

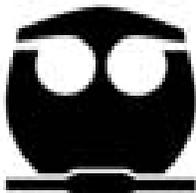


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE FENOL EN AGUA
Y AGUAS RESIDUALES DE REFINERÍA,
EMPLEANDO REACTORES DE FLUJO
CERRADO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
I N G E N I E R A Q U Í M I C A
P R E S E N T A :
SANDRA HERMOSO BERRUECOS



MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



RECONOCIMIENTOS

Esta tesis contó con el apoyo económico otorgado, para la compra de reactivos y materiales, por parte de los proyectos PAIP 6190-14 (FQ-VMLP, 2007 y 2008), DGAPA/PAPIME clave: PE 205706 **“Desarrollo de prácticas avanzadas para la enseñanza de la microbiología ambiental”** y DGAPA/PAPIIT clave IN215006-3 **“Determinación de la capacidad desinfectante de aguas residuales domésticas usando agregados minerales naturales y artificiales conteniendo plata”**.





AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

Dios, por permitirme concluir una etapa importante de mi vida.

Mis padres Jaime y María de la Luz, por todo su amor, apoyo, confianza y comprensión que me brindaron y me siguen brindando.

Mis hermanas, por la manera en que me apoyan siempre.

A toda mi familia, abuelos, tíos, primos, sobrinos, etc.

Mis Grandes amigas casi mis hermanas, Janeth, Diana, Mabel, Priscila, Natalia que siempre estuvieron dándome ánimos para seguir.

A mis amigos con los que camine para llegar hasta aquí, Elena, Jhon, Sergio, Gilberto, Gustavo

A **Alejandro**, mi compañero, el que me ayuda, protege, apoya, que esta conmigo.

Al Doctor Víctor Manuel Luna Pabello por la dirección, asesoría y gran apoyo en este trabajo de titulación. Y también por su comprensión y ayuda para agilizar los trámites correspondientes.

A la Maestra Lupita, a los Maestros Luciano y Ernesto, por el apoyo y consejo para la realización del presente ejemplar.





JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Rodolfo Torres Barrera
Vocal: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
Secretario: Dr. Rodolfo Ruiz Trejo
1er Suplente: Dra. Maria de los Ángeles Vargas Hernández
2o Suplente: Dr. Alfonso Durán Moreno

La presente tesis de licenciatura se realizó en el laboratorio de Microbiología Experimental. Departamento de Biología, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Luciano Hernández Gómez

SUSTENTANTE:

Sandra Hermoso Berruecos





ÍNDICE	i
Resumen	iii
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Objetivos y estrategia de trabajo	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos particulares	2
2.3 Estrategia de trabajo	3
Capítulo 3. Marco teórico	4
3.1 Importancia del agua	4
3.2 Aguas residuales en la refinación de petróleo	5
3.3 Métodos para el tratamiento de aguas	13
3.3.1 Tratamientos biológicos	13
3.3.2 Planta de tratamiento de aguas residuales	16
3.3.3 Proceso de oxidación biológica	18
3.3.4 Reacciones bioquímicas	18
3.3.5 Factores que intervienen en la oxidación biológica	19
3.4 Aspectos microbiológicos	21
3.4.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	22
3.5 Generalidades de los compuestos fenólicos	24
3.5.1 Fenol	28
3.5.2 Usos y procedencia de fenol	30
3.6 Cinética química y reactores	33
3.6.1 Cinética de la degradación de la materia orgánica	39
3.7 Lagunas de oxidación	41
3.7.1 Seguridad en lagunas de oxidación	42
Capítulo 4. Metodología Experimental	43
4.1 Materiales y métodos	43
4.1.1 Obtención de microorganismos para la degradación	43
4.1.2 Agua y agua residual de refinería enriquecida con fenol	43
4.1.3 Reactores de flujo cerrado	44





4.1.4 Condiciones de operación para los reactores	44
4.1.5 Reactores	45
4.1.6 Técnicas y equipos usados para la determinación de los parámetros analizados	45
Capítulo 5. Etapas experimentales	46
5.1 Primera etapa experimental	47
5.1.1 Primera concentración 975 mg/L	47
5.1.2 Segunda concentración 475 mg/L	47
5.1.3 Agua residual de refinería	48
5.1.4 Análisis microbiológicos	48
5.1.5 Estudio de crecimiento de la cepa	49
5.1.6 Análisis y discusión de resultados, de la primera etapa experimental	52
5.1.7 Conclusiones de la primera etapa experimental	55
5.2 Segunda etapa experimental	55
5.2.1 Análisis y discusión de resultados, de la segunda etapa experimental	56
5.2.2 Conclusiones de la segunda etapa experimental	58
5.3 Tercera etapa experimental	58
5.3.1 Agua residual de refinería esterilizada	59
5.3.2 Análisis y discusión de resultados, ARR esterilizada	58
5.3.3 Agua residual de refinería sin esterilizar	60
5.3.4 Análisis y discusión de resultados, ARR sin esterilizar	60
5.3.5 Cinética de reacción	62
5.3.6 Conclusiones de la tercera etapa experimental	63
5.4 Análisis de costos por el concepto de energía eléctrica	63
Capítulo 6. Conclusiones generales	65
Referencias	66
Glosario	72
Anexo 1	76
Anexo 2	91







RESUMEN

El objetivo principal de este proyecto fue, evaluar la degradación de fenol en aguas y aguas residuales de refinería, utilizando una cepa bacteriana pura, con suministro continuo e intermitente de aire en reactores de flujo cerrado. Lo anterior, con la finalidad de obtener datos para el cálculo de la cinética de remoción de fenol, bajo condiciones experimentales previamente establecidas.

El plan de trabajo a desarrollar incluyó, la degradación de diferentes concentraciones de fenol por cada una de las seis cepas puras por separado y en función de los resultados, elegir la cepa con mejor actividad degradadora de fenol. En etapas subsecuentes, empleando la cepa preseleccionada, a una temperatura constante de 28 °C, se evaluó durante un periodo de 24 horas la biodegradación de 100 mg/L fenol, teniendo como variable de estudio el suministro continuo o intermitente de aire. También se hizo la degradación de fenoles contenidos en aguas residuales de refinería, previa adición complementaria de fenoles que permitiera lograr una concentración de 100 mg/L, los experimentos se realizaron bajo condiciones experimentales similares a las descritas anteriormente.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la primer parte experimental, se observó que la cepa bacteriana que tuvo mejor respuesta para la degradación de fenol contenido en aguas residuales de refinería fue la *Pseudomonas fluorescens*. Las condiciones en las que se logró la mayor remoción, según lo





observado en la segunda y tercera etapas experimentales fueron, en el reactor alimentado por lote con aguas de refinería sin esterilizar y un suministro de aire intermitente a 28 °C. Por lo tanto, se concluye que el tratamiento con cepas bacterianas puras en un reactor a flujo cerrado con suministro de aire húmedo intermitente es un sistema que proporciona resultados altos de remoción de fenol. El porcentaje de remoción de fenol en ARR sin esterilizar fue de 98 %.





Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

La demanda, la reutilización y las nuevas reglamentaciones ambientales nacionales e internacionales, hacen necesaria la modificación de los tratamientos de aguas residuales. Asimismo, se enfatiza la necesidad de contar con información específica referente a la posibilidad o no de biodegradar ciertos compuestos contenidos en esas aguas residuales, especialmente los de tipo aromático. Por ejemplo, benceno, tolueno, xileno, fenoles, cresoles, aminas, naftalenos, antracenos, así como sus derivados halogenados, nitrados y sulfurados, que tienen como particularidad una elevada estabilidad y toxicidad (Canul, 2006).

De manera particular, las aguas con contenidos fenólicos en diversas actividades industriales y agrícolas, debido a su toxicidad y a las propiedades bactericidas, no pueden ser tratadas fácilmente en plantas depuradoras biológicas convencionales (Estrada, 2006). Por lo anterior, con el presente trabajo, se pretende contribuir al entendimiento del fenómeno de biodegradación de fenoles en sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales (Guillén, 2001) como los actualmente empleados en refinerías nacionales. Ejemplo de ello son las lagunas de oxidación, las lagunas de estabilización y los sistemas de lodos activados.





Capítulo 2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO.

