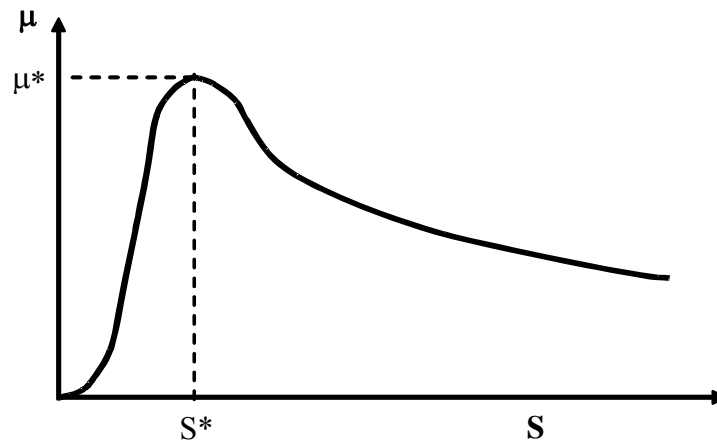


Figura 6.1 Ley de Haldane. μ es la tasa específica de crecimiento y S es la concentración de sustrato dentro del reactor

En este modelo μ alcanza un valor máximo, μ^* , cuando el valor de la concentración del sustrato es S^* , esto es dado por las expresiones 6.6 y 6.7:

$$\mu^* = \frac{\mu_{\max}}{1 + 2\sqrt{\frac{K_s}{K_i}}} \quad (6.6)$$

$$S^* = \sqrt{K_i K_s} \quad (6.7)$$

donde μ^* es la tasa específica de crecimiento máxima en la ley de Haldane (h^{-1}), μ_{\max} es la tasa específica de crecimiento máxima (h^{-1}), S^* es la concentración de sustrato donde μ tiene su valor máximo (mg/L), K_s es el coeficiente de saturación media (mg/L) y K_i es el coeficiente de inhibición (mg/L).

Concentraciones tóxicas arriba o abajo de S^* reducen la tasa de crecimiento y, por lo tanto, la tasa de reacción. La ley de control de tiempo óptimo reduce a un mínimo la fase de reacción, y consiste en controlar el flujo de entrada del influente (Q_{in}) para llevar S a S^* y posteriormente mantener S en el valor S^* (equivalente a mantener μ en el valor μ^*) durante toda la fase de llenado. Sin embargo, como ya se ha comentado, la implementación práctica es muy complicada debido a los requerimientos de la medición

de todas las variables del estado del modelo y del conocimiento de los parámetros, además de que no existe una forma sencilla y económica para medir la concentración de sustrato en línea. Para eliminar estas dificultades, Betancur *et al.* (2004b) proponen la estimación de una variable relacionada con la tasa de degradación del sustrato, la tasa de consumo másico de oxígeno (γ), la cual es posible estimar en línea empleando la medición del oxígeno disuelto en el seno del reactor y el volumen del reactor por medio de la ecuación 6.10, la cual se puede deducir del balance de masa descrito en la ecuación 6.3. Esta deducción se explica a continuación. De la ecuación 6.3 se obtiene:

$$\frac{1}{Y_{X/O}} \mu X + (1 - f_d) b X = k_L a (O_s - O) + (O_{in} - O) \frac{Q_{in}}{V} - \frac{dO}{dt} \quad (6.8)$$

Multiplicando por V ,

$$\left(\frac{1}{Y_{X/O}} \mu + (1 - f_d) b \right) XV = k_L a (O_s - O) V + (O_{in} - O) Q_{in} - \frac{dO}{dt} V \quad (6.9)$$

al lado izquierdo de la ecuación anterior se le llama tasa consumo másico de oxígeno (OMUR por sus siglas en inglés, *Oxygen Mass Uptake Rate*) o γ . Por lo anterior:

$$\gamma = \left(\frac{1}{Y_{X/O}} \mu + (1 - f_d) b \right) XV \quad (6.10)$$

En estas ecuaciones, γ es la tasa de consumo másico de oxígeno (mgO₂/h), $Y_{X/O}$ es el coeficiente de rendimiento Biomasa /oxígeno [$Y_{X/O} = Y_{X/S}/(1 - Y_{X/S})$], μ es la tasa específica de crecimiento (h⁻¹), f_d es la fracción de biomasa que contribuye al decaimiento (adimensional), b es la tasa de decaimiento de la biomasa (h⁻¹), X es la concentración de biomasa en el reactor (mg/L) y V es el volumen del reactor (L).

Es posible observar en la ecuación 6.10 que γ es la tasa volumétrica de consumo de oxígeno (mgO₂/L/h) multiplicada por el volumen de líquido en el reactor (V). En la ecuación (6.9) el término XV corresponde a la biomasa total, la cual en un ciclo de reacción cambia muy lentamente en comparación con los cambios de S y de O . Para la

presente descripción este término será considerado como constante. Estos resultados son validos ya que XV no cambia muy rápido (Betancur *et al.* 2004b, 2006). La Figura 6.2 presenta el comportamiento de γ en función de la concentración del sustrato. Es claro en la ecuación 6.10 que γ es una función semejante a μ , por lo cual ambas variables alcanzan sus valores máximo γ^* y μ^* simultáneamente cuando $S=S^*$. De manera que si se mantiene γ en su máximo valor (γ^*) durante toda la fase de llenado y reacción, se obtendrá la máxima velocidad de degradación, evitando la inhibición y minimizando el tiempo de reacción.

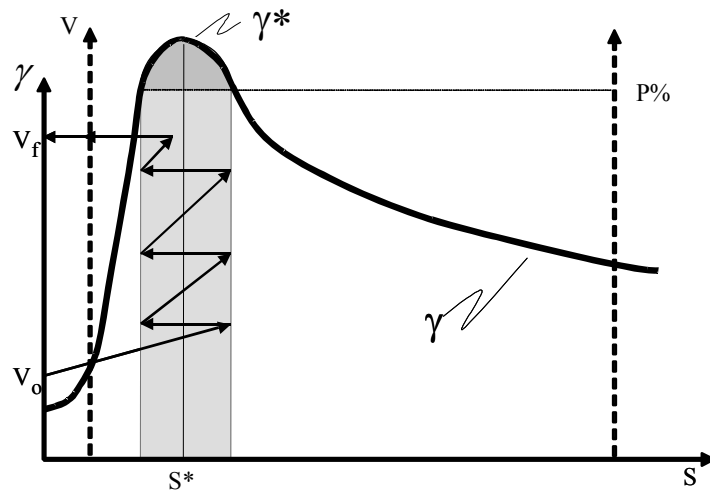


Figura 6.2 Evolución del sustrato y del volumen de la estrategia de ED-TOC. El V_o indica el volumen inicial en el tanque. El flujo se alimenta al reactor de tal manera que se mantenga la tasa de degradación alrededor del valor óptimo (zona gris). Una vez que se alcance el volumen final, V_f , el reactor continúa su funcionamiento como un batch clásico con lo cual la tasa de degradación disminuye

De las ecuaciones 6.9, se puede ver que la tasa de consumo másico de oxígeno se puede expresar también como la ecuación 6.11.

$$\gamma = k_L a(O_s - O)V + (O_{in} - O)Q_{in} - V \frac{dO}{dt} \quad (6.11)$$

donde γ es la tasa de consumo másico de oxígeno (mg/h), $k_L a$ es el coeficiente de transferencia de masa (del oxígeno, h^{-1}), O_s es la concentración de saturación del oxígeno disuelto (mg/L), O es la concentración del oxígeno disuelto en el reactor (mg/L), V es el volumen del reactor (L) y O_{in} es la concentración de oxígeno disuelto en el influente (mg/L).

Esto demuestra que la tasa de consumo másico de oxígeno se puede estimar en tiempo real midiendo en línea la concentración de oxígeno disuelto en el tanque de reacción, puesto que todas las variables en el lado derecho de la ecuación (6.11) son medibles o fácilmente computables, exceptuando quizá a la derivada de dO/dt , para la cual se necesita un algoritmo de cómputo adecuado. Los únicos parámetros necesarios son el coeficiente de transferencia de masa del oxígeno (k_{La}), la concentración de saturación del oxígeno disuelto (O_s), y la concentración del oxígeno disuelto en el influente (O_{in}). Un importante punto a considerar es que, en general, debido a la presencia de bacterias en las aguas residuales crudas, el valor de O_{in} en la mayoría de los casos es cero, por lo cual puede ser omitido.

La estrategia ED-TOC se aproxima al tiempo óptimo encendiendo o apagando la bomba de llenado como se ilustra en la Figura 6.2 (zona gris 2). Esto se hace en la forma siguiente: supongamos que S está debajo de S^* y por lo tanto, γ está debajo de γ^* . La bomba de llenado se enciende con lo que S y γ aumentan. Cuando S alcanza y excede el valor S^* , γ logrará su máximo γ^* y comenzará a disminuir. Una vez que γ llega a una fracción P% del máximo (porcentaje que le permite el control a γ de desviarse de γ^* , ver Figura 6.2), la bomba se apaga y S comenzará a disminuir debido al consumo del sustrato por los microorganismos. γ se incrementa nuevamente y vuelve a pasar por el valor de γ^* y vuelve a disminuir hasta el P% (lo cual indica que la γ^* ha sido pasada), con lo cual la bomba es encendida nuevamente. Como consecuencia de este control, la concentración de sustrato oscilará dentro de un rango cercano a γ^* o a la máxima velocidad de degradación, determinada por el valor asignado de P%, durante el llenado del SBR.

El tratamiento del agua residual se realiza con éxito, sin importar el conocimiento o la variación de todas las variables y parámetros no incluidos en la ecuación (6.11), P esto no es necesario conocer la concentración de sustrato en el influente, debido a que solo es necesaria una estimación correcta de γ , para que la estrategia controle correctamente el proceso. Por esta razón la estrategia ED-TOC es robusta con respecto a variaciones o a incertidumbres en casi todos los parámetros, y también contra perturbaciones o picos de concentración en el influente. A pesar de ser una estrategia robusta, ofrece todas las ventajas de un control de tiempo óptimo, es decir, reduce al mínimo el tiempo de

reacción y evita la inhibición. Otra ventaja de la estrategia es evitar los periodos de ayuno, ya que una vez que la etapa de reacción ha concluido, automáticamente se inicia la sedimentación. La estrategia ED-TOC es una excelente opción para ser empleada en un ambiente industrial.

El reactor piloto operó normalmente bajo una concentración estándar en el influente (S_{in}) de 350 mg_{4CF}/L. Esto quiere decir que, tomando en cuenta el volumen intercambiado, dentro del reactor la concentración inicial fue de 200 mg_{4CF}/L. Esta concentración de 4CF fue elegida debido a que, como se observó en el capítulo 3, esta concentración puede ser degradada por los microorganismos sin problemas de inhibición. El reactor se mantuvo operando con la estrategia ED-TOC por 3 meses en la condición estándar.

Después de este periodo se evaluó la robustez de la estrategia ED-TOC a variaciones puntuales en la concentración en el influente (S_{in}), entre 175 y 613 mg_{4CF}/L (que representa variaciones de -50, +25, +50 y +75% con respecto a la condición estándar de 350 mg/L). Adicionalmente, se evaluó la variación en el flujo de aire de 0.75 y 2.25 litros por minuto (lo que representa $\pm 50\%$ de la condición estándar de 1.5 lpm.). La duración de las fases del SBR fue la siguiente: tiempo de preaeración (15 minutos), llenado y reacción (variable, dependiendo de la concentración del influente), sedimentación (30 minutos) y vaciado (6 minutos). La biomasa fue aclimatada usando la estrategia de aclimatación de ciclos variables, la cual fue explicada en el capítulo 3. Los métodos analíticos empleados para seguir los parámetros fisicoquímicos y biológicos son los descritos en el capítulo 3. Así mismo se realizó un análisis de la comunidad durante la operación del reactor a largo plazo, es decir, en varios meses de operación continua.

6.3 Resultados y Discusión

6.3.1 Estrategia ED-TOC en condiciones estándar

La aclimatación de la biomasa se realizó de acuerdo con la metodología descrita en 3.1.2. La Figura 6.3 presenta el comportamiento de la concentración de sustrato, medido como 4CF y el COD durante un ciclo de funcionamiento de la estrategia ED-TOC con la condición estándar ($S_{in}=350$ mg_{4CF}/L).

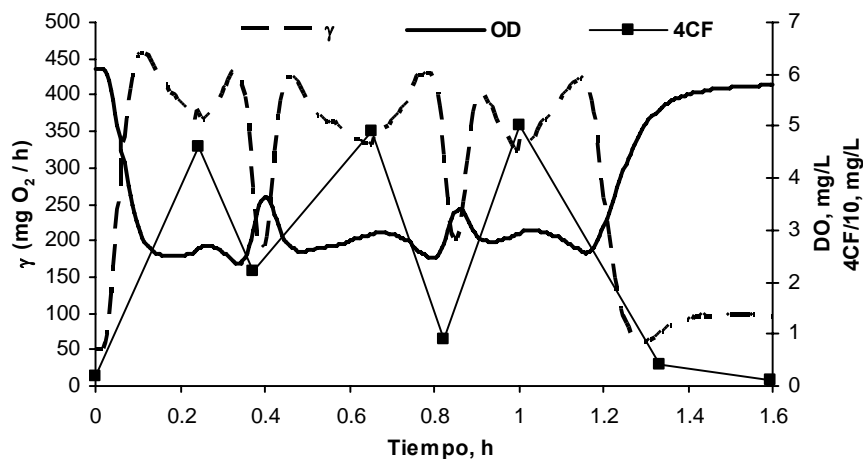


Figura 6.3 Evolución de la concentración de sustrato, medida como 4CF y COD durante un ciclo bajo estrategia ED-TOC.

Es posible distinguir el funcionamiento del control si se sigue el comportamiento del OD, del 4CF y de γ en la cinética de degradación. La Figura 6.4 presenta cada una de las cinéticas del OD, 4CF y γ por separado durante un ciclo de degradación de 350 mg4CF/L con la estrategia ED-TOC. Una vez que el influente comienza a ser alimentado al reactor, la reacción comienza. El OD disminuye (primeras 0.2 h, flecha 1, Figura 6.4) debido a que el oxígeno es requerido por los microorganismos, con lo cual aumenta la actividad metabólica para degradar el 4CP. Simultáneamente, el estimador calcula γ y monitorea su valor. Cuando el control detecta que el punto máximo de γ ha pasado (poco después de un mínimo en la concentración de OD), la bomba de alimentación se apaga (flecha 2, Figura 6.4). Los microorganismos degradan el sustrato y el valor de γ vuelve a pasar por su valor máximo (γ^*) y disminuye debido a que la concentración de sustrato es más baja que S^* (la concentración de 4CF ha pasado de 48 a 22 mg4CF/L, observable a las 0.4 h, flecha 3, Figura 6.4). El control detecta este cambio, con lo cual se enciende la bomba de alimentación nuevamente, y una nueva carga de sustrato se alimenta al reactor. Este procedimiento se repite hasta que se ha alcanzado el volumen máximo del reactor y entonces la degradación continúa como en una reacción en lote ordinario, terminando la reacción cuando el OD esté cerca de la saturación, en un valor constante (a partir de las 1.6 h, flecha 4, Figura 6.4).