2.1 Objetivo General

- ❖ Evaluar la degradación de fenol en aguas y aguas residuales de refinería (**ARR**), utilizando una cepa bacteriana pura, con suministro continuo y combinado de aire húmedo, en reactores de flujo cerrado.

2.2 Objetivos Particulares

- ❖ Seleccionar, de entre seis cepas bacterianas puras, la que presente mejor actividad degradadora al fenol en solución acuosa.
- ❖ Evaluar, durante 24 horas, en agua corriente, la degradación de 100 mg/L de fenol empleando la cepa preseleccionada, a una temperatura de 28 °C, con aireación húmeda continua y combinada.
- ❖ Evaluar, durante 24 horas, la degradación de fenoles contenidos en aguas residuales de refinería **ARR** (esterilizadas y sin esterilizar), previa adición de fenol para lograr una concentración de 100 mg/L de fenol empleando la cepa preseleccionada, a una temperatura de 28 °C, con aireación húmeda continua y combinada.





2.3 Estrategia de trabajo

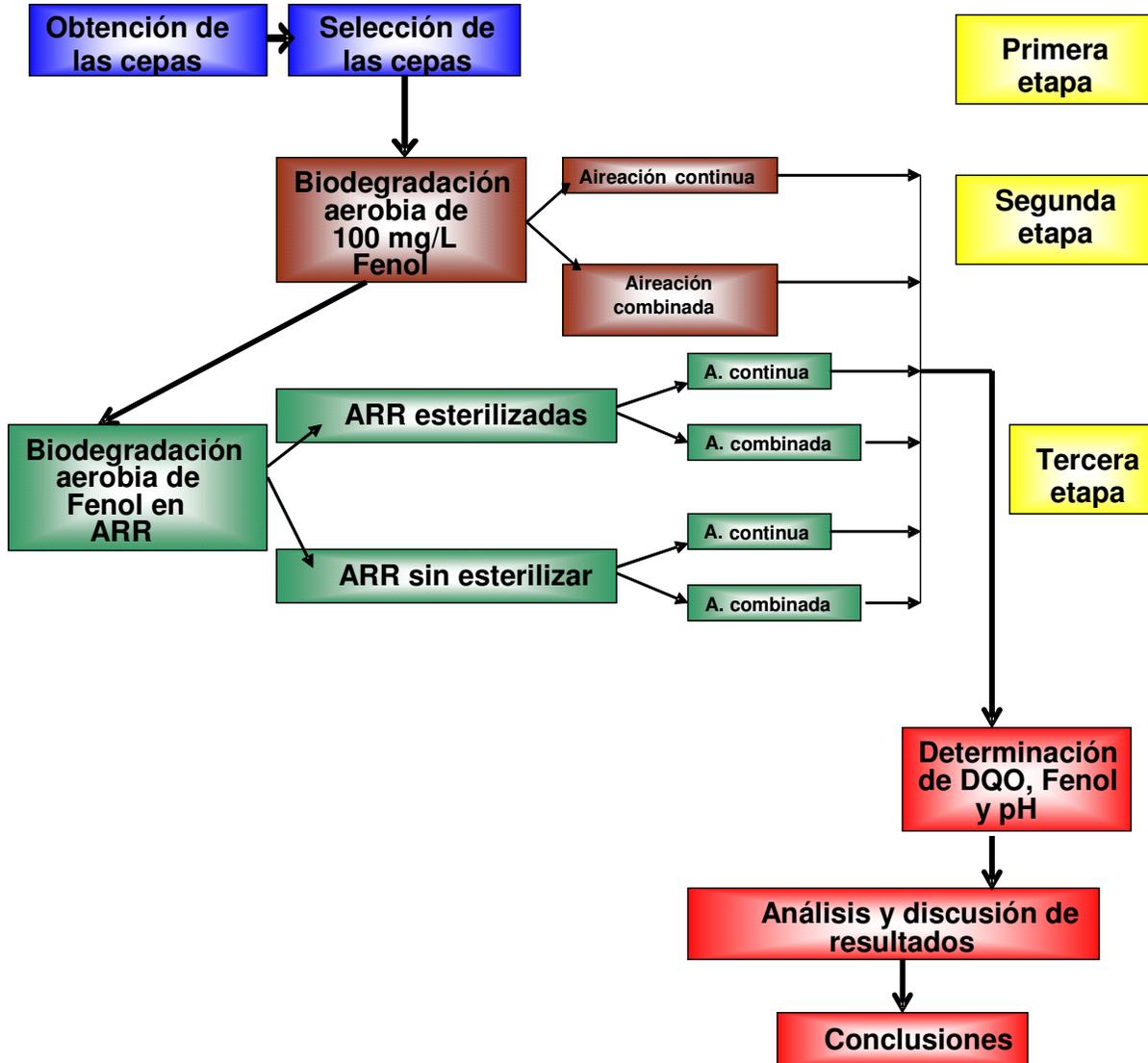


Figura 2.1 Diagrama de flujo de la metodología experimental





Capítulo 3. MARCO TEÓRICO

Para un mejor entendimiento de la tesis; la problemática seleccionada y los aspectos más relevantes de la misma, se presentan en este capítulo. En primer lugar, se abordará el tema de la contaminación del agua. En segundo lugar, se describirá la problemática asociada a la contaminación del agua por fenoles, derivado de las actividades de refinación de petróleo. Asimismo, se describirán los parámetros más importantes en el tratamiento biológico de las aguas residuales. Posteriormente, se abordarán de manera breve los aspectos más sobresalientes relacionados con reactores y cinética química.

3.1 Importancia del agua

La generación de residuos en un medio, que se introducen por encima de la capacidad, de éste para eliminarlos, se llama en una sola palabra “Contaminación”. La contaminación no depende del tipo de residuo sino de la acumulación de éste mismo, que supone un desequilibrio grave en el biosistema, hasta el punto de llegar a imposibilitar la vida de las especies existentes.

De manera particular, el agua es un recurso escaso, de importancia vital para la sociedad y la naturaleza, ya que forma parte de la estructura de todos los seres vivos. El agua es un recurso que proporciona energía y vida. De todo lo disponible, el 80% del agua se utiliza en la agricultura de riego, el 14% lo utiliza la industria y el





6% restante se utiliza para consumo doméstico. Frecuentemente, una parte importante del agua disponible se pierde a causa de su mala conducción. Se puede perder hasta el 40% del total embalsado. El agua de las ciudades y de la industria, pero también en algunos casos de la agricultura, está contaminada por productos difícilmente degradables, como los aceites o los detergentes. Algunos de estos productos se vierten en los ríos, con lo que se disminuyen las proporciones de oxígeno; productos veneno para algunas especies que viven en el agua, o que la utilizan, es el caso de la contaminación por mercurio y otros metales pesados. Debido a las dimensiones de la contaminación de agua, han llegado a perjudicar gravemente, mares enteros, comprometiendo el equilibrio ecológico de ellos, de su entorno y de todo el planeta.

3.2 Aguas Residuales en la Refinación de Petróleo

La función del área de Refinación de Petróleos Mexicanos, es la producción de carburantes para automotores, como gasolina, turbosina y diesel, además de producir asfaltos, parafinas, azufre, solventes, aceites y productos básicos para la Petroquímica. Todos estos productos son extraídos del petróleo crudo.

En todas las instalaciones industriales, se usa agua en mayor o menor cantidad para sus diferentes servicios, en PEMEX-REFINACIÓN se utiliza en los siguientes servicios:

a) Enfriamiento y condensación de los productos,





- b) Generación de vapor para proceso,
- c) Generación de vapor para la producción de energía eléctrica,
- d) Contra incendio,
- e) Proceso,
- f) Servicios sanitarios y otros usos.

En PEMEX-REFINACIÓN se requiere siempre de grandes volúmenes de agua, teniendo una demanda de 1.7 barriles de agua por cada barril procesado. Actualmente, el volumen que se procesa es de 1.3 millones de barriles por día (un barril es igual a 159 litros). El agua que se utiliza en Refinerías, en su mayor parte es superficial y procede de ríos, lagunas y presas, también se utiliza agua subterránea que se extrae por medio de pozos profundos. En la actualidad se están utilizando aguas negras tratadas y aguas industriales de desechos de las mismas Refinerías, estas últimas son tratadas y regresadas al mar o a los ríos.

Se debe mencionar que PEMEX-REFINACIÓN es autosuficiente con respecto a su consumo de energía eléctrica, para la operación total de sus plantas en la extracción de los productos antes mencionados, así como del movimiento de éstos hasta su entrega a los centros de consumo.

El orden de importancia y la cantidad de agua que es utilizada en las instalaciones de PEMEX-REFINACIÓN, es la siguiente:

- 1.- Agua para enfriamiento 65 %





- 2.- Generación de vapor 15 %
- 3.- Agua para proceso 10 %
- 4.- Contraincendio e hidrosanitarios 10 %

Las corrientes de agua de desecho que se producen, cuando no son reutilizables, se tratan antes de enviarlas a los cuerpos receptores para cumplir con las Normas Ecológicas que especifican las Condiciones Particulares de Descarga fijadas para cada centro de trabajo. Esto ha sido una tarea difícil y costosa para PEMEX-REFINACIÓN, ya que anteriormente toda el agua de desecho que se producía en las instalaciones, como purgas tanto de torres de enfriamiento como de calderas, agua de proceso, lavado de equipos y aguas aceitosas, se recibían en los Separadores A.P.I. (American Petroleum Institute), cuya función es la de separar y recuperar aceite e hidrocarburos presentes en las corrientes para su reproceso. Los Separadores A.P.I., son fosas especialmente construidas y acondicionadas para que el agua de desecho pase a una velocidad muy baja, que permite la separación del aceite por gravedad, además de contar con otros auxiliares que hacen más eficientes la separación, hasta obtener valores menores de 100 partes por millón de aceite. **Actualmente a los separadores A.P.I. se les han acondicionado lagunas de oxidación y de estabilización, seguidas de las plantas de tratamiento secundario y terciario, en donde se eliminan sulfuros, fenoles e hidrocarburos.**

En los años en que fueron diseñadas y construidas las Refinerías,





en ningún otro lugar del mundo, existía la preocupación por los aspectos ambientales. PEMEX planteo Refinerías con base a las Normas Ecológicas expedidas en el año de 1973.

En 1980 se registraron las descargas de desechos, fijándose para esta fecha solamente cinco parámetros que deberían cumplirse, éstos fueron:

- 1.- pH
- 2.- Temperatura
- 3.- Grasas y aceites
- 4.- Sólidos sedimentables
- 5.- Materia flotante

Para 1984, se fijaron condiciones particulares de descarga, en las cuales además de los cinco Parámetros ya fijados, se incluyeron los siguientes:

- 6.- DBO-5
- 7.- Nitrógeno amoniacal
- 8.- Plomo
- 9.- Mercurio
- 10.- Fenoles
- 11.- Conductividad
- 12.- Color
- 13.- Bacterias coliformes

Por la forma que se manejaban los efluentes de desecho, no era





posible cumplir con los valores fijados a los Parámetros establecidos, presentándose la necesidad de aplicar tratamientos específicos de acuerdo a las características de cada corriente de desecho, y de aquí surge la necesidad de separar las corrientes de acuerdo a sus características fisicoquímicas. De esta manera, se puede implementar a cada corriente el tratamiento requerido, siendo más fácil y menos costoso, que el tratamiento de la totalidad de las corrientes para su reutilización o para que se viertan en los cuerpos receptores, **ya que es más sencillo eliminar sulfuros o fenoles en una pequeña descarga, que en el conjunto de los efluentes;** también las instalaciones para separar aceite de las aguas aceitosas serán más pequeñas, eficientes y menos costosas, si se agrupan solamente a las corrientes que contienen aceite, debido a que cuando todos los efluentes se reciben en los Separadores A.P.I., se puede sobrepasar la capacidad de diseño, y con ello, se dificulta la separación y recuperación del aceite, ocasionando que se pase aceite hacia las fosas de oxidación y estabilización.

En el caso de las corrientes que se producen en la regeneración de las resinas de intercambio iónico de las plantas desmineralizadoras, en donde se utiliza ácido sulfúrico y sosa cáustica diluidos, parte de los efluentes se neutralizan y se usan como repuesto para las Torres de Enfriamiento, el restante que está altamente concentrado en sales con ácido y sosa se neutraliza antes de ser desechado.

En la refinación de los hidrocarburos, en algunos procesos, se





producen las llamadas aguas amargas, las que reciben ese nombre por contener altos valores de ácido sulfhídrico, sulfuros y mercaptanos, estas corrientes se someten a tratamientos en los que se eliminan o reducen los compuestos de azufre contaminantes, y el agua es reutilizada nuevamente en otros servicios, como el desalado del petróleo crudo. Al separar y tratar a cada corriente de desecho, se ha conseguido hacer menos costosos los tratamientos y dar una mayor reutilización a las aguas tratadas.

Las corrientes principales que se han podido separar son las siguientes:

- 1.- Purga de torre de enfriamiento
- 2.- Purga de calderas
- 3.- Enjuagues y retrolavados de plantas desmineralizadoras
- 4.- Regenerantes desgastados
- 5.- Retrolavados y enjuagues de filtros
- 6.- Aguas contaminadas de proceso
- 7.- Agua de lluvia
- 8.- Agua de servicios sanitarios

Es conveniente que toda instalación industrial, deba contar con los siguientes drenajes para poder desde un principio segregar sus efluentes:

- 1.- Drenaje pluvial
- 2.- Aguas negras
- 3.- Desechos industriales y aceitosos





4.- Desechos peligrosos o corrosivos

En la actualidad se cuenta con la tecnología para tratar cualquier corriente de las que se han mencionado, **para que ésta sea reutilizada como agua de suministro o de la calidad deseada**, dentro de la tecnología podemos mencionar a continuación las más importantes o usuales.

- a) Ósmosis inversa
- b) Electrodialisis
- c) Centrifugación para eliminación de sólidos del agua
- d) Centrifugación para eliminación de sólidos y aceite del agua
- e) Intercambio iónico
- f) Evaporación

La razón que se argumenta es que los drenajes industriales no pueden separarse, pero cada una de las plantas si está separada y puede en un momento dado enviar su corriente de agua a un tratamiento específico, permite lograr estudios de tratabilidad de cada una de las corrientes para su reuso y no para dar un agua dentro de los rangos establecidos en los parámetros ecológicos, y posteriormente se tenga que tirar a los cuerpos receptores.

La Segregación de efluentes para su reuso, debe ser la meta de todo centro de trabajo, dado que el agua es cada día más escasa y además cara (Rodríguez, Errasquin y Pérez, 2002)





El proceso intensivo de la industria petroquímica está demandando cambios en la gestión medioambiental, para proteger el agua, el suelo y la atmósfera de contaminantes procedentes de las refinerías. Las refinerías de petróleo usan relativamente grandes volúmenes de agua, especialmente en procesos de refrigeración. De hecho, las aguas residuales de la industria petroquímica contienen generalmente productos químicos peligrosos, como los hidrocarburos, el fenol o amoníaco entre otros que se muestran en la tabla 3.1

Tabla 3.1 Cantidades aproximadas de productos químicos peligrosos en las descargas de aguas de refinerías de petróleo

Contaminación	Cantidades Aproximadas
Sistemas de refrigeración	3,5-5 m3 de agua residual generada por tonelada de petróleo bruto
aguas residuales contaminadas	DBO 150-250 mg/L COD 300-600 mg/L fenol 20-200 mg/L aceite 100-300 mg/L (agua del desalter) aceite 5000 mg/L en el fondo del tanque benceno 1-100 mg/L metales pesados 0,1-100 mg/L
Residuos sólidos y lodos	3 a 5 kilogramos por tonelada de petróleo bruto (80 % se debería considerar como desechos peligrosos debido a la presencia de metales pesados y sustancias orgánicas tóxicas)
Emisiones de COV	0,5 a 6 kg/ton petróleo bruto
Otras emisiones	BTX (benceno, tolueno y xileno) 0,75 a 6 g/ton de petróleo bruto Óxidos de sulfuro 0,2-0,6 kg/ton de petróleo bruto Óxidos del nitrógeno 0,006-0,5 kg/ton de petróleo bruto





3.3 Métodos para el tratamiento de aguas residuales

De acuerdo con los principios básicos de purificación, las sustancias contaminantes se pueden eliminar mediante los siguientes métodos:

Mecánicos. Son los más sencillos de realizar y se utilizan únicamente para la eliminación de partículas suspendidas, incluyendo operaciones de filtración y clarificación.