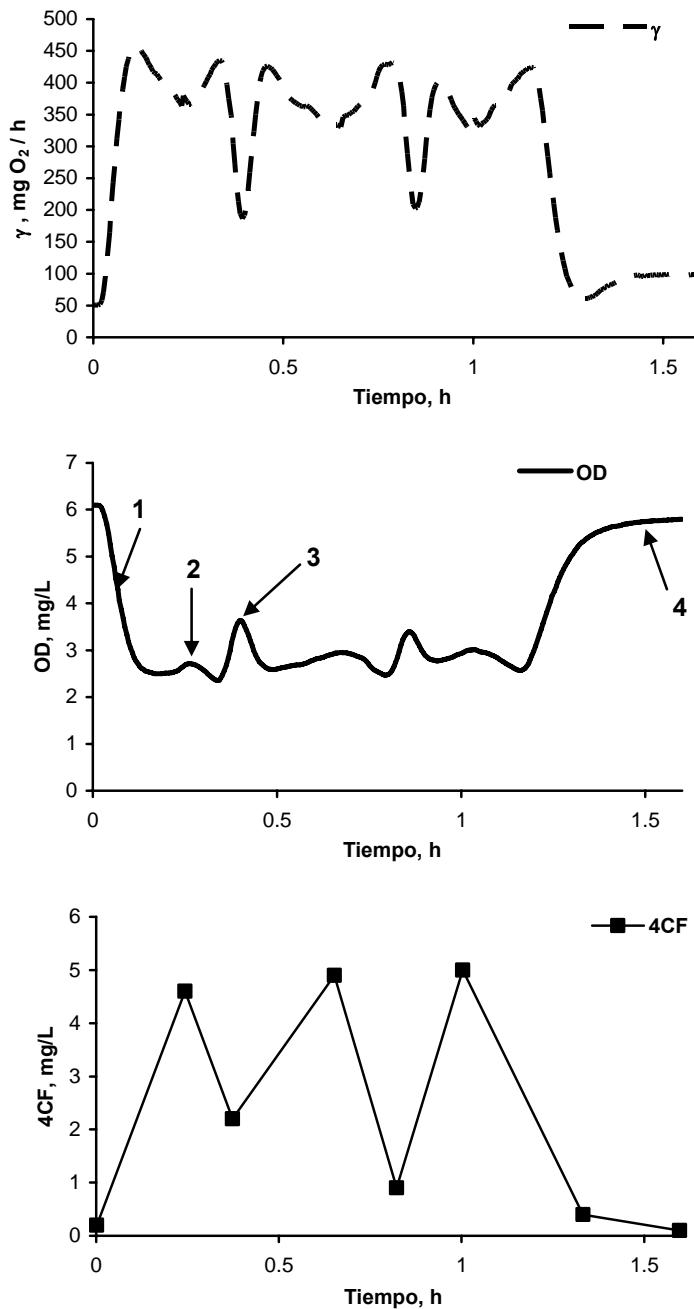


Figura 6.4 Funcionamiento de la estrategia ED-TOC. Es posible observar los cambios en el valor de γ , los cuales concuerdan con los cambios en las concentraciones de OD y 4CF. El OD cambia de manera inversa a γ , debido a que el OD es empleado para la estimación de γ .

En la Figura 6.4 se puede observar cómo la concentración de 4CF en el seno del reactor se mantiene alrededor 30 mg4CF/L, que teóricamente, corresponde a una concentración cercana a S^* , y por lo tanto cercana a γ^* .

En el caso del 4-clorofenol puede existir la producción de metabolito, la cual aumenta mientras que ocurre la reacción, pero una vez que el ciclo ha terminado, la producción del metabolito disminuye, indicando una buena operación del sistema.

Es importante mencionar que, aunque la estrategia ED-TOC mantiene la máxima tasa de degradación, el coeficiente de producción de biomasa (la Y_{obs}) durante la operación con la estrategia ED-TOC fue 0.23 ± 0.07 mgSSV/mgDQO-4CF, la cual es pequeña en comparación con las reportadas en la literatura. Por ejemplo, el valor típico de la Y_{obs} en lodos activados es de 0.40 mgSSV/mgDQO, aunque es común encontrar valores más altos (Metcalf y Eddy, 2003). Para nuestro caso la degradación del sustrato se realiza con un crecimiento mínimo de biomasa. Esto es típico de sistemas en donde la concentración de la biomasa es elevada en relación con la concentración de sustrato (Alexander, 1999). Una manera de explicar este comportamiento es tomando en cuenta la relación sustrato/microorganismo (S_0/X_0).

En la relación S_0/X_0 , el parámetro S_0 representa la fuente de carbono y energía usada para la biosíntesis y X_0 representa los microorganismos que consumen esa fuente de carbono y energía. La relación inicial sustrato/microorganismos (S_0/X_0) es uno de los factores más importantes que afectan los experimentos de biodegradación, pues se ha observado que las cinéticas tomadas dependen de esta relación (Chudoba *et al.*, 1991, 1992). Este parámetro determina si existen o no las condiciones para que tenga lugar la multiplicación de las células durante la remoción exógena del sustrato (Speece *et al.*, 1973; Chudoba *et al.*, 1991, 1992).

En el caso de los experimentos realizados en este capítulo, la relación S_0/X_0 fue baja (0.175), por lo cual el metabolismo se dirige hacia el catabolismo, es decir, en el empleo de la energía obtenida del sustrato para realizar las funciones de mantenimiento y supervivencia de la célula (Chudoba *et al.*, 1992). Por lo anterior, la producción de microorganismos fue menor comparada al proceso de lodos activados convencional. Esto demuestra que con este tipo de proceso, además de degradar satisfactoriamente el compuesto tóxico, no se genera una gran cantidad de lodos de desecho.

6.3.2 Estabilidad y reproducibilidad del uso de la estrategia ED-TOC a largo plazo

El SBR fue operado con la estrategia ED-TOC durante más de 450 ciclos de operación (100 días) en la degradación de 4CF, en las condiciones estándar, de manera estable y reproducible. Las Figuras 6.5 a 6.7 reflejan los datos operacionales del reactor, los cuales corresponden a los parámetros fisicoquímicos del reactor.

Los resultados se pueden tratar como dos bloques de experimentos. En el primer bloque (Figura 6.5) se realizó la aclimatación de la biomasa, durante 41 ciclos; a partir de entonces la estrategia ED-TOC realizó el control de la degradación del 4CF durante 147 ciclos. Durante la operación del reactor con ED-TOC, las eficiencias de degradación de 4CF fueron en toda la experimentación de más del 99% y la DQO removida varió entre el 97 y el 98%.

Adicionalmente, se realizó un experimento para evaluar la capacidad de la estrategia de control para soportar cambios bruscos en el pH del medio, lo cual deriva en una pérdida de actividad de la biomasa. Para lo anterior el pH fue ajustado a 3.5 (± 0.5) del ciclo 101 al 110 (Figura 6.5). El tiempo de ciclo aumentó de 3 a 5 h debido al cambio en el pH, además la q cambió de 53 a 35 mg_{4CF}/mg_{SSV}/h. Sin embargo, esta reducción de 35% en la q del 4CF y 40% en la q de la DQO no afectó las eficiencias del reactor ya que aunque la actividad de los microorganismos se redujo, el tiempo de ciclo aumentó de manera que, aunque la biomasa del reactor se encontraba en estrés, las eficiencias de remoción de 4CF y DQO se mantuvieron superiores al 98%. En el ciclo 111 el pH fue neutralizado a 7.0 con una solución de bicarbonato de sodio. Posteriormente el reactor continuó operando bajo las condiciones estándar. Una vez neutralizado el pH, el reactor recobró en seis ciclos la actividad y el comportamiento observado antes de la condición de estrés, es decir, una q de 51 mg_{4CF}/mg_{SSV}/h y tiempo de ciclo de 3 h. Al final del ciclo 194 la biomasa fue retirada del reactor y se inició el segundo bloque de experimentos, con el cual se verificó que el control se comportara de manera similar en la degradación de 4CF con una biomasa diferente.

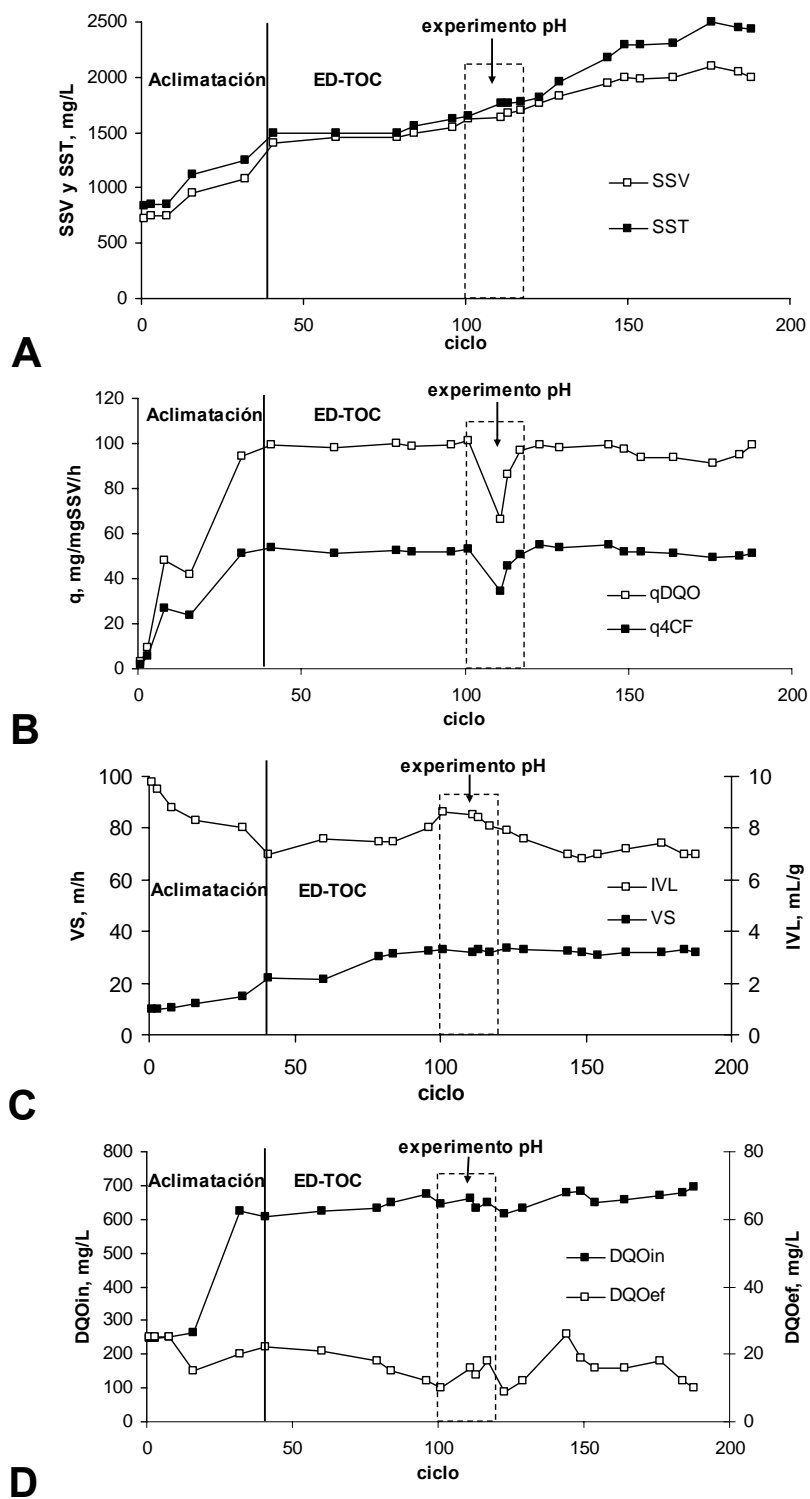


Figura 6.5 Datos operacionales del primer bloque de experimentos del uso de ED-TOC a largo plazo. A) SST y SSV dentro del reactor. B) Evolución de la q del 4CF y DQO. C) IVL y VS de la biomasa. D) DQO en el influente (DQO_{in}) y en el efluente (DQO_{ef})

La aclimatación del segundo bloque (Figura 6.6) se llevó a cabo en 24 ciclos, posteriormente se empleó la estrategia de tiempo óptimo durante 230 ciclos. El reactor presentó un comportamiento similar al observado en el bloque número 1, ya que en promedio la q del 4CF fue de 50.8 ± 4.7 mg4CF/mgSSV/h y la DQO fue 95.3 ± 8.1 mgDQO/mgSSV/h, con eficiencias de remoción similares, es decir, más del 99% para el 4CF y del 97% para la DQO (Figura 6.6).

Para conocer el comportamiento del reactor ante un aumento gradual de la biomasa, del ciclo 168 al 210 la biomasa no fue purgada lo cual hizo que la biomasa aumentara en un 135% (de 2000 a 4700 mg/L). En este punto, la estrategia probó ser robusta ya que la degradación obtenida fue mayor al 99.5% como 4CF. El ciclo de degradación tomó más tiempo (75% más que el tiempo usual), debido a que los microorganismos estuvieron expuestos a una condición de estrés, provocada por una deficiencia de oxígeno, lo que redundó en una degradación no óptima. La estrategia ED-TOC trabajó de forma que las eficiencias de remoción se mantuvieran aunque la deficiencia de oxígeno continuara. Si esta condición de deficiencia de oxígeno disuelto permanece por más tiempo en el reactor, se pueden presentar problemas en la estrategia de control, dado que este se basa en la medición en línea del oxígeno disuelto dentro del reactor.

En general, durante los dos bloques de experimentos la operación del reactor con ED-TOC mostró resultados satisfactorios observando eficiencias muy altas (>97%). La ED-TOC mostró ser robusta ante cambios bruscos como en el pH o la concentración de biomasa en el tanque. Durante la operación del reactor con ED-TOC las eficiencias de degradación de 4CF fueron de más del 99% y la DQO removida de más del 97%. El índice volumétrico de lodos fue 80 ± 6.8 mL/gSSV y los SST en el efluente fueron 17 ± 8 mg/L.