Fisicoquímicos. Se usan en el tratamiento de aguas de desecho por medio de flotación, coagulación y floculación de partículas finas suspendidas, así como la extracción con solventes y adsorción.

Térmicos. Son empleados cuando se tienen flujos o cantidades pequeñas y concentraciones altas, también se le conoce como incineración.

Químicos. Están basados en la formación de productos menos tóxicos, por medio de reacciones de oxidación, reducción, condensación y neutralización.

Biológicos. Consisten en la degradación orgánica e inorgánica en presencia o ausencia de oxígeno (proceso aerobio y anaerobio). (Aguilar, 1998).

3.3.1 Tratamientos biológicos

El tratamiento biológico ha sido utilizado eficientemente en la depuración de aguas residuales que contienen compuestos orgánicos peligrosos. Sin embargo los compuestos tóxicos como el fenol contribuyen con la inestabilidad de los sistemas de tratamientos biológicos de aguas residuales, ya que estos compuestos también son





usados como fuentes de carbono y energía por ciertos grupos de microorganismos (Ruiz-Ordaz, 2001).

La degradación de los compuestos fenólicos puede ser llevada a cabo por microorganismos procariotas y eucariotas, tanto en condiciones aeróbicas (oxígeno como aceptor final de electrones) como anaeróbicas (nitrato, sulfato, iones metálicos o dióxido de carbono como aceptores finales de electrones). En este sentido, algunos investigadores han demostrado que cultivos de *Pseudomonas sp.* y *Spirillum sp.*, degradan fenol en ausencia de oxígeno libre. También ha sido reportada la fermentación metanogénica de fenol bajo estas condiciones de oxigenación (Altamira, 2005).

Cultivos puros de *Pseudomonas* han mostrado crecimiento sobre fenol, durante la reducción de nitratos (desnitrificación). Existe también la transformación de fenol bajo condiciones de reducción de sulfatos. *Desulfobacterium phenolicum*, por ejemplo, oxida el fenol a CO₂ usando SO₄²⁻ como aceptor final de electrones. Las rutas de biodegradación de fenol pueden diferir con respecto a la temperatura a la cual se realice el proceso (Altamira, 2005).

Los tratamientos biológicos consisten en disminuir el contenido en materia orgánica de las aguas residuales, el contenido en nutrientes y eliminar los patógenos y parásitos. Una ventaja es que los costos pueden ser menores que otras tecnologías, y una desventaja es la duración del tiempo experimental implicado (Guillén, 2001).





La principal división entre los procesos biológicos para el tratamiento de las aguas residuales, se hace con base en la forma en que los microorganismos utilizan el oxígeno. Así el proceso puede ser aerobios (requieren oxígeno) o anaerobios (requieren ausencia total de oxígeno).

Existen muchos reportes acerca del uso de la degradación por bacterias aerobias en la biorremediación. Estas bacterias incluyen, la bacteria metano-oxidativas, bacterias propano-oxidativas y bacterias degradantes de tolueno y fenol (Canul, 2006). Las bacterias tienen el potencial de degradar los agentes contaminantes, esta capacidad de oxidar todo tipo de hidrocarburos, en forma líquida, gaseosa o sólida de series alifáticas, olefínicas, aromáticas y nafténicas; facilita que el compuesto sea removido del ambiente. La mayoría de los compuestos orgánicos tóxicos pueden ser biodegradables, aunque algunos se degradan lentamente. La biodegradación se efectuará más fácilmente si la biomasa se aclimata a los compuestos tóxicos (Estrada, 2006).

En los ecosistemas, la degradación completa de los contaminantes del petróleo, generalmente se lleva a cabo por poblaciones microbianas mixtas más que por una sola especie, los comúnmente usados son los lodos activados. En la mayoría de los ecosistemas naturales, el inóculo inicial de microorganismos que se utiliza para degradar los hidrocarburos, limita la tasa de degradación del mismo, aunque después de un corto período de exposición aumenta dicha tasa, ya que las bacterias comienzan a utilizar su maquinaria bioquímica que les permite metabolizarlos (Díaz-Borrego, 2005).





3.3.2 Planta de tratamiento de aguas residuales.

Cuando las aguas residuales entran a una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), sufren un pre-tratamiento en el que se retiran los sólidos de gran tamaño, así como las arenas y grasas. Posteriormente, el agua pasa al denominado tratamiento primario, donde se eliminan sólidos en suspensión fácilmente sedimentables y parte de materia orgánica.

La material orgánica que queda disuelta y en suspensión así como el resto de las partículas sólidas que no se han eliminado en los tratamientos anteriores, son eliminadas mediante los denominados “Procesos Biológicos”, estos pueden ser aerobios o anaerobios y comúnmente son denominados como tratamientos secundarios.

Se puede definir a los “Procesos Biológicos Aerobios”, como aquellos realizados por determinado grupo de microorganismos (principalmente bacterias o protozoos) que en presencia de oxígeno, actúan sobre la materia orgánica e inorgánica disuelta, suspendida y coloidal existente en el agua residual, transformándola en gases y materia celular que puede separarse fácilmente mediante sedimentación. La unión de materia orgánica, bacterias y sustancias minerales forma los flóculos y el conjunto de flóculos es lo que se conoce como **lodo biológico**.

Los objetivos que persigue este tipo de tratamiento son la transformación de la materia orgánica y la coagulación y eliminación de los sólidos coloidales no sedimentables.





En el caso de algunas aguas residuales urbanas, también se persigue la eliminación de nitrógeno y de fósforo. Por último, se consigue también la disminución de los microorganismos patógenos y fecales presentes en el agua residual.

Existen dos tipos de tratamiento biológico aerobios: Procesos de Biomasa en Suspensión (Lodos Activados) y Procesos de Biomasa Fija (Biopelícula).

El sistema de tratamiento de aguas residuales con biomasa en estado suspendido, llamado lodos activados, que utiliza una gran variedad de microorganismos capaces de remover materia orgánica presente en el agua, involucra la generación de una masa suspendida de bacterias en un reactor. El agua residual entra al reactor en el que se encuentra un cultivo de microorganismos constituido principalmente por bacterias en suspensión, las cuales en conjunto se les conoce como licor mezclado, y se mantienen un determinado tiempo, hasta que el licor mezclado pasa a un tanque de sedimentación secundaria, donde se realiza la separación del agua tratada. Ésta sale por la parte superior del tanque y los microorganismos y otros productos de la degradación se separan en forma de flóculos. Una parte de la biomasa sedimentada se retorna al tanque de aireación o reactor para mantener una concentración deseada de sólidos suspendidos totales (microorganismos) en el licor mezclado, y la otra parte se retira del sistema como desecho, denominado lodo residual (Canul, 2006).





3.3.3 Proceso de oxidación biológica

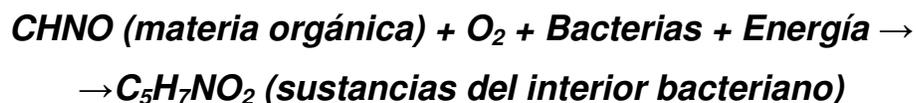
La oxidación biológica es el mecanismo mediante el cual los microorganismos degradan la materia orgánica contaminante del agua residual. De esta forma, estos microorganismos se alimentan de dicha materia orgánica en presencia de oxígeno y nutrientes, de acuerdo con la siguiente reacción:



Para que lo anteriormente expuesto se produzca, son necesarias dos tipos de reacciones fundamentales totalmente acopladas: de síntesis o asimilación y de respiración endógena u oxidación.

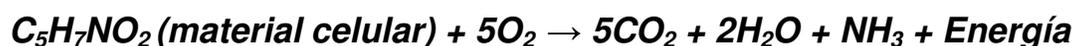
3.3.4 Reacciones bioquímicas

Reacciones de síntesis o asimilación. Consisten en la incorporación del alimento (materia orgánica y nutrientes), al interior de los microorganismos reproduciéndose rápidamente. Parte de este alimento es utilizado como fuente de energía. La reacción que ocurre es la siguiente:





Reacciones de oxidación y respiración endógena. Los microorganismos al igual que nosotros, necesitan de energía para poder realizar sus funciones vitales (moverse, comer etc.), dicha energía la obtienen transformando la materia orgánica asimilada y aquella acumulada en forma de sustancias de reserva en gases, agua y nuevos productos de acuerdo con la siguiente reacción:



Como se puede observar, después de un tiempo de contacto suficiente entre la materia orgánica del agua residual y los microorganismos (bacterias), la materia orgánica del medio disminuye considerablemente transformándose en nuevas células, gases y otros productos. Este nuevo cultivo microbiano seguirá actuando sobre el agua residual.