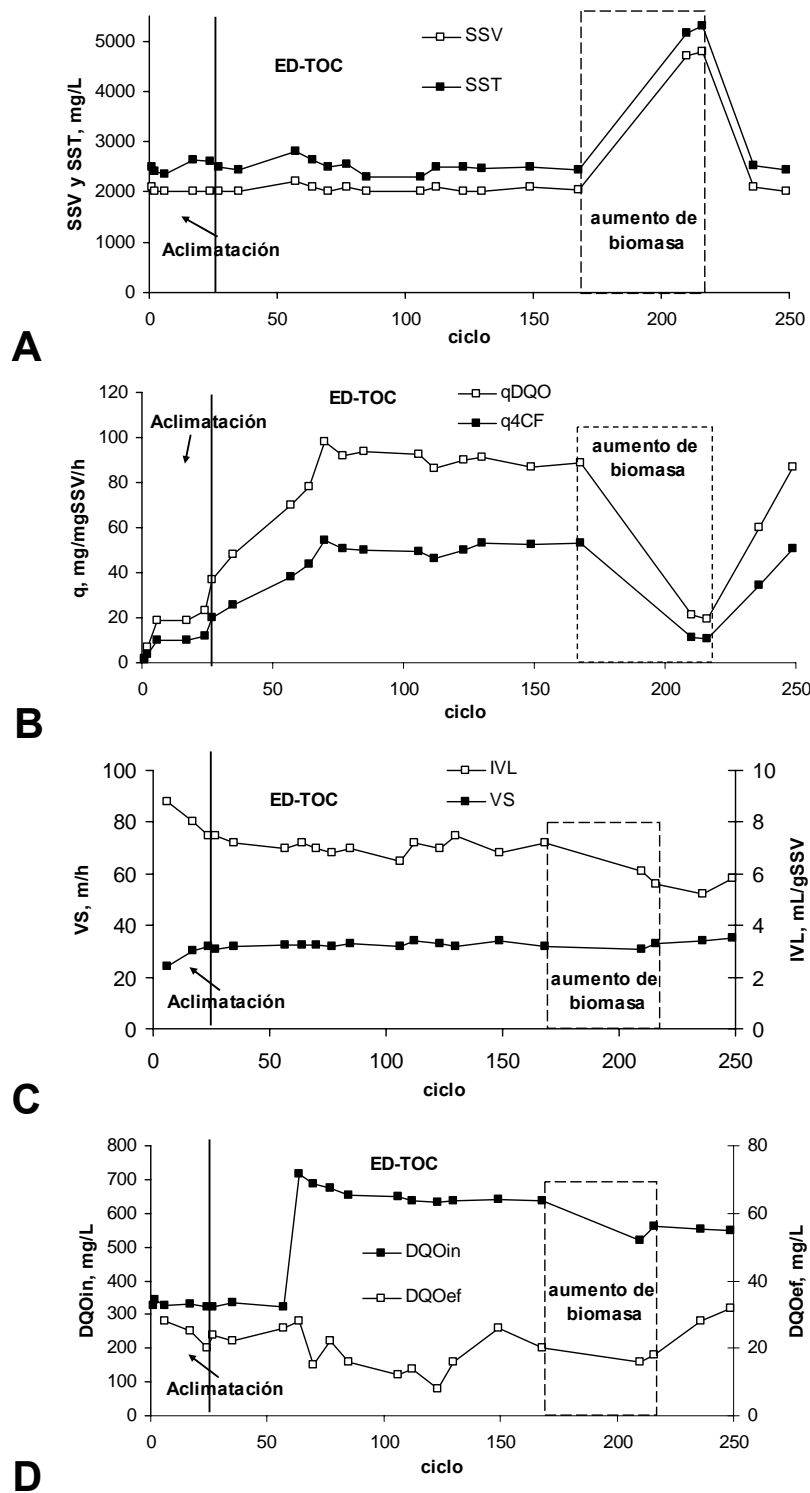


Figura 6.6 Datos operacionales del segundo bloque de experimentos del uso de ED-TOC a largo plazo. A) SST y SSV dentro del reactor. B) Evolución de la q del 4CF y DQO. C) IVL y VS de la biomasa. D) DQO en el influente (DQO_{in}) y en el efluente (DQO_{ef})

Los resultados de los parámetros del efluente fueron analizados estadísticamente verificando la normalidad de la distribución mediante una gráfica de probabilidad normal (STATGRAFICS 5.0). Este análisis es descriptivo para una sola variable estudiar. El análisis mostró que la calidad del efluente derivado del proceso es excelente, ya que en un 95% de las muestras los SST en el efluente fueron menores a 26 mg/L y la DQO residual fue menor a 29 mg/L (Figura 6.7). Esto demuestra la factibilidad de emplear la estrategia ED-TOC en la degradación eficiente de aguas residuales que contienen compuestos inhibitorios y puede ser implementada en una industria.

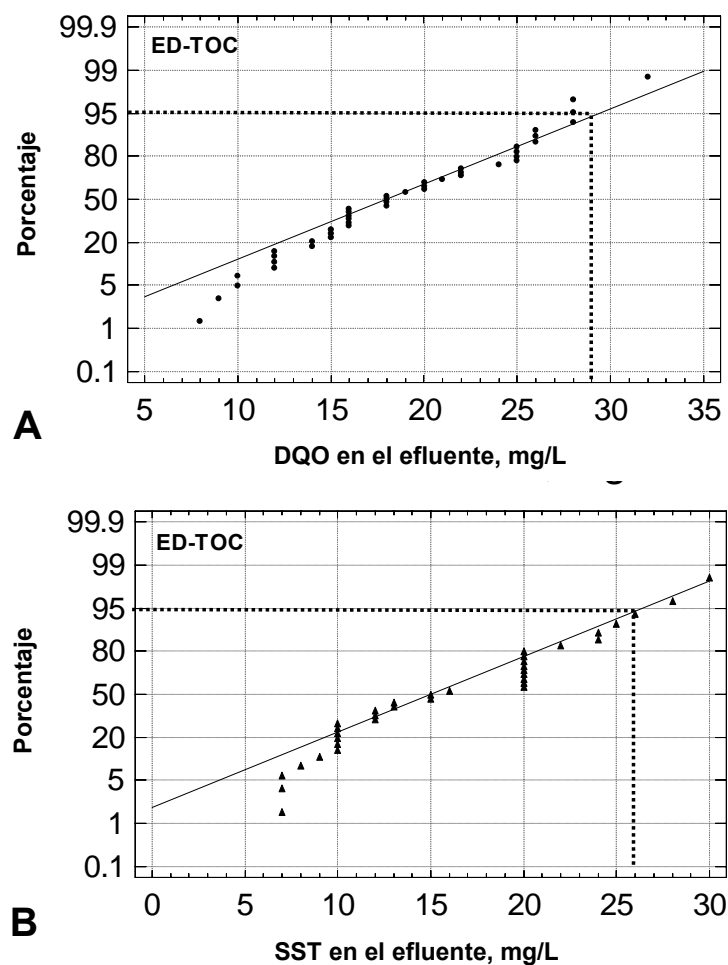


Figura 6.7 Análisis de la distribución normal de la calidad del efluente: A) DQO B) SST

6.3.3 Evolución de la comunidad durante la operación con ED-TOC

Los fragmentos de ADN 16S obtenidos después de la amplificación del ADN total del inóculo y del reactor a diferentes tiempos (ciclos 1, 41, 101, 144 y 188) del primer bloque

de experimentos, para la evaluación de la estrategia ED-TOC a largo plazo, fueron analizados por DGGE. La Figura 6.8 muestra la huella genética del consorcio. Los resultados revelan una gran diversidad de microorganismos, ya que más de 20 bandas son visibles, 13 de las cuales son más intensas y están marcadas en la Figura 6.8. Los patrones encontrados muestran que las bandas del inóculo (A) son distintas a las encontradas en todas las demás muestras. Esto concuerda con lo encontrado en el gel de DGGE de la aclimatación (Figura 4.7, capítulo 4). En este análisis no fue posible secuenciar las bandas encontradas. Sin embargo, es evidente que las bandas encontradas entre los tiempos B y C son similares, sin embargo, son muy diferentes a las del reactor a los tiempos D y E. Por otra parte, los patrones al inicio de la aclimatación muestran bandas que desaparecen en los ciclos 41 y 101, mientras otras se vuelven más intensas en el ciclo 188 (bandas 12 y 13). Otro cambio interesante se aprecia en las bandas 6 y 9, las cuales se presentan en muy baja concentración al inicio de la operación con ED-TOC (ciclo 41, carril B), pero la intensidad se incrementa después de 60 ciclos de operación (carriles C, D y E).

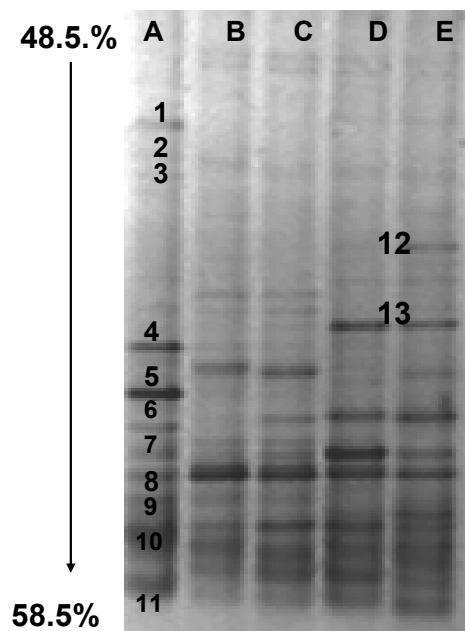


Figura 6.8 Análisis de DGGE de la evaluación de la estrategia ED-TOC en 188 ciclos de operación. A) ciclo 1, inóculo (0 h), B) ciclo 41, inicio de operación de ED-TOC (biomasa aclimatada al 4CF), C) ciclo 101, D) ciclo 144, E) ciclo 188

Un punto interesante a considerar es que existe una fuerte dinámica poblacional provocada por una comunidad inestable, a pesar de que los parámetros macroscópicos

evaluados en la operación del reactor permanecen constantes. Este resultado concuerda con los obtenidos por Délbes *et al.* (2000) y Etchebere *et al.* (2001), en donde el análisis de la comunidad de un reactor anaerobio y un anóxico, operados por más de dos años, por métodos moleculares de huella genética, demostraron que no existe una estabilidad en los reactores empleados para el tratamiento de aguas residuales, aunque las eficiencias y demás parámetros cinéticos demuestran estabilidad del proceso.

6.3.4 Toxicidad del agua tratada usando la estrategia ED-TOC

De manera general se puede considerar que la toxicidad del 4-clorofenol es alta. Por ejemplo, en la literatura se han reportado valores de EC_{50} de 6.24 ppm en algas *Hormosira* (Gunthorpe *et al.*, 1995). Se midió la toxicidad de muestras puntuales con una prueba de toxicidad en el sistema Microtox (AZUR Environmental). La toxicidad de 100 mg/L de 4CF fue evaluada, encontrando que esta solución presenta una concentración de inhibición del 50% de los organismos de $EC_{50} = 0.85$ mg/L con un nivel de confianza de 95%. Lo cual indica que el 4CF es un compuesto muy tóxico para la bacteria fluorescente *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 empleada en la técnica estandarizada de Microtox. En contraste, no se detectó toxicidad en una muestra del agua obtenida en el efluente del reactor operado con ED-TOC para la degradación de 350 mg/L de 4CF ($EC_{50} = N.D.$). La muestra del efluente mostró un incremento en la luminiscencia de las bacterias empleadas en la técnica de Microtox después de 5 minutos de incubación. Este fenómeno se debe a la existencia de nutrientes disponibles para las bacterias en el agua del efluente (Lappalainen *et al.*, 2001).

6.3.5. Granulación de la biomasa y observaciones microscópicas

Durante la operación del reactor discontinuo se observó la formación de gránulos aerobios (Figura 6.9). Este fenómeno ha sido reportado por varios autores al emplear reactores discontinuos en la degradación de varios tipos de aguas residuales (Beun *et al.*, 1999, 2002; Mc Swain *et al.*, 2004a; de Kreuk y van Loosdrecht, 2004). En nuestro caso, las observaciones microscópicas y los parámetros del reactor (velocidad de sedimentación fue de 3.8 m/h, IVL de 80 mL/gSSV y SST en el efluente de 17 mg/L cuando el reactor se encontró aclimatado) mostraron la formación de gránulos aerobios dentro del reactor (Figura 6.9).

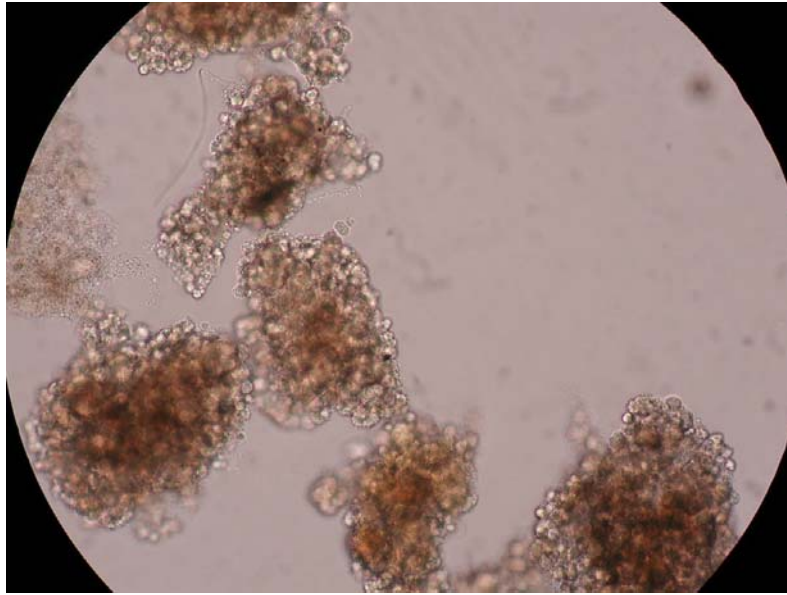


Figura 6.9 Fotografía de gránulos aerobios observados en el microscopio (10x) durante la degradación de 4CF

Las causas y mecanismos de la granulación aerobia no han sido bien estudiados hasta la fecha. Sin embargo, varios factores han sido descritos en la literatura como son el tiempo de llenado, la concentración de oxígeno disuelto y la configuración del reactor. Una forma de obtener una granulación estable es el uso de alimentación por pulsos (por ejemplo de 3 minutos), lo cual convierte al reactor SBR en un reactor de tipo fed-batch (reactor discontinuo con un periodo de alimentación largo) y altas concentraciones de oxígeno disuelto (de Kreuk y de Bruin, 2004). Adicionalmente, se ha reportado la granulación espontánea debido a la aplicación de tiempos muy rápidos de llenado (McSwain *et al.*, 2004a).

Para formar los gránulos esféricos y compactos, la conversión del sustrato biodegradable en sustancias de almacenado intracelular debe ocurrir rápidamente en el reactor. Esto se ha descrito en la exposición de la biomasa a régimen de alimentación-ayuno, lo cual se puede aplicar fácilmente en los SBR con períodos cortos de alimentación (McSwain *et al.*, 2004b; de Kreuk y van Loosdrecht, 2004). Además, se han utilizado tiempos de sedimentación cortos, con lo cual existe una selección de los flóculos y gránulos que tienen una alta sedimentabilidad, forzando la eliminación de flóculos menos densos y de microorganismos suspendidos (Beun *et al.*, 1999; 2002).

6.3.5 Funcionamiento de la estrategia ED-TOC frente a variaciones en la concentración en el influente

Con el fin de evaluar la robustez de la estrategia de control al existir una variación puntual de la concentración del sustrato en el influente, se varió la concentración de 4CF en el agua residual con cuatro concentraciones diferentes a la condición estándar, 175, 438, 525 y 613 mg4CF/L (Figura 6.10). Los resultados indican que no existió influencia en el funcionamiento del reactor cuando una concentración en el influente de hasta 625 mg/L de 4CF fue introducida en el reactor, ya que para todos los casos la eficiencia de remoción del tóxico fue superior al 97% como DQO y de 99% como 4CF. Es posible observar que un aumento de la concentración de 4CF en el influente genera un aumento proporcional del tiempo de degradación. Lo anterior demuestra que la estrategia ED-TOC mantiene la tasa de degradación constante, a diferencia de la estrategia usual, donde la tasa de degradación aumenta o disminuye a través del tiempo de reacción debido a la inhibición de los microorganismos provocada por el sustrato tóxico.

En general, gracias al control óptimo, la concentración máxima de 4CF en el reactor fue alrededor 50 mg/L, independientemente de la concentración presente en la alimentación. Debido a lo anterior, los microorganismos realmente nunca fueron expuestos a un pico de concentración, puesto que el sustrato dentro del reactor oscila alrededor del valor S^* .

Se ha reportado que el 4CF puede ser mineralizado por bacterias aerobias (Puhakka y Melin, 1996) dentro de una amplia gama de concentraciones, extendiéndose a partir de 10 mg/L en los procesos continuo de lodos activados (Ellis *et al.*, 1996), 350 mg/L usando una cepa pura de *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 (Elväng *et al.*, 2001) y 350 mg/L en un reactor discontinuo sin problemas de inhibición (Moreno-Andrade y Buitrón, 2004). Sin embargo la estrategia ED-TOC demostró que es posible degradar más de 600 mg/L de 4CF sin problemas de inhibición.

Por lo anterior, en el capítulo 7 de esta tesis se abordará la efectividad de la estrategia para degradar concentraciones de compuestos fenólicos mayores a las obtenidas en esta serie de experimentos.

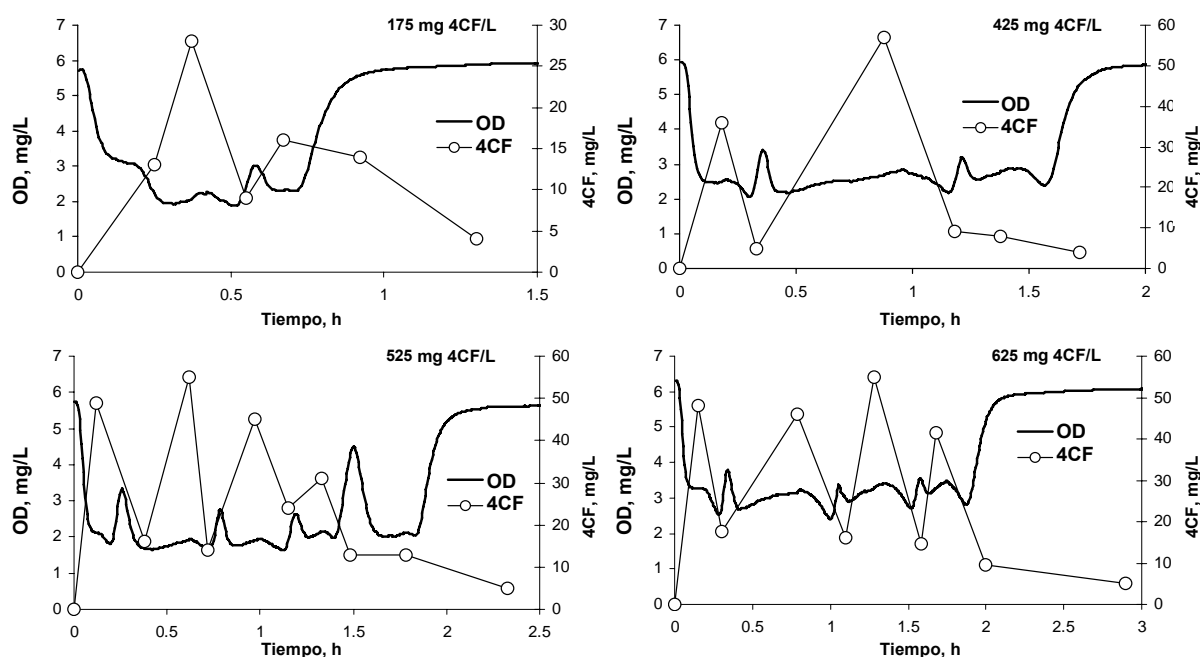


Figura 6.10 Cinéticas de degradación para diferentes concentraciones iniciales de 4CF (175, 438, 525 y 613 mg4CF/L) y OD, usando la estrategia ED-TOC

6.3.6 Variación del flujo de oxígeno

Ya que la estrategia de tiempo óptimo depende del OD para controlar el flujo de alimentación de sustrato, es importante estudiar cuánto podría afectar la variación de este parámetro en el funcionamiento del reactor. Se realizaron dos experimentos variando el flujo del aire con respecto al valor estándar de 1.5 litros por minuto. En todos los casos el valor del k_{La} fue determinado para los distintos valores de flujo de aire (k_{La} de 11.5, 13.0 y 18.5 h^{-1} para los flujos de aire de 0.75, 1.5 y 2.25 L/min respectivamente). La Figura 6.11 presenta la evolución del oxígeno disuelto durante la variación de ± 50 del flujo de aire con referencia a la condición estándar. Para todos los casos la concentración inicial de 4CF fue 350 mg/L. Cuando se evaluó el comportamiento de la estrategia al reducir el flujo de aire a 0.75 (-50% de la condición usual), el OD en el reactor siempre fue superior a 2 mg/L, con lo cual se puede considerar que no hubo limitaciones para este elemento en el reactor y que la estrategia puede operar bien aún si existen variaciones en las condiciones a las que se llevaron a cabo los experimentos.

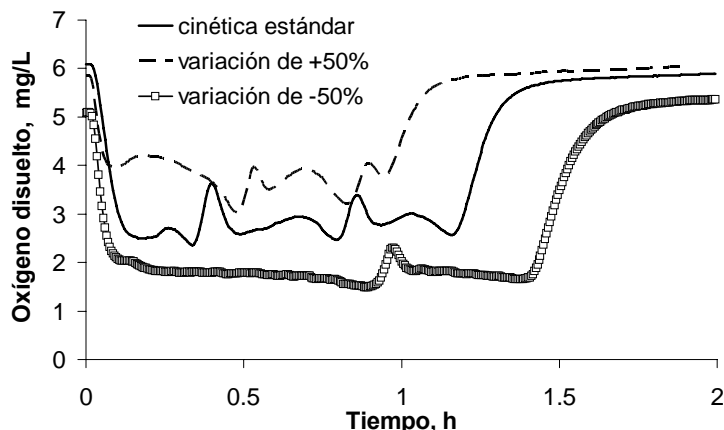


Figura 6.11 Concentración de oxígeno disuelto debido a distintos flujos de aire

La Figura 6.12 muestra la influencia de la variación del flujo del aire en la degradación del sustrato (A) y en la producción del metabolito 5-cloro-2hidroxi-ácido mucónico semialdehido (B). En general, no hubo una influencia significativa en la operación de la estrategia ED-TOC cuando la tasa de flujo de aire varió en un $\pm 50\%$. Pero, es muy interesante observar que en el caso donde el flujo de aire fue reducido 50% hubo un aumento de la concentración de metabolito producido (Figura 6.12 B). Así mismo, el tiempo de degradación para esta misma condición aumentó (Figura 6.12 A). Además de la influencia en la producción del metabolito, este subproducto tóxico no fue removido en el ciclo de degradación, lo cual puede causar problemas debido a su acumulación en los ciclos siguientes.

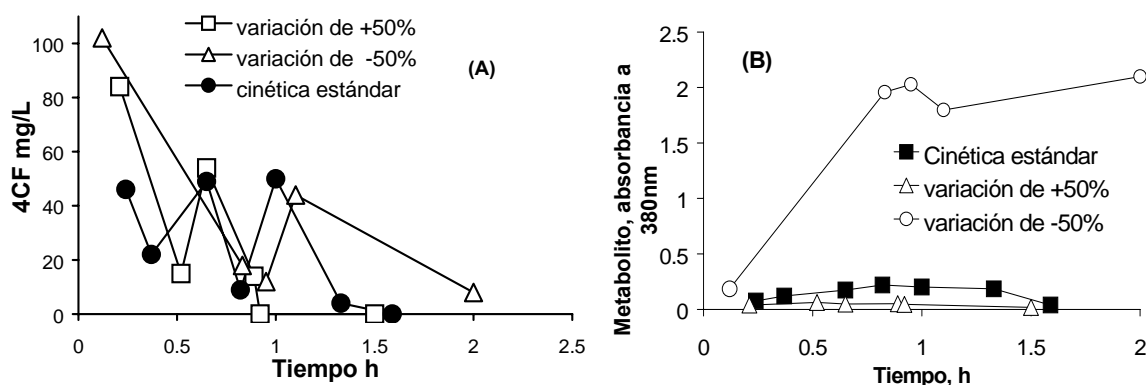


Figura 6.12 A) Degradación del 4CF en diferentes concentraciones iniciales de 4CF. B) la producción de metabolito para diferentes flujos de aire

6.4 Conclusiones

Se demostró la implementación práctica de una nueva estrategia del control para optimizar la tasa de degradación en reactores discontinuos de compuestos tóxicos como el 4-clorofenol que es representativo de los efluentes industriales. La estrategia de control de tiempo óptimo dirigido por eventos (ED-TOC) fue aplicada para biodegradar un agua residual conteniendo compuestos fenólicos como compuestos inhibitorios modelo. El control del reactor se realizó utilizando solo la medición del OD, con la cual se calcula la tasa de consumo másico de oxígeno, que está relacionada con la tasa de degradación del sustrato y la cual fue estimada en línea y mantenida cerca de su valor máximo durante la degradación.

El reactor presentó un buen funcionamiento ya que la mineralización del 4CF fue terminada de manera eficiente. Las eficiencias medias de remoción fueron del 99% como demanda química de oxígeno, y cerca del 100% como 4CF. Los sólidos suspendidos totales en el efluente se mantuvieron debajo de 14 mg/L, el índice volumétrico de lodos alrededor de 38 mL/g, y la velocidad de sedimentación fue de 6 m/h. Esto último indica que el lodo tuvo una excelente sedimentabilidad. El reactor mostró ser robusto y estable en la degradación de 4CF en la operación a largo plazo del reactor con respecto a la variación del pH y cantidad de biomasa en el sistema.

Al operar el reactor con la estrategia ED-TOC se observó un excelente funcionamiento comparado con la estrategia usual de operación de los sistemas SBR. No sólo concentraciones más altas de tóxico se pueden tratar con la estrategia de ED-TOC, sino que también se obtuvo una reducción en el tiempo de degradación. En general, no hubo una influencia significativa en la operación de la estrategia ED-TOC cuando el flujo de aire se varió en $\pm 50\%$ con respecto a la condición estándar. La estrategia ED-TOC mostró que es posible la implementación práctica con resultados eficientes en la degradación de compuestos inhibitorios como el 4CF. La estrategia es robusta, estable en operación a largo plazo, incluso ante variaciones en la concentración de sustrato en el influente o en el flujo de aire, siempre y cuando durante el ciclo este permanezca constante y el K_{La} sea conocido.

Biodegradación de altas concentraciones de compuestos fenólicos

7.1 Introducción

A pesar de las características tóxicas de los compuestos fenólicos, los lodos activados y varias especies de microorganismos han demostrado que pueden utilizar el fenol en condiciones aerobias como única fuente de carbono y de energía.

Publicaciones en revistas internacionales derivadas de este capítulo:

Moreno-Andrade I., Pérez J., Betancur M.J., Moreno J.A., Buitrón G. (2006). Biodegradation of high 4-chlorophenol concentrations in a discontinuous reactor fed with an optimally controlled influent flow rate. *Water Science and Technology*. **53** (11), 261-268.

Moreno-Andrade I., Perez J., Betancur M.J., Moreno J. A., Buitrón G. (2006). Optimal biodegradation of hazardous phenol concentrations in municipal wastewater using a controlled sequencing batch reactors. *Water Science and Technology*. *En prensa*.

Por ejemplo, Fialova *et al.* (2004) y Yang *et al.* (2005) reportaron que algunos microorganismos del género *Candida* tienen un potencial de degradación de fenol de hasta 1700 mg/L. En el caso de cultivos mixtos como los lodos activados, Tziotzios *et al.* (2005) reportó que en reactores SBR una concentración mayor a 1200 mg/L de fenol produce un fuerte efecto inhibitorio sobre los microorganismos. En el caso de un pico de concentración de 1850 mg de fenol/L, la biomasa es inhibida y es necesario un ciclo de más de 300 h para degradar el compuesto inhibitorio. Yoong *et al.* (2000) concuerda con estos estudios, puesto que observaron que concentraciones mayores a 1300 mg/L de fenol en un tratamiento por lodos activado produce la inhibición total del sistema.

En las aguas residuales de industrias químicas, farmacéuticas, papeleras, fundición de hierro, etc., las concentraciones típicas de fenoles varían entre 35 y 400 mg/L (Chen *et al.*, 1997). En este caso el tratamiento biológico puede ser una manera económica de tratar estas aguas residuales peligrosas.

Sin embargo, existen casos extremos, como en algunas aguas residuales de petroquímicas, donde residuos como las sosas gastadas contienen concentraciones totales de fenoles muy altas, las cuales pueden alcanzar valores de 30,000 a 50,000 mg/L (Olguin-Lora *et al.*, 2003). Como ejemplo, en el caso de una refinería mexicana, que produce 14 m³/d de sosas gastadas en el agua residual, la concentración de fenoles es de 30,000 mg/L (Olguin-Lora *et al.*, 2004). Este tipo de concentraciones hace ineficiente el uso de procesos biológicos para el tratamiento de estas aguas residuales, debido a que existe inhibición de los microorganismos (Buitrón *et al.*, 2003). Por lo anterior es necesario desarrollar nuevas estrategias para hacer viable el tratamiento biológico de este tipo de aguas residuales.

Por lo anterior, en este capítulo el objetivo es evaluar la aplicabilidad de la estrategia de control óptimo en la biodegradación de altas concentraciones de compuestos fenólicos para determinar la robustez del sistema ante incrementos puntuales de sustrato y los posibles efectos sobre los microorganismos.

7.2 Metodología

Se empleó el reactor 1 descrito en la metodología general (capítulo 3). Se realizó la degradación de altas concentraciones de compuestos fenólicos. Se hicieron dos bloques de experimentos. En el primer bloque se evaluó la estrategia ED-TOC en la degradación de altas concentraciones de un agua sintética que contenía 4-clorofenol en el influente. Las concentraciones evaluadas fueron 350, 3000, 5000 y 7000 mg_{4CF}/L. La concentración de 350 mg_{4CF}/L fue empleada como condición estándar (como en el capítulo anterior).

Para el caso del segundo bloque de experimentos, el influente fue una mezcla de agua residual municipal y diferentes concentraciones de fenol (350, 700, 1500, 3000 y 7000mg/L de fenol). La concentración de 350 mg/L de fenol fue empleada como condición estándar. La aclimatación de la biomasa se realizó con la estrategia de tiempos variables descrita en el capítulo 3. La caracterización del agua residual se realizó monitoreando los siguientes parámetros: DQO, SST, SSV y pH.

7.3 Resultados y Discusión

7.3.1 Degradación de altas concentraciones de 4-clorofenol

El reactor operado bajo la estrategia usual degrada eficientemente 350 mg_{4CF}/L en un ciclo de 4 h (Figura 7.1 A). Esta concentración fue estudiada y empleada con fines comparativos debido a que se ha observado que concentraciones mayores de 4CF causan inhibición de la biomasa (Buitrón *et al.*, 2003).

Por lo anterior, cuando en una planta de tratamiento operada con la estrategia usual llega agua contaminada con una alta carga de compuestos tóxicos, esta es comúnmente diluida de manera que la concentración de estos compuestos sea reducida y pueda ser tratada por el sistema sin que existan problemas de inhibición. En este caso, un pico de concentración que ha sido diluido, debe ser degradado en varios ciclos debido a que el volumen de agua residual es mucho mayor. Aplicando este concepto, para degradar los picos de concentración de 4CF planteados es necesario hacer diluciones y por lo tanto varios ciclos de operación, con lo cual tenemos la siguiente suposición: el tiempo para

degradar 350 mg/L es de 4 h (1 ciclo), por lo tanto para degradar 3000 mg_{4CF}/L son necesarios 9 ciclos (36 h), para 5000 mg_{4CF}/L son 15 ciclos (60 h) y para 7000 mg_{4CF}/L serían 20 ciclos (80 h). Además, se requiere conocer de antemano la concentración del influente.

Cabe recordar que para realizar la degradación usual de este tipo de aguas residuales se necesitarían muchos litros de agua para realizar la dilución. Para el caso de la degradación de 350 mg_{4CF}/L por medio del uso de la estrategia ED-TOC (Figura 7.1 B), se observa que la degradación total del 4CF se lleva a cabo en 2 h. En total el ciclo duró 3h, lo cual representa el 75% del tiempo necesario por la estrategia usual para la degradación de la misma carga del compuesto tóxico.