A todo este conjunto de reacciones se les denomina oxidación biológica, porque los microorganismos necesitan oxígeno para realizarlas.

3.3.5 Factores que intervienen en la oxidación biológica

Los factores principales que hay que tener en cuenta para que se produzcan las reacciones biológicas y por tanto, la depuración del agua residual son:

1. Características del sustrato. Las características físico-químicas del agua residual, determinan el mejor o peor desarrollo de los microorganismos en este sistema, existiendo compuestos





contaminantes que son degradables biológicamente y otros que no lo son.

2. Nutrientes. El interior celular, aparte de C, H y O, elementos característicos de la materia orgánica, contiene otros elementos como son el N, P, S, Ca, Mg etc., denominados nutrientes y que a pesar de que muchos de ellos se encuentran en el organismos sólo en pequeñas proporciones, son fundamentales para el desarrollo de las síntesis biológica. Se ha determinado a nivel medio que los microorganismos para sobrevivir necesitan por cada 1000 g de C, 43 de N y 6 de P, y que en las aguas residuales urbanas existen por cada 1000 g de C, 200 g de N y 16 g de P. Por lo que se puede concluir que los microorganismos bien pueden desarrollarse en el agua residual perfectamente.
3. Aportación de oxígeno. Se ha visto que para el desarrollo de las reacciones biológicas es necesario un medio aerobio, es decir, con oxígeno suficiente para que permita el desarrollo y la respiración de los microorganismos aerobios.
4. Temperatura. A medida que aumenta la Temperatura, aumenta la velocidad con que los microorganismos degradan la materia orgánica, pero a partir de los 37°C dichos organismos mueren.
5. Salinidad. El contenido en sales disueltas no suelen ser problemático para el desarrollo bacteriano en el proceso de lodos activados hasta concentraciones de 3 a 4 g/L. En los procesos de biomasa fija (biopelícula), la influencia es aún menor, no afectando valores que no superen los 15 g/L. Sin embargo, existen diversos grupos bacterianos capaces de vivir





en aguas saladas, de forma que si a tu sistema de depuración le das tiempo de adaptación, pueden desarrollarse bastante bien dichos grupos microbianos a concentraciones salinas superiores.

6. Tóxicos o inhibidores. Existen una serie de sustancias orgánicas e inorgánicas que, a ciertas concentraciones, inhiben o impiden los procesos biológicos, Este tipo de sustancias, entre las que se encuentran los metales pesados, ejercen un efecto perjudicial sobre los microorganismos encargados de depurar el agua y por tanto, no deben de entrar en las plantas depuradoras con el agua residual, o si entran deben de hacerlo en concentraciones muy bajas.

Los anteriores factores son de gran importancia, y deben de ser controlados si se desea obtener un rendimiento eficaz de depuración por parte de los microorganismos encargados de degradar la materia orgánica y otros contaminantes del agua residual.

3.4 Aspectos microbiológicos

Las *pseudomonas* son bacilos Gram negativos, de 0.5-1.0 x 1.5-5.0 μm , aereobias estrictas, oxidasa positivas, catalasa positivas, usualmente móviles (tienen flagelos polares), no forman esporas, no fermentan carbohidratos, en general producen pigmento hidrosoluble (*Pseudomonas aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*), reducen nitratos a nitritos, oxidan glucosa y se observa crecimiento tras 18 a 24 horas de incubación en una variedad de medios (Rojo, 2003).





Tienen amplia distribución en hábitats húmedos, aire, suelo, plantas, frutas, vegetales. La producción de pigmentos es una de las características que agilizan el diagnóstico diferencial de *Pseudomonas*, pero es fundamental la elección correcta del medio de cultivo más adecuado para favorecer la pigmentación de ciertas especies e inhibir esta característica en otras. Se han estudiado algunos aspectos metabólicos en relación a la cromogénesis, cómo la influencia de los compuestos inorgánicos, y la temperatura ambiente, sobre la producción de pigmentos fluorescentes en estas bacterias (Rojo, 2003).

3.4.1 *Pseudomona fluorecens*

Es un bacilo Gram-negativo, recto o ligeramente curvado pero no vibrioide, es saprófito (todo lo que ingiere pasa a través de la pared de su citoplasma). Se puede encontrar en suelo y agua. Es incapaz de formar esporas y crece aeróbicamente. La temperatura óptima para su funcionamiento es de 25-30 °C, aunque puede crecer desde los 5 hasta los 42 °C aproximadamente. No crece bajo condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 4.5$) y necesita preferentemente pH neutro. Tiene movimiento activo en líquido por sus flagelos polares (más de 1). Su pigmento fluorescente (fluoresceína) la hace reaccionar frente a la luz ultravioleta, aunque recién cultivada o después de varios cultivos de laboratorio, puede ser que no reaccione.

Estas *pseudomonas* pueden crecer en un medio mineral con iones de amonio o nitratos y un solo compuesto orgánico que funciona como única fuente de carbono y energía. La ganancia energética es





obtenida por respiración aerobia, no por fermentación y su crecimiento es rápido.

Abundan en la superficie de las raíces, ya que son versátiles en su metabolismo y pueden utilizar varios sustratos producidos por las mismas, pero no establecen una relación simbiótica con la planta.

Una de las características de la *Pseudomonas fluorescens* es su alta capacidad para solubilización del fósforo y la realiza por dos vías: la primera es la producción de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido oxálico, ácido glucónico), que actúan sobre el pH del suelo favoreciendo la solubilización del fósforo inorgánico y liberando el fosfato a la solución del suelo. La otra vía de acción es a través de las fosfatasas que son enzimas hidrolasas (Monoesterasas y Diesterasas fosfóricas) que actúan sobre las uniones ésteres liberando los grupos fosfatos de la materia orgánica a la solución del suelo.

Ambas vías generan una mayor cantidad de fosfatos para ser absorbido por las raíces de las plantas.

Otro aspecto destacable es la posibilidad de que las *Pseudomonas fluorescens* posea la virtud de producir sustancias estimuladoras del crecimiento ya que las *pseudomonas* en general pertenecen a un grupo llamado “estimuladores del crecimiento vegetal” que poseen la propiedad de producir estas sustancias, cuyas principales ventajas son las de estimular la germinación de las semillas, acelera el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios.





Por último, una propiedad complementaria de las *Pseudomona fluorescens* es la de producir ciertas sustancias (antibióticos) que actúan limitando el crecimiento y desarrollo de los patógenos que puede afectar al cultivo.

3.5 Generalidades de los compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos aromáticos que se caracterizan por tener uno o varios grupos hidroxilo unidos directamente al anillo aromático. Por lo general, se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, el fenol.

Los fenoles más sencillos son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión, pero con puntos de ebullición bastante elevados debido a su facilidad para formar enlaces de hidrógeno. Son incoloros, salvo que presenten algún grupo capaz de dotarles de coloración.

La mayor parte de los fenoles, fundamentalmente los más sustituidos, son poco solubles en agua y su solubilidad se ve drásticamente disminuida cuando aumenta la fuerza iónica del medio.

En cuanto a sus propiedades químicas, los fenoles son compuestos de carácter ligeramente ácido, propiedad que los distingue de los alcoholes.

La toxicidad de los compuestos fenólicos aumenta en los derivados sustituidos (Merck, 1983). La toxicidad de los fenoles varía con la posición y el número de sustituyentes en el núcleo aromático (Tabla 3.3). La toxicidad es mayor para los sustituyentes halogenados, siendo





los yodofenoles y bromofenoles más tóxicos que los clorofenoles. En cuanto a la posición relativa, la toxicidad sigue el orden p- > m- > o-, se produce un aumento de capacidad tóxica con el número y el volumen de los sustituyentes, además de un mayor carácter tóxico a los sustituyentes aceptores de electrones frente a los donadores. Se ha comprobado que el aumento de la toxicidad de los clorofenoles con el número de sustituyentes -Cl está relacionado con la difícil biodegradación de estos compuestos (Serra, 2002).

En la tabla 3.4 se observa el posicionamiento de los fenoles de acuerdo a su toxicidad en una lista publicada por la Agencia de Protección Ambiental Americana (EPA) en 1991, esta agencia también ha calificado a los compuestos fenólicos como químicos persistentes y bioacumulativos (PBT). Se ha comprobado que la intoxicación por fenol produce coma, convulsiones, hemólisis, edema cerebral y pulmonar, provocando la muerte por falla respiratoria o shock. La dosis de exposición máxima es 5 mg/L y la dosis letal es 1,5 mg/L.

Para los fenoles clorados resultantes de la cloración en la potabilización de aguas para consumo humano, en particular para el pentaclorofenol la dosis máxima de exposición es 0.0005 mg/L y la dosis fatal es 1 mg. Respecto a los efectos a largo plazo, en células in vitro de mamíferos se han observado mutaciones, lesiones cromosómicas, y efectos en el ADN. Igualmente se encontró que el fenol tiene efectos activadores del cáncer.





En la NOM-CCA-031-ECOL/1993, establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria, actividades agroindustriales, de servicios y el tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal que se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 NOM-CCA-031-ECOL/1993

Parámetros	Límites Máximos Permisibles	
	Promedio Diarios	Instantáneo 40°C (313°K)
Temperatura (°C)		
pH (unidades de pH)	6 a 9	6 a 9
Sólidos sedimentables (ml/L)	5	10
Grasas y aceites (mg/L)	60	100
Conductividad eléctrica (microhos/cm)	5,000	8,000
Aluminio (mg/L)	10	20
Arsénico (mg/L)	0.5	1.0
Cadmio (mg/L)	0.5	1.0
Cianuros (mg/L)	1.0	2.0
Cobre (mg/L)	5	10
Cromo hexavalente (mg/L)	0.5	1.0
Cromo total (mg/L)	2.5	5.0
Fluoruros (mg/L)	3	6
Mercurio (mg/L)	0.01	0.02
Níquel (mg/L)	4	8
Plata (mg/L)	1.0	2.0
Plomo (mg/L)	1.0	2.0
Zinc (mg/L)	6	12
Fenoles (mg/L)	5	10
Sustancias activas al azul de metileno (mg/L)	30	60

Esta norma, aunque no esta vigente, permite darse una idea e los requerimientos que durante algún tiempo le fueron exigidos a la industria, antes de que se elaborara la actual NOM-001-SEMARNAT-1996, en la cual este tipo de compuesto ya no figuran, a pesar de su importancia.

Por otra parte, en la tabla 3.3, se pueden apreciar las constantes fisicoquímicas de los principales compuestos fenólicos, a partir de las





cuales se puede tener una idea clara de su comportamiento en el agua.

Tabla 3.3 Constantes fisicoquímicas de los compuestos fenólicos.

Compuesto	Estructura	P.F., °C	P.E., °C	pK _a	Solubilidad en agua, % (w/w) 25°	log K _{ow}
Fenol		43	181.7	10.0	6.6	1.46
Catecol		105	245.5		66.7	
2-clorofenol		9	175	8.48	<0.1	2.17
3-clorofenol		33	214	9.02	0.26	2.49
4-clorofenol		43	220	9.37	2.71	2.42
2,4-diclorofenol		45	210	7.85	PS	3.12
2,4,6-triclorofenol		70	246	6.00	PS	3.38
2,3,5,6-tetraclorofenol				5.44		
Pentaclorofenol		191	310	5.26	20-25 ppm	5.01
4-cloro-2-metilfenol		46	223	9.12		
4-cloro-3-metilfenol		67	235	9.55	0.4	3.10
2-metilfenol		30.9	191	10.26	S	1.95
3-metilfenol		11.5	202	10.00	PS	2.00
4-metilfenol		35	202	10.26	PS	1.93
2,3-dimetilfenol		75	218	10.50	PS	
2,4-dimetilfenol		27	210	10.58	PS	2.42
2,6-dimetilfenol				10.69	PS	
3,4-dimetilfenol		67	227	10.36	PS	
3,5-dimetilfenol		65	222	10.19	PS	





De manera complementaria, en la tabla 3.4, se pueden observar los compuestos fenólicos acorde con la clasificación proporcionada por la EPA, los que están considerados muy tóxicos, siendo el pentaclorofenol el más tóxico de ellos seguido del fenol.

Tabla 3.4 Compuestos fenólicos clasificados por la E.P.A.

PUESTO	NOMBRE DEL COMPUESTO	PUNTAJE TOTAL
31	Pentaclorofenol	1028
85	fenol	804
94	2,4,6-triclorofenol	780
115	2,4,5-triclorofenol	754
121	2,4-dinitrofenol	735
130	2,4-dimetilfenol	708
143	Tetraclorofenol	662
243	2,4-diclorofenol	507
245	2-clorofenol	493

3.5.1 Fenol

El monohidroxibenceno, C_6H_5OH , conocido genéricamente como fenol, es un compuesto cristalino blanco, que se funde a $41^\circ C$, es un líquido incoloro que hierve a $182^\circ C$. Tiene un olor característico, ataca la piel humana y es un veneno muy potente. Encuentra su uso principal en la fabricación de resinas fenólicas por combinación con formaldehído. Es importante su uso como intermedio en la fabricación de medicamentos, colorantes, hormonas vegetales, entre otros.

El fenol, se puede formar a partir de la descomposición de diversos compuestos oxigenados. Se encuentra entre los productos de la descomposición natural de las proteínas y entre los productos de la descomposición térmica de la hulla, la madera y los esquistos bituminosos. Muchos aceites del cracking del petróleo contienen





fenol, y en la producción de aceites por hidrogenación de la hulla se forma fenol en cantidad considerable. La descomposición de las cadenas laterales de un fenol sustituido, por ejemplo cresol, $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$, bajo la influencia del hidrógeno da fenol. La acción de la mayoría de las sustancias oxidantes sobre el benceno puede dirigirse para formar fenol. Algunos hidroperóxidos se descomponen casi cuantitativamente conformación del fenol y un compuesto carbonilo.

La hidrólisis de bencenos sustituidos negativamente, como bencenos halogenados y ácido bencenosulfónicos, forman fenol. La descomposición de compuestos diazoicos es un método muy empleado en los laboratorios para preparar fenoles sustituidos. Se han descrito otras muchas reacciones para la preparación de fenol.

El fenol fue aislado del alquitrán de hulla en 1834 por **Runge**, quien le dio el nombre de "ácido carbólico", nombre que todavía se usa ocasionalmente. **Laurent** lo obtuvo en forma cristalina en 1841, determinó su composición y le llamó "ácido fenólico". El nombre de "fenol" fue introducido por **Gerhardt**. Antes de 1888, casi todo el fenol se obtenía del alquitrán de hulla, y su principal uso era como desinfectante. En la última década del siglo XIX, el derivado trinitro del fenol (ácido pícrico) adquirió importancia como explosivo. Después de la primera Guerra Mundial adquirió mucha importancia el uso del fenol en resinas fenólicas y la producción natural del fenol fue reemplazada por la síntesis. Los **Estados Unidos** se convirtieron en el productor más importante pues en **1952, 85%** de la producción mundial de fenol se obtenía por procedimientos sintéticos, y en los Estados Unidos se fabricó **75%** del fenol total.





3.5.2 Usos y procedencia de fenol

La mayoría de los compuestos fenólicos que se pueden encontrar en aguas residuales son de origen industrial. Son utilizados en industrias de cuero y textiles, coquerías, refinerías de petróleo, destilerías de alquitrán, síntesis y formulación de pesticidas, fábricas de pasta de papel, plantas de tratamiento de maderas, fábricas de colorantes, etc.

El fenol y sus derivados más simples se utilizan principalmente en la fabricación de polímeros sintéticos y plásticos entre los que se encuentran la baquelita y polímeros similares. Algunos fenoles se utilizan como plaguicidas por su acción herbicida, fungicida e insecticida, lo que provoca su difusión en el medio ambiente a través de las actividades agrícolas y su entrada en la cadena alimenticia.