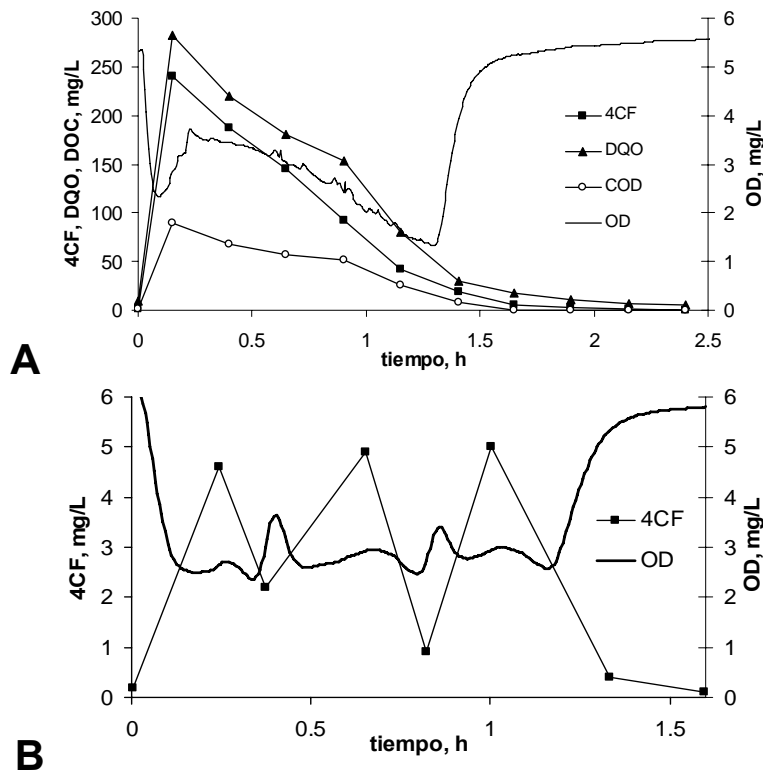


Figura 7.1 Cinética de degradación de 350 mg_{4CF}/L con la estrategia A) usual y B) ED-TOC

En el caso de la degradación de 3000 mg_{4CF}/L por medio de la estrategia de control ED-TOC (Figura 7.2 A) se realizó en un solo ciclo de 22 h (la duración total del ciclo fue de 23 h). Es posible distinguir cómo el control funciona de la misma forma que cuando se degradan concentraciones de 4CF de alrededor del 350 mg/L como fue descrito en el

capítulo anterior. Así mismo, se demuestra que el control no permite que exista una cantidad inhibitoria de 4CF, ya que dentro del reactor la concentración de 4CF nunca fue superior a 25 mg/L, excepto en el primer pulso de alimentación (primer mini-batch), donde la concentración alimentada fue de 62 mg/L debido a que el control comienza a buscar la concentración de S^* para mantener la tasa de degradación cerca del máximo. En general el comportamiento de la DQO y el COD fue similar al mostrado por el 4CF.

La degradación de 5000 mg/L de 4CF (Figura 7.2 B) fue realizada en 30 h. La cantidad de sustrato en el reactor no fue superior a 80 mg/L, solo en el primer periodo de llenado (110 mg/L), esta concentración no causó problemas de inhibición. Resultados similares se observaron en el caso de la degradación de 7000 mg/L de 4CF (Figura 7.2 C). La reacción fue de 42 h y la duración total del ciclo fue de 43 h. Es interesante hacer notar que independientemente de la concentración del influente, no se presentan problemas de inhibición en el reactor operado con la estrategia ED-TOC.

7.3.2 Comparación de la estrategia ED-TOC con la estrategia usual

Con los resultados obtenidos fue posible comparar el funcionamiento de las dos estrategias y por lo tanto verificar la capacidad de la estrategia ED-TOC para degradar aguas residuales problemáticas con altas concentraciones de compuestos inhibitorios. Recordemos que en la estrategia usual es necesario diluir concentraciones mayores a 350 mg/L de 4CF ya que para el caso del 4CF se ha reportado que no es posible degradar eficientemente concentraciones mayores de 500 mg/L sin que existan problemas de inhibición. Así mismo, se ha observado que cuando se aplican concentraciones de 1050 mg4CF/L existe una fuerte inhibición y pérdida total de la actividad de la biomasa (Buitrón *et al.*, 2003). Por lo cual, por ejemplo, para degradar el pico de 7000 mg/L de 4CF es necesario diluir el agua residual 20 veces, con lo cual se requerirán 20 ciclos de la estrategia usual para degradarlo completamente. Además de que para degradar 4 L de esta solución se necesitarían 76 L de agua para diluirla y obtener la concentración a la que la estrategia usual puede trabajar sin inhibición. Por el contrario, empleando la estrategia ED-TOC no es necesaria ninguna dilución, ya que el control determina la cantidad necesaria del flujo de entrada requerido para estar cerca de la máxima tasa de degradación de los microorganismos. Debido a que el control divide la carga en varios

mini-ciclos dentro del ciclo de operación no existe la posibilidad de que la biomasa sea inhibida por la concentración del influente. Teóricamente, cualquier concentración de compuestos inhibitorios podría ser degradada, debido a que solo será introducido al reactor la cantidad adecuada para mantener la velocidad de degradación tan cerca como sea posible a la máxima tasa de degradación.

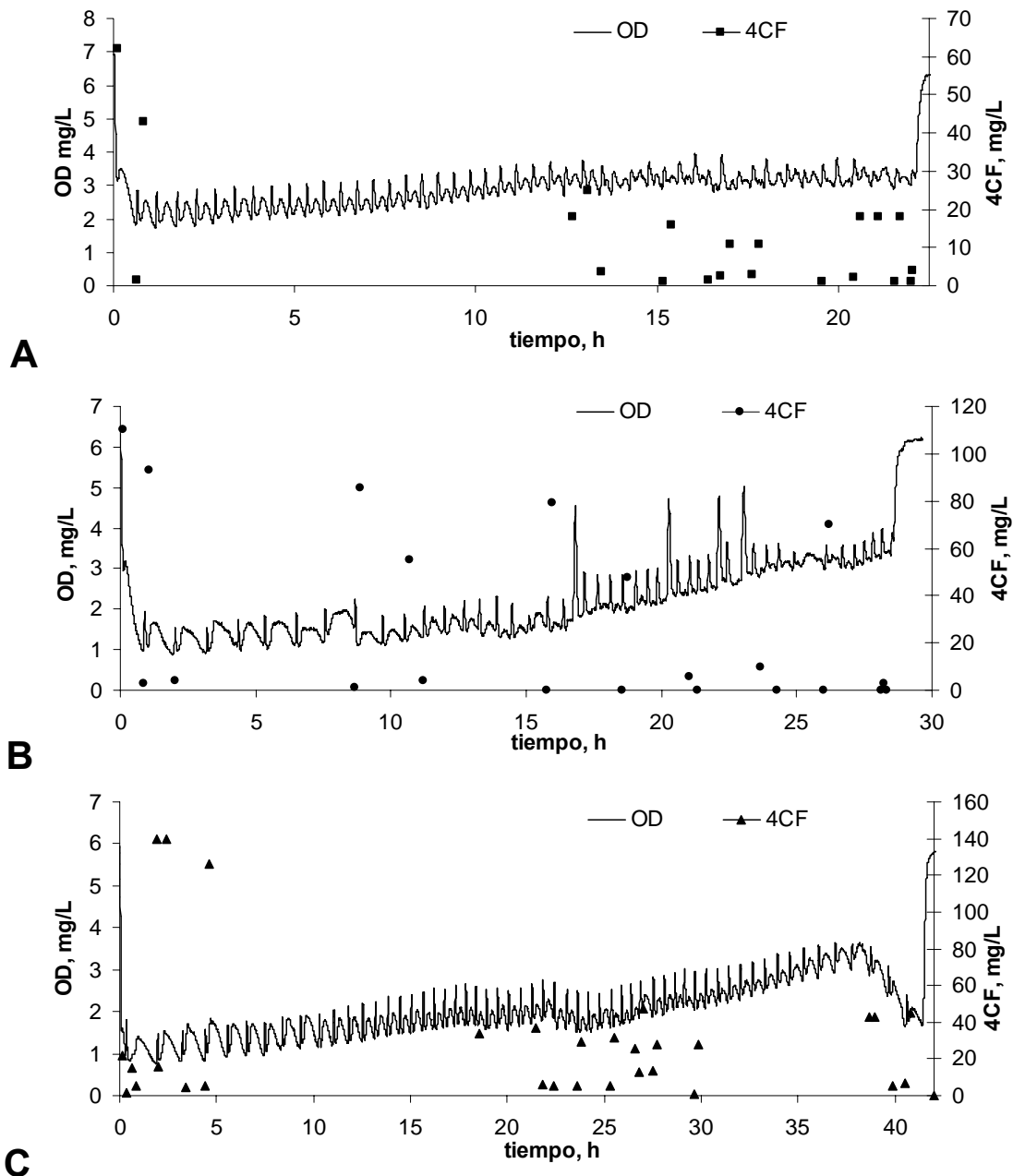


Figura 7.2 Degradación de altas concentraciones de 4CF por medio de la estrategia ED-TOC. Degradación de A) 3000, B) 5000 y C) 7000 mg4CF/L

Otra ventaja de la estrategia ED-TOC es que no es necesario conocer la concentración del sustrato en el influente ya que el control esta basado en el monitoreo en línea del consumo del oxígeno disuelto por los microorganismos, el cual está directamente relacionado con la actividad microbiana. Esto es muy importante puesto que en la estrategia usual de operación, es necesario conocer la concentración de los compuestos inhibitorios del agua residual a tratar, ya que cuando se presentan picos de concentración en el influente es necesario hacer la dilución necesaria para prevenir la inhibición de la biomasa y poder conseguir una eficiencia de degradación satisfactoria del agua residual.

La comparación de las estrategias muestra que el tiempo necesario para degradar la misma concentración de 4CF es menor al usar la estrategia ED-TOC (Figura 7.3). El tiempo requerido por la estrategia ED-TOC es menor entre 25% y 52% para la degradación de 350 y 7000 mg4CF/L respectivamente, en comparación con la estrategia de operación usual. La máxima tasa específica de degradación, q_{max} , no fue significativamente diferente al comparar ambas estrategias. Para la estrategia usual la q_{max} fue 50 mg4CF/gSSV/h, y para la ED-TOC varió entre 46 y 52 mg4CF/gSSV/h, para las cuatro concentraciones estudiadas. Esto se debe a que aunque hay una gran diferencia en la concentración del agua inhibitoria (entre 350 y 7000 mg/L), la concentración dentro del reactor no es inhibitoria para los microorganismos (entre 50 y 110 mg/L) para todos los casos.

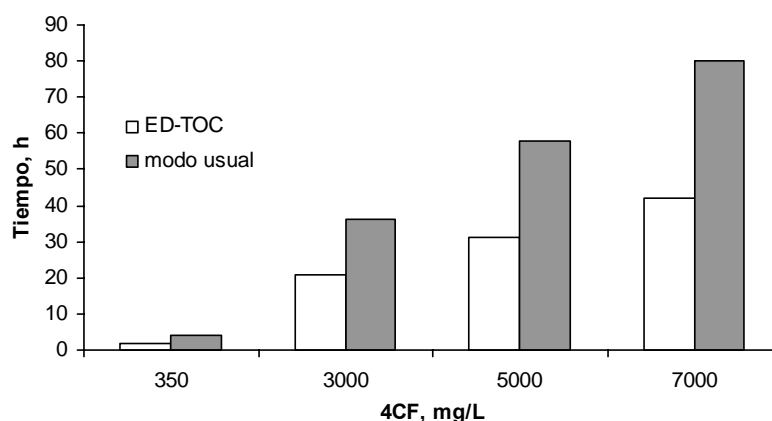


Figura 7.3 Tiempo necesario para degradar distintas cantidades de 4CF por la estrategia usual y ED-TOC

Se puede observar que para la estrategia ED-TOC la carga orgánica aplicada es de más del doble en comparación con la estrategia usual (tabla 7.1). Para la degradación de fenoles Herzbrun *et al.*, (1985) reportaron valores de 0.26 kgDQO/m³/d para un SBR a escala piloto. Así mismo, Buitrón *et al.*, (1994) reportaron valores de 1.2 kgDQO/m³/d para la degradación de 4CF en un SBR operado con la estrategia usual. La carga que puede ser degradada por un SBR operado con la estrategia ED-TOC demostró que es muy superior a los datos reportados en la literatura.

Tabla 7.1 Carga orgánica aplicada con las diferentes estrategias empleadas

4CF, mg/L	Carga orgánica aplicada (kgDQO/m ³ /d)	
	Estrategia usual (para cada ciclo)	ED-TOC
3000	2.5	4.2
5000		4.8
7000		4.8

La energía consumida por la bomba de aeración por el uso de cada una de las estrategias fue comparada (tabla 7.2). Debido a que la estrategia ED-TOC reduce el tiempo total del ciclo y en particular el tiempo de degradación, también existe una reducción en la cantidad de aire necesario en el sistema. El volumen de aire fue calculado considerando el tiempo de reacción (periodo donde se realiza la aeración) de cada uno de los ciclos para degradar los picos de concentración aplicados por las dos estrategias. Se tomó en cuenta que para los dos casos el flujo de aire fue de 1.5 L estándar/min. En general existe una reducción entre 24 y 37 % de aire debido al uso de la estrategia ED-TOC.

Tabla 7.2 Comparación del aire requerido durante la degradación de distintas concentraciones de 4CF por medio de la estrategias usual y ED-TOC

4CF, mg/L	Aire, m ³		Porcentaje de ahorro de energía* al emplear la estrategia ED-TOC
	FTC	ED-TOC	
350	0.29	0.18	37.9
3000	2.63	1.98	24.8
5000	4.39	2.70	38.4
7000	5.85	3.87	33.8

*Basado en el consumo de aire

7.3.3 Degradación de agua residual con altas concentraciones de fenol

La caracterización del agua residual municipal (planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria) proporcionó los siguientes valores (promedio de 130 lotes de agua residual empleados): los SST en el agua residual fueron 141.5 ± 25.3 mg/L, la DQO en el agua residual (sin fenol) fue 270 ± 52 mgDQO/L y 1227 ± 86 mgDQO/L en la mezcla con 350 mg/L. La aplicación de la ED-TOC mostró que es posible degradar la mezcla de agua residual y fenol. La mezcla presentó una DQO total de 1227, 2087, 4350, 6380 y 14470 para las cinco concentraciones iniciales de fenol (350, 700, 1500, 3000 and 7000 mg/L), respectivamente. Cabe recordar que el aumento en la DQO es debido al fenol mezclado con el agua residual.

El SBR operó durante 745 ciclos (285 días). Se observó una remoción de materia orgánica estable, ya que las eficiencias de remoción fueron $>99\%$ como fenol y $>95\%$ como DQO. El efluente presentó excelentes características, los SST en el efluente fueron en promedio 38 ± 13 mgSST/L y la DQO fue 19.5 ± 15.0 mg/L. La concentración de fenol en el efluente fue <1 mg/L en toda la operación del reactor. En general, la biomasa presentó una sedimentabilidad aceptable, ya que el índice volumétrico de lodos fue 114 ± 36 mL/g. La tasa específica de degradación del fenol (q) fue 238 ± 51 mg fenol/gSSV/h, durante la operación del reactor con la estrategia ED-TOC.

La Figura 7.4 presenta la q durante la operación del SBR. Al principio la biomasa fue aclimatada a la degradación de la mezcla de agua residual municipal y 350 mg/L de fenol. Esta aclimatación se llevó a cabo en un mes usando la estrategia de tiempos variables. Posteriormente se continuó operando el reactor con la estrategia usual hasta el día 63. Después el reactor fue operado con la estrategia ED-TOC. El día 145 se realizó la degradación de un pico de concentración de fenol de 7000 mg/L. En el día 149 existieron problemas de pérdida de biomasa en el reactor, por lo cual se realizó una reinoculación y una reaclimatación que se prolongó hasta el día 175, el reactor operó bajo la estrategia usual por otros 48 días. A partir del día 223 el reactor fue operado con la estrategia ED-TOC. Se realizaron experimentos para la degradación de picos de concentración de fenol de 700, 1500 y 3000 mg/L (los días 225, 255 y 270 respectivamente).