Antiguamente los fenoles se empleaban como germicidas medicinales y sanitarios, pero su uso se ha eliminado debido a su carácter irritante, que puede llegar a producir necrosis si el contacto es prolongado. Dado su carácter bactericida, se emplean en formulaciones de productos de limpieza y en dentífricos.

La aplicación de ciertos fenoles para la obtención de medicamentos es bien conocida, por ejemplo, el ácido salicílico es el precursor de la aspirina, y el catecol se emplea en la fabricación de guayacol y adrenalina. Igualmente, los fenoles son productos de partida de ciertos ésteres que se emplean en perfumería. Otros se usan para la obtención de sabores, que son de origen natural, o edulcorantes.





Otros fenoles, como el ácido pírico y el diaxonitrofenol, presentan propiedades detonantes, y son de utilidad en ciertos explosivos. La hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno), el pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno), el 4-aminofenol y sus derivados se emplean en fotografía como reveladores por oxidarse muy fácilmente.

Los cresoles butilados son atioxidantes el caucho y estabilizadores para grasas y aceites aislantes, mientras que el 2,4,-triclorofenol se usa en la fabricación de agentes de control de lodos en torres de enfriamiento y en la fabricación de papel. El pentaclorofenol es utilizado en procesos de blanqueado, el etoxilato de nonilfenol se usa en las fábricas de papel, el bisfenol A se utiliza para la manufactura de materiales plásticos duraderos, empaquetamientos de cocina, empastes dentales, y recubrimientos del interior de latas de comidas y bebidas.

Las industrias mencionadas que utilizan fenoles, y algunas otras, originan fenoles como residuos de su actividad. Las industrias petroquímicas y de transformación del carbón descargan fenol, metilfenoles y en general alquilfenoles. Las fábricas de papel y pulpa descargan, a un nivel detectable, metoxifenoles, dihidroxifenoles y p-hidroxivainillil- y siringilfenoles que se producen también en la degradación de la materia natural. Todos estos fenoles pueden dar lugar a sus correspondientes derivados clorados en el proceso de blanqueado de la pasta. Las industrias colorantes pueden descargar fenol, nitrofenoles y dinitrofenoles además de fenoles polinucleares.





El empleo de Cl_2 para evitar el crecimiento de algas y otros microorganismos en las aguas de refrigeración de las centrales eléctricas hace que se encuentren fenoles clorados, que, aunque en concentraciones bajas, suponen grandes cantidades liberadas al medio ambiente debido al volumen de aguas tratadas. Una vez en el medio ambiente los fenoles sufren una dispersión que depende de sus propiedades físico-químicas. Se ha comprobado que la lipofilia de los clorofenoles influyen en su dispersión, la cual viene determinada por procesos de dilución y adsorción. También la filtración en aguas subterráneas depende de la lipofilia.

Los fenoles no se fijan totalmente en el terreno cuando se filtran aguas residuales, por lo que sufren procesos de migración. También se ha comprobado que los compuestos halogenados son más persistentes que los menos halogenados y que la volatilidad del 2-clorofenol favorece su dispersión a través de la atmósfera (Serra, 2002).

De todos los estudios llevados a cabo sobre la presencia de fenoles en el medio ambiente realizados en los últimos años, se ha podido comprobar la presencia de compuestos fenólicos en diferentes tipos de aguas: subterráneas, de río, de mar, potable, de manantial e incluso en precipitaciones de lluvia y nieve.

La descarga al medio ambiente puede dar lugar a la entrada de fenoles en la cadena alimenticia, por ejemplo, se ha encontrado pentaclorofenol, tetraclorofenol y otros compuestos orgánicos halogenados en mejillones.





Esto es que, los peces pueden metabolizar pentaclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,3,4,6-tetraclorofenol en el hígado, excretándolos como glucurónicos.

3.6 Cinética química y reactores

Se entiende por análisis cinético, al estudio de la dinámica de los cambios que ocurren dentro de un reactor. El estudio de la cinética del tratamiento biológico conduce a determinar la velocidad a la cual los microorganismos degradan un residuo o compuesto específico y por tanto suministran la información básica necesaria para desarrollar el tamaño de los reactores. Debido a esto, un análisis cinético es de suma importancia en la elección de los procesos de tratamiento.

Un reactor es una unidad procesadora diseñada para que en su interior se lleve a cabo una o varias reacciones químicas o biológicas. Dicha unidad, esta constituida por un recipiente cerrado o abierto según se requiera, el cual cuenta con líneas de entrada de reactivos (alimentación) y salida de productos, y esta gobernado por un algoritmo de control.

Los reactores químicos tienen como funciones principales:

- a) Asegurar el tipo de contacto o modo de fluir de los reactivos en el interior del recipiente, que garantice un buen mezclado y facilite el desarrollo de las reacciones deseadas.
- b) Proporcionar el tiempo suficiente de contacto entre las sustancias y el catalizador (si existiese), para conseguir el nivel de reacción deseado.





- c) Permitir condiciones de presión, temperatura y composición de modo que la reacción tenga lugar en el grado y a la velocidad deseada, atendiendo a los aspectos termodinámicos y cinéticos de la reacción.

Debido a que el tratamiento del agua residual se efectúa en diferentes tipos de reactores, a continuación se describirán brevemente los más comúnmente utilizados.

Los reactores químicos pueden tener una gran variedad de tamaños, formas y condiciones de operación. Los reactores pueden ser clasificados según su sistema de alimentación y operación (por lotes o continua), por su forma física (de tanque o tubular) o si se prefiere, por el número de fases presentes en el sistema reaccionante (sistema homogéneo o heterogéneo), estas son las clasificaciones más comunes empleadas para dichos equipos.

Existen infinidad de tipos de reactores, y a cada uno responde a las necesidades de una situación en particular, entre los tipos más importantes, más conocidos, y mayormente utilizados en la industria se pueden mencionar los siguientes:

- a) **Reactor discontinuo.** Es aquel en donde no entra ni sale material durante la reacción, sino más bien, al inicio del proceso se introducen los materiales, se lleva a las condiciones de presión y temperatura requeridas, y se deja reaccionar por un tiempo preestablecido, luego se descargan los productos de la





- reacción y los reactantes no convertidos. También es conocido como reactor tipo Batch.
- b) **Reactor continuo.** Mientras tiene lugar la reacción química al interior del reactor, éste se alimenta constantemente de material reactante, y también se retira ininterrumpidamente los productos de la reacción.
 - c) **Reactor tubular.** En general es cualquier reactor de operación continua, con movimiento constante de uno o todos los reactivos en una dirección espacial seleccionada, y en el cual no se hace ningún intento por inducir al mezclado. Tienen forma de tubos, los reactivos entran por un extremo y salen por el otro.
 - d) **Reactor semicontinuo.** Es aquel en el cual inicialmente se carga de material todo el reactor, y a medida que tiene lugar la reacción, se van retirando productos y también incorporando más material de manera casi continua.
 - e) **Tanque con agitación continua.** Este reactor consiste en un tanque donde hay un flujo continuo de material reaccionante y desde el cual sale continuamente el material que ha reaccionado. La agitación del contenido es esencial, debido a que el flujo interior debe estar en constante circulación y así producir una mezcla uniforme.
 - f) **Reactor de lecho fluidizado.** Se utiliza para reacciones donde intervengan un sólido y un fluido (generalmente un gas). En estos reactores la corriente de gas se hace pasar a través de las partículas sólidas, a una velocidad suficiente para suspenderlas, con el movimiento rápido de partículas se obtiene un alto grado





de uniformidad en la temperatura evitando la formación de zonas calientes.

- g) **Reactor de lecho fijo.** Los reactores de lecho fijo consisten en uno o más tubos empacados con partículas de catalizador, que operan en posición vertical. Las partículas catalíticas pueden variar de tamaño y forma: granulares, cilíndricas, esféricas, etc. En algunos casos, especialmente con catalizadores metálicos como platino, no se emplean partículas de metal, sino que éste se presenta en forma de mallas de alambre. El lecho está constituido por un conjunto de capas de este material. Estas mallas catalíticas se emplean en procesos comerciales como por ejemplo para la oxidación de amoníaco y para la oxidación del acetaldehído a ácido acético.
- h) **Reactor de lecho con escurrimiento.** En estos reactores el catalizador sólido está presente como en el lecho fijo. Los reactivos se hacen pasar en corrientes paralelas o a contracorrientes a través del lecho
- i) **Reactor de lecho de carga móvil.** Una fase fluida pasa hacia arriba a través de un lecho formado por sólidos. El sólido se alimenta por la parte superior del lecho, se mueve hacia debajo de la columna y se saca por la parte inferior.
- j) **Reactor de burbujas.** Permite hacer burbujear un reactivo gaseoso a través de un líquido con el que puede reaccionar, porque el líquido contiene un catalizador disuelto, no volátil u otro reactivo. El producto se puede sacar del reactor en la corriente gaseosa.