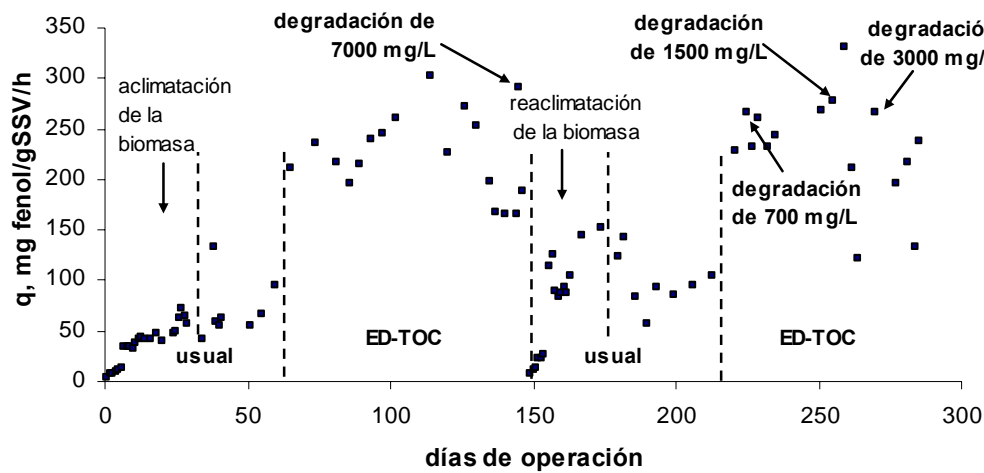


Figura 7.4 Tasa específica de degradación (q), durante la operación del SBR

El reactor operado bajo la estrategia ED-TOC degradó eficientemente 350 mg fenol/L en el influente, el tiempo de reacción fue alrededor de 2 h (4 h de tiempo total de ciclo). Esta condición fue empleada durante toda la experimentación excepto cuando se evaluó la degradación de altas concentraciones de fenol en la mezcla. La Figura 7.5 muestra la degradación de la mezcla de agua residual municipal y 350 mg fenol/L (1227 mgDQO/L en la mezcla). El control funcionó de la misma manera que al degradar aguas residuales conteniendo 4CF, es decir, alimentó en mini ciclos de manera que la concentración de sustrato se mantuviera cercana a S^* y por lo tanto a la máxima tasa de degradación.

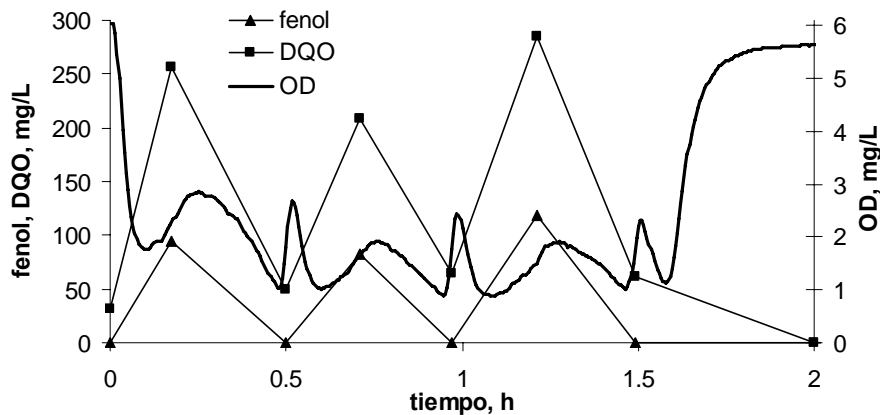


Figura 7.5 Cinética de degradación de la mezcla de agua residual municipal y 350 mg/L de fenol empleando la estrategia ED-TOC

El reactor operado con la estrategia ED-TOC mostró que es posible degradar picos de concentración de 700, 1500, 3000 y 7000 mg/L de fenol mezclados con agua residual municipal. En la Figura 7.6 se pueden observar las cinéticas de degradación de los diferentes picos de concentración evaluados. En general el comportamiento del control

fue similar a lo observado en la degradación del 4CF. Las eficiencias de remoción fueron mayores al 99% como DQO y como fenol.

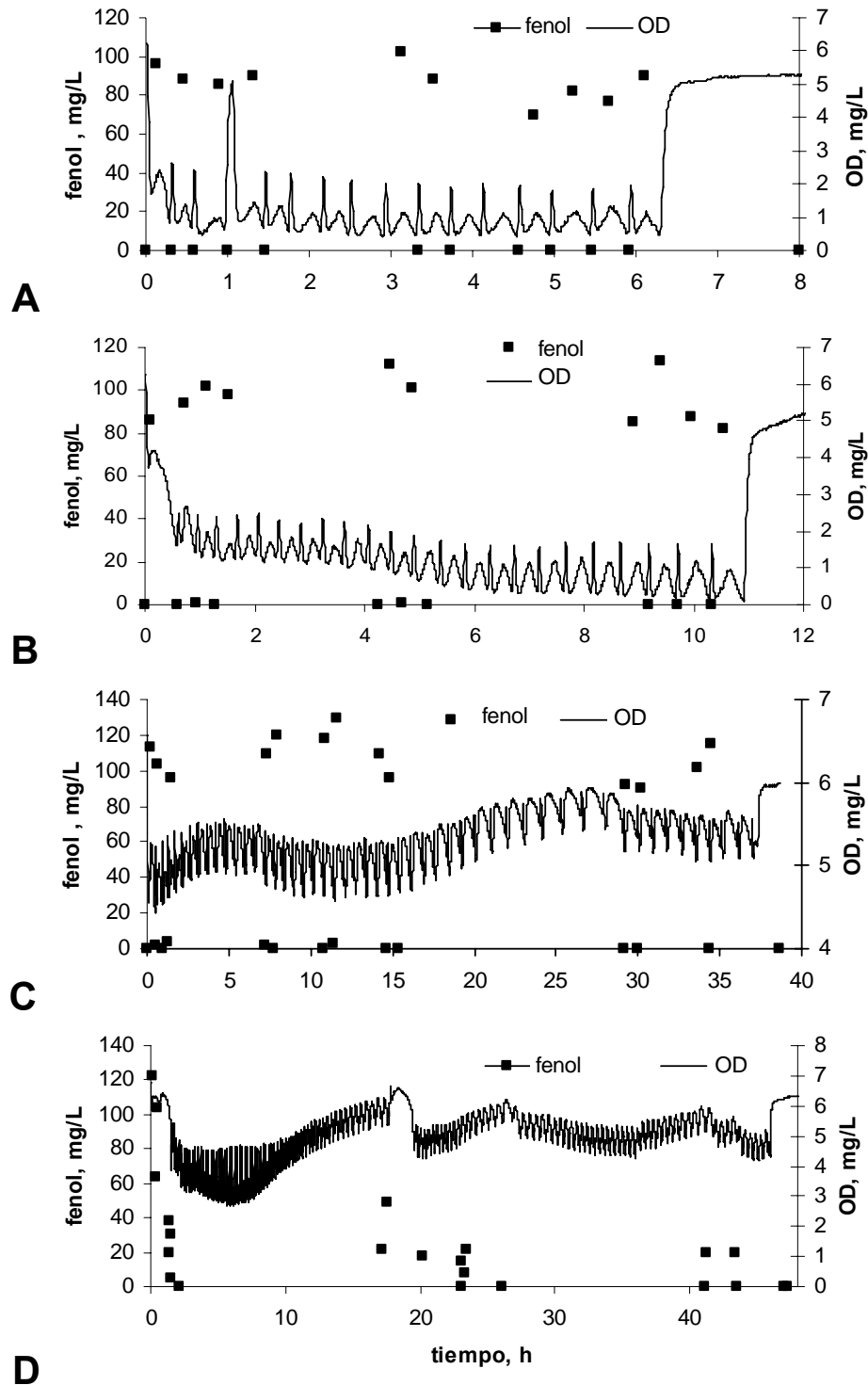


Figura 7.6 Cinéticas de degradación de la mezcla de agua residual municipal y A) 700, B) 1500, C) 3000 y D) 7000 mg/L de fenol usando la estrategia ED-TOC.

Se ha reportado en otros estudios usando SBR, que la degradación de picos de concentración de fenol en aguas residuales municipales mayores a 1300 mg/L causan problemas de inhibición e incluso la pérdida total de la actividad de los microorganismos (Yoong *et al.*, 2000). Al igual que en el caso del 4CF se puede comentar que la estrategia usual de operación no podría degradar aguas residuales que contengan estas altas concentraciones de fenol y sin embargo, la estrategia ED-TOC puede manejar estas concentraciones y en teoría cualquier cantidad de tóxicos en el agua residual podría ser tratada eficientemente.

La Figura 7.7 muestra un detalle de la cinética de degradación del pico de concentración de 7000 mg/L de fenol en la mezcla. Es posible ver que el control operó de manera similar a la degradación de la mezcla con 350 mg fenol/L, solo que la alimentación fue dividida en más mini-ciclos, los cuales fueron aumentando en número conforme la concentración de fenol en la mezcla aumentó. En la gráfica se puede observar que los en cada uno de los mini-ciclos la concentración de fenol nunca alcanzó valores inhibitorios.

Estos resultados confirman que es posible la implementación práctica de la estrategia ED-TOC, y abren la posibilidad para que la estrategia sea probada en la degradación de efluentes reales de una industria.

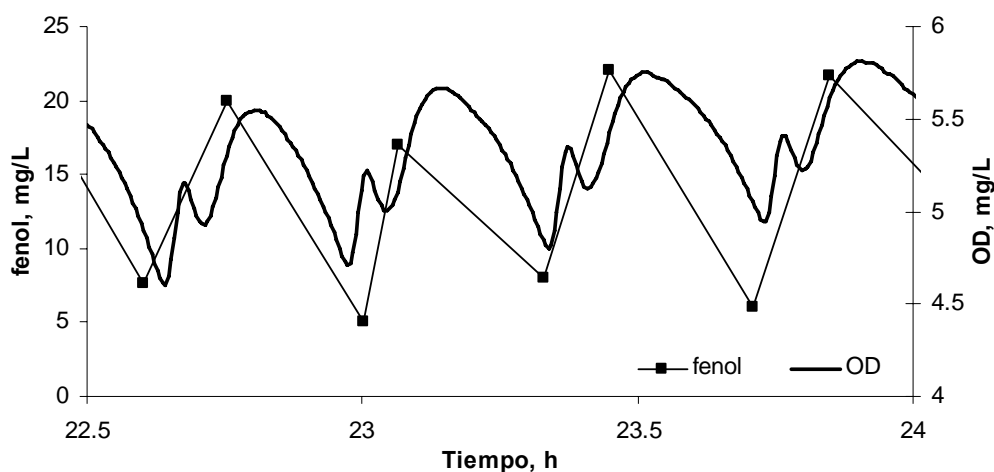


Figura 7.7 Detalle de la cinética de degradación de la mezcla de agua residual municipal y 7000 mg/L de fenol

7.4 Conclusiones

La estrategia ED-TOC demostró que es capaz de manejar aumentos puntuales en la concentración de compuestos fenólicos, los cuales son inhibitorios de los procesos usuales empleados para la degradación de efluentes industriales. Se pudo lograr la degradación de aguas residuales que contenían hasta 7000 mg/L de compuestos fenólicos (fenol y 4CF), lo cual no había sido posible hacer con la estrategia usual; incluso estas concentraciones de fenoles pueden ser consideradas como residuos peligrosos. Esto hace a la estrategia de control óptimo una excelente herramienta para el tratamiento de efluentes industriales.

A pesar de que los efluentes industriales han sido reportados como problemáticos para su tratamiento por medio de procesos biológicos, la estrategia de control óptimo es una excelente herramienta para su tratamiento.

Conclusiones

La principal motivación para realizar esta investigación es el problema que presentan las plantas de tratamiento de aguas industriales, pues las eficiencias de remoción de compuestos tóxicos no son satisfactorias debido a las variaciones que existen en la calidad y cantidad de sustancias tóxicas en los efluentes industriales.

El principal aporte de esta tesis fue el estudiar alternativas para tratar eficientemente los efluentes inhibitorios. Para tener un proceso eficiente fue necesario conocer los mecanismos que afectan a la comunidad microbiana. Con los conocimientos generados fue posible optimizar el tratamiento en las distintas etapas por las que tienen que pasar los microorganismos de un biorreactor (aclimatación de la biomasa, optimización del proceso y operación a largo plazo). Se demostró que durante la aclimatación la actividad de los microorganismos se incrementa hasta su máxima actividad degradadora, siempre y cuando no se sobrepasen los valores inhibitorios al comienzo de la misma. Para maximizar la degradación y evitar la desaclimatación de la biomasa activa es necesario que los microorganismos se mantengan cerca de su valor máximo durante toda la fase de reacción. Se estudió un control óptimo del llenado que puede ser empleado en biorreactores discontinuos, el cual mantiene la tasa de degradación cercana a su valor

máximo. La estrategia de control estudiada hizo posible la biodegradación eficiente de sustancias inhibitorias sin importar las variaciones de concentración en la alimentación (en este caso de compuestos fenólicos).

A continuación se describen las conclusiones particulares obtenidas en la investigación:

La aclimatación al 4-clorofenol produce una reducción en el tiempo de degradación. Para el caso del 4-clorofenol el tiempo de degradación pasó de 52 h a 2 h en 10 ciclos de operación (120 h). Existe un aumento en la afinidad del consorcio para biodegradar el sustrato tóxico, mientras que la capacidad de asimilar un sustrato fácilmente biodegradable disminuye. La aclimatación al 4-clorofenol aumenta la capacidad de sedimentación de la biomasa debido a que las bacterias filamentosas son inhibidas. De acuerdo con el análisis de la comunidad microbiana por medio de técnicas de biología molecular se encontró que en la aclimatación hay selección y multiplicación de microorganismos especializados en la degradación de 4-clorofenol.

Se evidenció que los ayunos generan disminución de la actividad microbiana y de la tasa específica de degradación. La variación en la concentración de los tóxicos presentes en el agua produce una desaclimatación de la biomasa aclimatada y por lo tanto, la actividad de los microorganismos disminuye causando bajas eficiencias en la operación del biorreactor. El grado de desaclimatación es determinado por la historia de la biomasa, efecto que no había sido reportado en la literatura hasta donde conocemos. El efecto del ayuno sobre la tasa de degradación es menos significativo cuando los microorganismos son puestos en condiciones de ayuno, reaclimatados hasta obtener la actividad inicial y después expuestos al ayuno otra vez, no así en el caso donde los ayunos son cíclicos y no hay un período de recuperación. De cualquier manera, el decremento de la actividad de los microorganismos generado por la variación del tóxico (desaclimatación de la biomasa aclimatada) explica las variaciones en el funcionamiento de las plantas de tratamiento aguas residuales industriales que contienen compuestos inhibitorios. Los experimentos con *Pseudomonas aeruginosa* mostraron que la pérdida de actividad para degradar el sustrato tóxico esta correlacionada con la disminución de la viabilidad celular. Esto demuestra que para el caso de lodos activados no sólo hay cambios en la dinámica poblacional, ya que algunas especies mueren y otras resisten al

ayuno, sino que también existe pérdida de la actividad degradadora y en la viabilidad de las células.

La nueva estrategia de control mostró la factibilidad de ser empleada en forma práctica en el laboratorio. El reactor presentó un buen funcionamiento ya que la mineralización del 4CF fue terminada de manera satisfactoria, con eficiencias de biodegradación mayores al 99.9% como 4CF y mayores a 98% como DQO o carbono orgánico. El proceso funcionó de forma adecuada y estable, ya que la remoción de los sólidos suspendidos totales en el efluente se mantuvieron debajo de 40 mg/L, valor requerido en la norma oficial mexicana para una descarga en un río o para su uso en riego agrícola o uso público urbano con previo tratamiento (NOM-001-ECOL-1996). Los lodos mostraron excelente sedimentabilidad sin importar que la tasa de degradación de los microorganismos se mantuviera en su valor máximo. La velocidad de sedimentación se mantuvo alrededor de 3 m/h y el índice volumétrico de lodos menor a 90 mL/g. La estrategia de control óptimo degradó efluentes conteniendo concentraciones de fenol y 4-clorofenol de 7000 mg/L sin ningún tipo de inhibición. De hecho, este tipo de concentraciones pueden ser consideradas como un residuo peligroso. El reactor mostró ser robusto y estable en la operación a largo plazo. No solo se eliminó la materia orgánica, sino que también se eliminó la toxicidad del 4CF (medida por medio del sistema Microtox). A pesar de que la estabilidad del sistema fue demostrada por medio de los parámetros fisicoquímicos, se evidenció una fuerte dinámica entre las poblaciones que llevan a cabo la degradación del 4CF.

La biodegradación de efluentes inhibitorios utilizando reactores discontinuos operados bajo la estrategia de control óptimo resulta una excelente opción para el tratamiento de aguas residuales industriales. Lo anterior es debido a que la actividad de los microorganismos se mantiene durante todo el ciclo de reacción en valores cercanos al máximo, evitando niveles inhibitorios. Debido a los resultados exitosos de esta investigación, es imprescindible continuar la investigación de la estrategia de control óptimo con el escalamiento e implementación de la tecnología desarrollada para la biodegradación de efluentes industriales en un SBR prototipo-industrial para evaluar su aplicación en las industrias del país.

Referencias

- ASTM D 5660-96. (2004). Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium. *American Society for Testing and Materials Standards*, Estados Unidos.
- Aelion C.M., Dobbins D.C., Pfaender F.K. (1989). Adaptation of aquifer microbial communities to the biodegradation of xenobiotic compounds: influence substrate concentration and preexposure. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**, 75-86.
- AFNOR. (1985). Evaluation en milieu aqueux de la biodegradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles, *Normalisation française*, NFT 90-312. Francia.
- Alexander M. (1999). Biodegradation and Bioremediation. *Academia Press*. 2^{da} ed., San Diego, California. pp. 453
- Apajalahti J.H.A., Karpanoja P., Salkinoja-Salonen M.S. (1986). *Rhodococcus chlorophenicus* sp. nov., a chlorophenol-mineralizing actinomycete. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 246–251.
- APHA. (1992). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation*. 18th ed., Washington DC. Part 2000 y 5000.

-
- API 20 E. (1990). Système d'identification des bacilles gram négatif non enterobactéries. 20 EN. *Notice technique, Bio Mérieux, S.A., Paris, Francia.*
- Betancur M.J. (2006). Control óptimo y robusto de una clase de (bio)reactores mediante detección de eventos. Tesis de doctorado, Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería, UNAM. pp. 156.
- Betancur M.J., Moreno J., Buitrón G. (2004a). Event-driven control for treating toxicants in aerobic sequencing batch bioreactors. *Proceedings of the 9th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology (CAB9)*. CD ROM archivo 1074. Marzo 28-31, Nancy, Francia.
- Betancur M.J., Moreno J., Buitrón G. (2004b). Practical optimal control of fed-batch bioreactors. *6th. IFAC-Symposium on Nonlinear Control Systems (NOLCOS 2004)*. September 1-3, 2004. Stuttgart, Alemania, 1517-1522.
- Betancur M.J., Moreno J.A., Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2006). Practical optimal control of fed-batch bioreactors for the wastewater treatment. *Int. J. Robust Nonlinear Control*. **16**,173-190.
- Beun J.J., Hendriks A., van Loosdrecht M.C.M, Morgenroth E., Wilderer P.A., Heijnen J.J. (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res.* **33** (10), 2283-2290.
- Beun J.J., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (2002). Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Res.* **36**, 702-712.
- Blum D.J.W., Speece R.E. (1991). A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparisons and correlations. *Research Journal Water Pollution Control Federation*, **63** (3), 198-207.
- Buitrón G., Koefoed A., Capdeville B. (1993). Control of phenol biodegradation by using CO₂ evolution rate as an activity indicator. *Environ. Technol.* **14**, 227-236.
- Buitrón G., Moreno J. (2004). Modeling of the acclimation/deacclimation processes of a mixed culture degrading 4-chlorophenol. *Water Sci. Technol.* **49** (1), 79-86
- Buitrón G., Capdeville B., Horny P. (1994). Improvement and control of the microbial activity of a mixed population for degradation of xenobiotic compounds. *Water Sci. Technol.* **29**(7), 317-329.
- Buitrón G., Schoeb M.-E., Moreno J. (2003). Automated Sequencing Batch Bioreactor Under Extreme Peaks of 4-Chlorophenol. *Water Sci. Technol.* **47** (10), 175-181.

-
- Buitrón G., Schoeb M.-E., Moreno-Andrade I., Moreno J.A. (2005). Evaluation of two control strategies for a sequencing batch reactor degrading high concentration peaks of 4-chlorophenol. *Water Res.* **39**, 1015–1024.
- Bull A.T., Slater J.H. (1982). In microbial Interactions and communities. Vol 1, Bull A.T., Slater J.H eds. *Acad. Press*. New York. pp. 13-44.
- Buitrón G., Capdeville B. (1995). Enhancement of the biodegradation activity by the acclimation of the inoculum. *Environ. Tech.* **16**, 1175-1184.
- Chen J., Rulkens W.H., Bruning H. (1997). Photochemical elimination of phenols and COD in industrial wastewaters. *Water Sci. Technol.* **35**(4), 231–238.
- Chiavola A., Baciocchi R., Irvine R.L., Gavasci R., Sirini P. (2004). Aerobic biodegradation of 3-chlorophenol in a sequencing batch reactor: effect of cometabolism. *Water Sci. Technol.* **50**(10), 235-242.
- Chudoba P., Capdeville B., Chudoba J. (1992). Explanation of biological meaning of the S_0/X_0 ratio in batch culture. *Water Sci. Technol.* **26** (3-4), 743-751.
- Chudoba P., Chevalier J.J., Chang J., Capdeville B. (1991). Effect of anaerobic stabilization of activate sludge on its production under batch conditions at various S_0/X_0 ratios. *Water Sci. Technol.*, **23** (4-6), 917-926.
- Coelho M.A.Z., Russo C., Araújo O.Q.F. (2000). Optimization of a sequencing batch reactor for biological nitrogen removal. *Water Res.* **34**(10), 2809-2817.
- Coello Oviedo M.D., López-Ramírez J.A., Sales D., Quiroga J.M. (2003). Evolution of an activated sludge system under starvation conditions. *Chem. Eng. Journal.* **94**, 139-146.
- Commandeur L.C.M., Parson J.R. (1990). Degradation of halogenated aromatic compound. *Biodegradation.* **1**, 207-220.
- Davey H.M., Kell D.B. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* **60** (4), 641-696.
- de Kreuk M.K., de Bruin L.M.M. (2004). Aerobic Granule Reactor Technology. *Water and Wastewater Practitioner Series: STOWA Report*, IWA Publishing: London, 50 pp.
- de Kreuk M.K., van Loosdrecht M.C.M. (2004) Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Sci. Tech.*, **49** (11-12), 9-17.

-
- Delbés C., Moletta R., Godon J.J. (2000). Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase C₄in-single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* **2** (5), 506-515.
- Eckenfelder W.W., Musterman J.L. (1995). Activated Sludge treatment of industrial wastewater. 1 ed., *Technomic Publishing Co. Inc.* Lancaster, Pennsylvania. pp. 281.
- Ellis T.G., Smets B.F., Magbanua B.S., Grady C.P.L.Jr. (1996). Changes in measured biodegradation kinetics during the long-term operation of completely mixed activated sludge (CMAS) bioreactors. *Water Sci. Technol.* **34** (5/6), 35-42.
- Elväng A.M., Westerberg K., Jernberg C., Jansson J.K. (2001). Use of green fluorescent protein and luciferase biomarkers to monitor survival and activity of *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 cells during biodegradation of 4-chlorophenol in soil. *Environ. Microbiol.* **3**, 32-42.
- Escher B.I., Snozzi M., Schwarzenbach R.P. (1996). Uptake, speciation, and uncoupling activity of substituted phenols in energy transducing membranes. *Environ. Sci. Tech.* **30**, 3071-3079.
- Escher B.I., Hunziker R.W., Schwarzenbach R.P. (2001). Interaction of phenolic uncouplers in binary mixtures: concentration-additive and synergistic effects. *Environ. Sci. Tech.* **35**, 3905-3914.
- Etchebere C., Errazquin M.I., Dabert P., Moletta R., Mixí L. (2001). Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**, 259-267.
- Fialova A., Boschke E., Bley T. (2004). Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. *Int. Biodeter. Biodegr.* **54** (1), 69-76.
- Grady C.P.L.Jr (1985). Biodegradation: Its measurement and microbiological basis. *Biotech. Bioeng.* **27**, 660-674.
- Grady C.P.L.Jr, Daigger G.T., Lim H.C. (1999). Biological wastewater treatment. 2nd Ed., *Marcel Dekker*, Paris. pp 1076.
- Gunthorpe L., Nottage M., Palmer D., Wu R. (1995). The development of a fertilisation inhibition assay using gametes of the brown alga *Hormosira banksii*. *Australasian J. Ecotox.* **1**, 25-31.
- Herzbrun P.A., Irvine R.L., Malinowski K.C. (1985). Biological treatment of hazardous waste in sequencing batch reactors. *J.W.P.C.F.* **57**, 1163-1667.
- Hollender J., Dott W., Hopp J. (1994). Regulation of chloro and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2330-2338.
-

-
- Hovander L., Malmberg T., Athanasiadou M., Athanassiadis I., Rahm S., Bergman Å., Wehler E.K. (2002). Identification of hydroxylated PCB metabolites and other phenolic 65 halogenated pollutants in human blood plasma. *Arch. Environ. Con. Tox.* **42**, 105-117.
- Howard P.H., Boethling R.S., Jarvis W.F., Meylan W.M., Michalenko E.M. (1991). Handbook of Environmental Degradation Rates. 1 ed. *Lewis publishers, Inc.* Michigan, Estados Unidos. pp. 725.
- Hu Z., Ferrainab R.A., Ericson J.F., MacKaya A.A., Smets B.F. (2005). Biomass characteristics in three sequencing batch reactors treating a wastewater containing synthetic organic chemicals. *Wat. Res.* **39**, 710-720.
- Inui T., Tanaka Y., Okayasu Y., Tanaka H. (2002). Application of toxicity monitor using nitrifying bacteria biosensor to sewerage systems. *Water Sci. Technol.* **45** (4-5), 271-278.
- Irvine R.L., Ketchum L.J.Jr. (1989). Sequencing batch reactors for biological wastewater treatment. *CRC Critical Rev. Environ. Control.* **18** (4), 225-294.
- ISO 11348-3. (1998). Water Quality-Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent Bacteria) Test. *International Organization of Standardization*, Suiza.
- Kargi F., Uygur A., Baskaya H.S. (2005). Para-chlorophenol inhibition on COD, nitrogen and phosphate removal from synthetic wastewater in a sequencing batch reactor. *Biores. Technol.* **96**, 1696-1702.
- Kim J-H., Oh K-K., Lee S-T., Kim S-W., Hong S-I. (2002). Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. *Process Biochem.* **37** (12), 1367-1373.
- Kintz P., Tracqui A., Mangin P. (1992). Accidental death caused by the absorption of 2,4-dichlorophenol through the skin. *Arch. Toxicol.* **66**, 298-299.
- Kirk-Othmer. (2004). Encyclopedia of chemical technology. Vol. 18. 5th ed. *Wiley-Interscience*. Hoboken, N.J., Estados Unidos. pp. 747-755.
- Lappalainen J., Juvonen R., Nurmi J., Karp M. (2001). Automated color correction method for the *Vibrio fischeri* toxicity test. Comparison of standard and kinetic assays. *Chemosphere.* **45**, 635-641.
- Lewandowski G.A. (1990). Batch biodegradation of industrial organic compounds using different liquor from different POTWs. *Research Journal WPCF.* **62** (6), 803-809.

-
- Madigan M., Martinko J., Parker J. (1997). Brock. Biology of microorganisms. 8th ed., Edit. Prentice Hall. New Jersey. pp. 986.
- Madsen T., Aamand. J. (1992). Anaerobic transformation and toxicity of trichlorophenols in a stable enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 557-561.
- Mc Swain B.S., Irvine R.L., Wilderer P.A. (2004a). The influence of settling time on the formation of aerobic granules. *Water Sci. Technol.* **50** (10), 195-202.
- Mc. Swain B.S., Irvine R.L., Wilderer P.A. (2004b). Effect of intermittent feeding on aerobic granule structure. *Water Sci. Technol.* **49** (11-12), 19-25.
- Metcalf & Eddy, Inc. (1991). Wastewater engineering, treatment, disposal and reuse. 3 ed., Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D. eds. McGraw Hill, New York, Estados Unidos. pp. 1819.
- Moreno G., Buitrón G. (2004). Influence of the origin of the inoculum and the acclimatization strategy on the degradation of 4-chlorophenol. *Biores. Technol.* **94** (2), 215-218.
- Moreno J. (1999). Optimal time control of bioreactors for the wastewater treatment. *Optim. Contr. Appl. Meth.* **20**, 145-164
- Moreno J., Buitrón G. (1998). Respirometry based optimal control of an aerobic bioreactor for the industrial wastewater treatment. *Water Sci. Technol.* **38** (3), 219-226.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2003). Influence of the initial substrate to microorganisms ratio on the anaerobic inhibition test. *Water Sci. Technol.* **48** (6), 17-22.
- Moreno-Andrade I., Buitrón G. (2004). Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Sci. Technol.* **50** (10) 251-258.
- Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O., Jannasch H.W. (1995). Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* **164**, 165-172.
- Nguyen A.L., Duff J.B., Sheppard J.D. (2000). Application of feedback control based on dissolved oxygen to a fixed-film sequencing batch reactor for treatment of brewery wastewater. *Water Environ. Res.* **72** (1), 75-83.
- Ohya T., Ohyama M., Kobayashi K. (2005). Optimization of human serum albumin production in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* by repeated fed-batch fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **90** (7), 879-887.

-
- Olguín-Lora P., Razo-Flores E. (2004). Anaerobic biodegradation of phenol in sulfide-rich media. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 554–561.
- Olguin-Lora P., Puig-Grajales I., Razo-Flores E. (2003). Inhibition of the acetoclastic methanogenic activity by phenol and alkyl phenols. *Environ. Technol.* **24**, 999-1006.
- Perez R.R., Benito G.G., Miranda M.P. (1997). Chlorophenol degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biores. Tech.* **60**, 207–213.
- Pritchard P.H., O'Neill E.J., Spain C.M., Ahern D.J. (1987). Physical and biological parameters that determine the fate of p-chlorophenol in laboratory test systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1833-1838.
- Puhakka J.A., Melin E.S. (1996). Bioremediation of chlorinated phenols. In: Bioremediation: Principles and applications. Crawford R.L., Crawford D.L. eds. *Cambridge University Press*. pp. 254-299
- Radehaus P.M., Schmidt S.K. (1992). Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2879–2885.
- Rittmann B.E., McCarty P.L. (2001). Biotecnología del medio ambiente, principios y aplicaciones. 1^{ra} ed., *McGraw Hill/Interamericana de España S.A.* Madrid, España. pp. 745.
- Romero J.A (2002). Tratamiento de aguas residuales. Teoría y principios de diseño. 2^{da} ed. *Escuela colombiana de ingeniería*. Bogotá, Colombia, pp. 1244.
- Scheppard J.D., Copper D.G. (1990). Development of computerized feedback control for continuous phasing of *Bacillus subtilis*. *Biotech. Bioeng.* **36**, 539-545.
- Shuler M.L., Kargi F. (1992). Bioprocess Engineering, Basic concepts. 1 ed. *Prentice Hall P T R*. Englewoods Cliffs, N.J., Estados Unidos. pp. 479.
- Speece R.E., Engelbrecht R.S., Aukamp D.R. (1973). Cell replication and biomass in the activate sludge process. *Water Res.* **7**, 361-374.
- Stephenson T., Lester N.J., Perry. (1984). Acclimatization to nitrilotriacetic acid in activated sludge process. *Chemosphere.* **13**, 1033-1047.
- Subba-Rao R.V., Rubin H.E., Alexander M. (1982). Kinetics and extended of mineralization of organic chemicals at trace levels in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1139-1150.

-
- Tantasut J., Satoh H., Parkpian P. Mongkolsuk S. (2006). Effects of exposure times on the toxic response of ammonia oxidizing mixed culture (AOMC) to phenol and chlorinated phenols. *Memorias del 5th IWA World Water Congress*. 11-14/09/2006. Beijing, China.
- Torrijos M., Sousbie P., Moletta R., Delgenes J.-P. (2004). High COD wastewater treatment in an aerobic SBR: treatment of effluent from a small farm goat's cheese dairy. *Water Sci. Technol.* **50** (10), 235-242.
- Tziotzios G., Teliou M., Kaltsouni V., Lyberatos G., Vayenas D.V. (2005). Biological phenol removal using suspended growth and packed bed reactors. *Biochem. Eng. J.* **26**, 65–71.
- van Elsas J.D., Wolters A.C., Clegg C.D., Lappin-Scott H.M., Anderson J.M. (1994). Fitness of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* in competition for soil and root colonization. *FEMS Microbiol. Ecol.* **13**, 259-272.
- van den Berg K.J. (1990). Interaction of chlorinated phenols with thyroxine binding sites of human transthyretin, albumin and thyroid binding globulin. *Chem-biol. Interact.* **76**,63-75.
- van Overbeek L.S., Eberl L., Givskov M., Molin S., van Elsas J. D (1995). Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. *App. Environ. Microbiol.* **61**, 4202-4208.
- Vargas A., Soto G., Moreno J.A., Buitrón G. (2000). Observer based time-optimal control of an aerobic SBR for chemical and petrochemical wastewater treatment. *Wat. Sci. Technol.* **42** (5-6), 163-170.
- Ventullo R.M., Larson R. (1986). Adaptation of microbial communities to quaternary ammonium compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 356-361.
- Wan-Taek I., Hee-Sung B., Akira Y., Sung T.L. (2004). *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 851–855.
- Watanabe K., Miyashita M., Harayama S. (2000). Starvation improves survival of bacteria introduced into activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (9), 3905 - 3910.
- Wentz, C.A. (1989). *Hazardous Waste Management*; 1 ed. *McGraw-Hill Book Co.* New York.
- Westerberg K., Elväng A.M., Stackebrandt E., Jansson J.K. (2000). Biodegradation of high concentrations of 4-chlorophenol: Isolation and characterisation of *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 2083-2092.
- Westmeier F., Rehm H.J. (1987). Degradation of 4-chlorophenol in municipal wastewater by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A 7-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 78-83.

-
- Wiggings B.A., Jones S.H., Alexander M.A. (1987). Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *App. Environ. Microbiol.* **53**, 791-796.
- Wilderer P.A., Irvine R.L., Goronszy M.C. (2001). Sequencing batch reactor technology. Scientific and technical report No 10, *IWA Publishing*, London. 76 pp.
- Wilderer P.A., McSwain B.S. (2004). The SBR and its biofilm application potentials. *Water Sci. Technol.* **50** (10), 1-10.
- Yan J., Jianping W., Hongmei L., Suliang Y., Zongding H. (2005). The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochem. Eng. J.* **24**, 243-247.
- Ye F.-X., Shen D.S. (2003). Acclimation of anaerobic sludge degrading chlorophenols and the biodegradation kinetics during acclimation period. *Chemosphere.* **54** (10), 1573-1580.
- Yee D.C., Wood T.K. (1997). 2,4-Dichlorophenol degradation using *Streptomyces viridosporus* T7A lignin peroxidase. *Biotechnol. Prog.* **13**, 53-59.
- Yoong E.T., Lant P.A., Greenfield P.F. (2000). In situ respirometry in a SBR treating wastewater with high phenol concentrations. *Water Res.* **34**(1), 239-245.

Publicaciones derivadas del doctorado

En revistas indexadas de circulación internacional

1. **Moreno-Andrade I.** and Buitrón G. (2004). Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Water Science and Technology*. **50** (10), 251-258.
2. Buitrón G., Schoeb M-E., **Moreno-Andrade I.** Moreno J.A. (2005). Evaluation of two control strategies for a sequencing batch reactor degrading high concentration peaks of 4-chlorophenol. *Water Research*, **39**, 1015-1024.
3. **Moreno-Andrade I.**, Buitrón G., Betancur M.J., Moreno J.A. (2006) Optimal degradation of inhibitory wastewaters in a fed-batch bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **81**, 713-720.

-
4. **Moreno-Andrade I.**, Pérez J., Betancur M.J., Moreno J.A., Buitrón G. (2006). Biodegradation of high 4-chlorophenol concentrations in a discontinuous reactor fed with an optimally controlled influent flow rate. *Water Science and Technology*. **53** (11), 261-268.
 5. Betancur M.J., Moreno J.A., **Moreno-Andrade I.**, Buitrón G. (2006) Practical optimal control of fed-batch bioreactors for the wastewater treatment. *International Journal of Robust Nonlinear Control, Special Issue on Control of (Bio) Chemical reacting Systems*. **16**,173–190.
 6. Betancur M.J., Moreno J.A., Buitrón G., **Moreno-Andrade I.** (2006). Event-driven time-optimal control for a class of discontinuous bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **94** (4), 803-14.
 7. **Moreno-Andrade I.**, López-Vidal Y., Buitrón G. (2006). Effect of the starvation in the activity and viability of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 acclimated to degrade 4-chlorophenol in a discontinuous reactor. *Water Science and Technology*. *En prensa*.
 8. Buitrón G., **Moreno-Andrade I.**, Perez J., Betancur M.J., Moreno J.A. (2006). Optimal biodegradation of hazardous phenol concentrations in municipal wastewater using and controlled Sequencing Batch Reactors. *Water Science and Technology*. *En prensa*.
 9. Buitrón G., **Moreno-Andrade I.**, Linares-García J.A., Perez J., Betancur M.J., Moreno J.A. (2007). Evaluation of an optimal fill strategy to biodegrade inhibitory wastewater using an industrial prototype discontinuous reactor. *Water Science and Technology*. *Aceptado*.

Artículos en extenso en congresos internacionales

1. **Moreno-Andrade I.**, Buitrón G. (2004). Variation of the microorganism activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-clorophenol. 3rd IWA Specialised Conference on Sequencing Batch Reactors. 22-26/02/2004. Noosa, Queensland, Australia.

-
2. **Moreno-Andrade I.**, Betancur M.J., Moreno J.A., Buitrón G. Inhibitory wastewaters degradation using a discontinuous bioreactor. Water and Wastewater Management Congress (Achemamerica 2005), 12-15/04/2005. México D.F.
 3. **Moreno-Andrade I.**, Pérez J., Betancur M.J., Moreno J.A., Vargas A., Buitrón G. (2005). Degradation of a mixture of municipal wastewater and phenol in an aerobic optimally controlled SBR. 3rd IWA Leading-edge conference & exhibition on water and wastewater treatment technologies, 6-8/06/2005. Sapporo, Japón.
 4. **Moreno-Andrade I.**, Pérez J., Betancur M.J., Moreno J.A., Buitrón G. (2005). Biodegradation of high 4-chlorophenol concentrations in a discontinuous reactor fed with an optimally controlled influent flow rate. Sustainable Development of Chemical Industries, 14-16/07/2005. Tsukuba and Kashima, Japón.
 5. Buitrón G., Moreno J.A., Betancur M.J., **Moreno-Andrade I.** (2004). Aerobic treatment of toxic wastewater: problems, solutions, and open questions. 3rd IWA Specialised Conference on Sequencing Batch Reactors. 22-26/02/2004. Noosa, Queensland, Australia.
 6. **Moreno-Andrade I.**, Buitrón G. (2004). Evolution of the microbial activity during the acclimation and deacclimation (starvation) of activated sludge to 4-chlorophenol. 4th IWA World Water Congress, 19-24/09/2004. Marrakech, Marruecos.
 7. Buitrón G., **Moreno-Andrade I.**, Betancur M.J., Moreno J.A. (2004). Application of the event-driven time optimal control strategy for the degradation of inhibitory wastewater in a discontinuous bioreactor. 4th IWA World Water Congress. 19-24/09/2004. Marrakech, Marruecos.
 8. Betancur M.J., Moreno J.A., **Moreno-Andrade I.**, Buitrón G. (2005). Control strategies for treating toxic wastewater using bioreactors. 16th IFAC World Congress. 4-8/07/2005. Praga, Republica Checa.
 9. **Moreno-Andrade I.**, Buitrón G. (2005). The activity of the microorganisms acclimated to 4-chlorophenol vary when they are exposed to starvation. 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference. Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment (ASPD4), 17-20/07/2005. Queensland, Australia.

-
10. Betancur M.J., **Moreno-Andrade I.**, Moreno J.A., Dochain D., Buitrón G. (2005). Modeling for the optimal biodegradation of toxic wastewater in a discontinuous reactor. 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference. Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment (ASPD4), 17-20/07/2005. Queensland, Australia.
 11. Velázquez E., **Moreno-Andrade I.**, Buitrón G. (2005). Community evolution during the acclimation process of activated sludge to p-chlorophenol. 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference. Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment (ASPD4), 17-20/07/2005. Queensland, Australia.
 12. Buitrón G., **Moreno-Andrade I.**, Betancur M.J., Moreno J.A. (2005). Biodegradation of toxic wastewaters in an optimally controlled discontinuous reactor. 78th annual technical exhibition and Conference of the Water Environmental Federation (WEFTEC.05). 29/10-02/11/2005. Washington, DC., USA.
 13. Buitrón G., Canziani R., Torrijos M., Gutiérrez S., **Moreno-Andrade I.**, Mazouni D., Fiocchi N., Ficara E., Moreno G., Benitez A., Pérez J., Ferrari A. (2006). Experiments for modelling the biodegradation of wastewater in sequencing batch reactors. 5th MATHMOD. 8-10/02/2006, Viena, Austria.
 14. **Moreno-Andrade I.**, Linares-García J. A., Pérez J., Betancur M.J., Moreno J. A., Buitrón G. (2006). Evaluation of an optimal fill strategy to biodegrade inhibitory wastewater in an industrial-prototype discontinuous reactor. 7th IWA Specialty Conference on Small Water and Wastewater Systems. 7-10/03/2006. México D.F., México.
 15. Buitrón G., **Moreno-Andrade I.**, Betancur M.J., Moreno J. A. (2006). Optimal biodegradation of phenolic wastewaters in sequencing batch reactor. 4^{ème} colloque Sciences et Techniques de l'Information et de la Communication (STIC) & Environnement. 5-7/04/2006. Narbonne, Francia.
 16. Buitrón G., **Moreno-Andrade I.**, Betancur M.J., Moreno J. A., (2006). Degradation of High 4-chlorophenol Concentrations with an Automated Fed-batch Bioreactor. 5th International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. 22-25/05/2006. Monterey, California, USA.

-
17. Buitrón G., **Moreno-Andrade I.**, Linares-García J.A., Betancur M.J., Moreno J. A., (2006). Industrial Field Scale Sequencing Batch Bioreactor for the Toxic Wastewater Degradation. 5th International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. 22-25/05/2006. Monterey, California, USA.
 18. **Moreno-Andrade I.**, Betancur M.J., Moreno J. A., Buitrón G. (2006). Long term stability of an automated SBR degrading a phenolic compound. 2nd International Water Conference. 12-14/06/2006. Porto, Portugal.
 19. Buitrón G., **Moreno-Andrade I.**, Perez J., Betancur M.J., Moreno J.A. (2006). Optimal biodegradation of hazardous phenol concentrations in municipal wastewater using and controlled Sequencing Batch Reactors. 5^h IWA World Water Congress. 11-14/09/2006. Beijing, China.
 20. **Moreno-Andrade I.**, López-Vidal Y., Buitrón G. (2006). Effect of the starvation in the activity and viability of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 acclimated to degrade 4-chlorophenol in a discontinuous reactor. 5^h IWA World Water Congress. 11-14/09/2006. Beijing, China.

Artículos en congresos nacionales

1. **Moreno Andrade I.**, Martínez T.D., Buitrón G. (2003). Variación de la actividad microbiana durante la aclimatación al 4-clorofenol. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 8-12/09/2003, Pto. Vallarta, Jalisco.
2. **Moreno Andrade I.**, Buitrón G. (2004). Evolución de la actividad de los microorganismos en los procesos de aclimatación y desaclimatación al 4-clorofenol. XIV Congreso de Ingeniería Ambiental y Ciencias Ambientales. 12-14/05/2004, Mazatlán, Sinaloa.
3. Buitrón G., **Moreno Andrade I.**, Betancur M.J., Moreno J.A. (2004). Biodegradación de efluentes altamente contaminados por compuestos fenólicos utilizando una estrategia de control óptima. XIV Congreso de Ingeniería Ambiental y Ciencias Ambientales. 12-14/05/2004, Mazatlán, Sinaloa.

-
4. **Moreno Andrade I.**, Buitrón G. (2005). Variación de la actividad de los microorganismos degradadores de compuestos fenólicos debida al ayuno. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 17-22/09/2003, Mérida, Yucatán.
 5. **Moreno Andrade I.**, Betancur M.J., Pérez J., Jiménez L., Moreno J.A., Buitrón G. (2005). Degradación de altas concentraciones de compuestos fenólicos en un biorreactor discontinuo con alimentación óptimamente controlada. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 17-22/09/2003, Mérida, Yucatán.
 6. Betancur M.J., Moreno J.A., Buitrón G., **Moreno Andrade I.** (2004). Control y mejoras en biorreactores para tratar aguas residuales tóxicas. Congreso Anual de la Asociación de México de Control Automático. 20-22/10/2004, México, Distrito Federal.
 7. Buitrón G., Moreno J.A., **Moreno Andrade I.**, Betancur M.J., Vargas A. (2005). Control óptimo de biorreactores aerobios para el tratamiento biológico de aguas residuales industriales inhibitorias. Taller Nacional preparatorio al IV foro mundial del agua. 5-7/09/2005, Jiutepec, Morelos.
 8. **Moreno Andrade I.**, Pérez J., López Vidal Y., Buitrón G. (2006) Actividad y viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa* durante la degradación de 4-clorofenol. XV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. 24-26/05/2006, Guadalajara, Jalisco.
 9. Pérez J., **Moreno Andrade I.**, Betancur M.J., Moreno J.A., Buitrón G. (2006) Tratamiento biológico de aguas residuales contaminadas con altas concentraciones de fenol. XV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. 24-26/05/2006, Guadalajara, Jalisco.