- k) **Reactor con combustible en suspensión.** Son similares a los reactores de burbujeo, pero la fase “líquida” esta formada por una suspensión de líquidos y partículas finas del catalizador sólido.
- l) **Reactor de mezcla perfecta.** En este reactor las propiedades no se modifican ni con el tiempo ni con la posición, ya que se parte de la suposición de que se está trabajando en estado de flujo estacionario y la mezcla de reacción es completamente uniforme. El tiempo de mezcla tiene que ser muy pequeño en comparación con el tiempo de permanencia en el reactor. En la práctica se puede llevar a cabo siempre que la mezcla fluida sea poco viscosa y esté bien agitada.
- m) **Reactores de recirculación.** Pueden ser con dispositivos separador, cuando se toma parte de la corriente de salida y se llevan directamente a la entrada del reactor. Sin dispositivo separador, cuando en la salida del reactor se coloca un dispositivo separador que hace que se separen reactivos y productos, luego los reactivos se recirculan de nuevo al reactor.
- n) **Reactores de membrana.** Son aquellos que combinan la reacción y la separación en una sola unidad; la membrana selectivamente remueve una (o más) de las especies reactantes o productos. Estos reactores han sido comúnmente usados para aplicaciones en las cuales los rendimientos de la reacción están limitados por el equilibrio. También han sido propuestos y usados para otras aplicaciones; para incrementar el rendimiento y la selectividad de reacciones enzimáticas y catalíticas influyente a través de la membrana sobre la concentración de





- una (o más) especies intermedias, removiéndolas selectivamente (o ayudando a mantenerlas en una concentración baja), evitando la posibilidad de que dichos compuestos envenenen o desactiven el catalizador y para proveer una interfase controlada entre dos o más reactantes.
- o) **Fermentadores.** Este tipo de reactores utilizan hongos, los cuales forman un cultivo, el cual a su vez se transforma en una “sopa” espesa que contiene crecimientos filamentosos. Un ejemplo se encuentra en la fabricación de antibióticos como la penicilina.
 - p) **Reactor empacado.** Este tipo de reactor supone la existencia de un flujo continuo de gas y otro de líquido hacia abajo sobre un lecho fijo de partículas sólidas catalíticas, las características de las partículas sólidas y de su empaquetamiento, junto con los caudales y propiedades de las dos corrientes de fluidos determinarán el régimen de flujo del reactor y también sus propiedades fluido-dinámicas.
 - q) **Reactores Isotérmicos.** Son aquellos que trabajan u operan a una temperatura constante.
 - r) **Reactores Isobáricos.** Que son aquellos que trabajan u operan a una presión constante (Smith, 1999).

Dentro de un sistema, ocurren muchas transformaciones, las que más nos interesan, son las relacionadas con el crecimiento de los microorganismos, la degradación de la materia orgánica y el consumo de oxígeno. A continuación, se efectuará el análisis cinético asociado a la degradación de la materia orgánica, por





sencillez, el análisis se explicará por un reactor discontinuo o también llamado sistema cerrado bien mezclado (Fuentes, 2001).

3.6.1 Cinética de la degradación de la materia orgánica

Las hipótesis planteadas para poder llevar a cabo el análisis del balance de masas son:

1. El líquido contenido en el reactor no se evapora.
2. El líquido contenido en el reactor está completamente mezclado
3. En el reactor se esta produciendo una reacción química en la que la concentración de materia orgánica es un reactivo.

Debido a que la materia orgánica es una sustancia no conservativa, su degradación sigue una relación de primer orden de la forma:

$$r_c = -kX \quad (1)$$

Donde: r_c = tasa de la variación de la concentración

k = constante de degradación

X = concentración de materia orgánica

Haciendo un balance de masa tenemos:

$$A = E - S + T \quad (2)$$

Donde: A = Acumulación

E = Entradas

S = Salidas

T = Transformaciones

Como en el sistema no se presentan entradas ni salidas, la ecuación (1) se reduce a:





$$A = T \quad (3)$$

Se puede escribir la expresión (3) en función del tiempo y expresar la concentración de materia orgánica en función de la masa contenida dentro de un volumen determinado. Entonces tenemos:

$$V \frac{dX}{dt} = -VkX \quad (4)$$

Si se separan las variables e integran de ambos lados de la ecuación considerando que para el tiempo $t=0$ la concentración inicial es X_0 tenemos:

$$X = X_0 e^{-kt} \quad (5)$$

La ecuación (5) nos indica la variación de la concentración de la materia orgánica en función del tiempo dentro de un sistema cerrado bien mezclado. En los sistemas de tratamiento no se utilizan los sistemas cerrados, por lo que esta ecuación no es representativa de lo que ocurre en un reactor convencional, sin embargo es una expresión muy ilustrativa del proceso de degradación del material orgánico. Cabe mencionar que esta ecuación se emplea en los laboratorios para determinar la DBO_5 del agua residual.

Para poder continuar con el análisis cinético, se puede hacer el mismo desarrollo elaborado el para los reactores utilizados en éste trabajo.





3.7 Lagunas de oxidación

Las lagunas de oxidación son excavaciones poco profundas en las cuales se desarrolla una población microbiana compuesta por bacterias, algas y protozoos (que convienen en forma simbiótica) y eliminan en forma natural, patógenos relacionados con excrementos humanos, sólidos en suspensión y materia orgánica, causantes de enfermedades tales como el cólera, el parasitismo, la hepatitis y otras enfermedades gastrointestinales. Es un método fácil y eficiente para tratar aguas residuales provenientes del alcantarillado sanitario. El sistema esta compuesto inicialmente por un grupo de trampas que atrapan y separan los elementos sólidos no inherentes al diseño del sistema, en etapas siguientes. El agua y sus residuos pasan a un sistema de lagunas (una o más) donde permanecen en contacto con el entorno, principalmente el aire, experimentando un proceso de oxidación y sedimentación, transformándose así la materia orgánica en otros tipos de nutrientes que pasan a formar parte de una comunidad diversa de plantas y ecosistema bacteriano acuático. Se sabe que las lagunas de oxidación (estabilización) son uno de los procesos más eficientes que existe para el tratamiento de las aguas residuales e industriales. Mientras tanto, las lagunas de estabilización por ser consideradas uno de los sistemas de tratamiento de aguas residuales más sencillos que se conocen, tanto operacional como constructivo, tiene generalmente sus actividades de operación y mantenimiento descuidada.





Las lagunas de estabilización tienen una ventaja enorme sobre los sistemas de tratamiento convencionales (lodos activados y sus variantes, así como con filtros o lechos biológicos) con relación a la reducción de coliformes fecales y huevos de helmintos. Logran una remoción de coliformes fecales del 99.99% y de huevos de helmintos y quistes de protozoarios de 100 %.

3.7.1 Seguridad en lagunas de oxidación

Es recomendable que este tipo de sistemas se encuentren cercados para evitar la presencia de personas ajenas a las instalaciones, así como de animales extraviados. Asimismo, sirve de medida preventiva para evitar el acceso de animales acuáticos de vida silvestre como caimanes u otros reptiles.

Los desperdicios sólidos provenientes de los grandes desarenadores de arena deben enterrarse inmediatamente para evitarse problemas de moscas, mosquitos y malos olores. Todo material flotante deberá ser removido y tratado tan pronto como sea posible.





Capítulo 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y métodos

Se utilizaron como reactores: matraces Erlenmeyer de 2 L. El Aire que fue suministrado por bombas para acuario, que son capaces de proporcionar un flujo de aire aproximado de $0.057 \text{ m}^3/\text{hr}$ ($2 \text{ ft}^3 / \text{hr}$). Difusores esféricos, con diámetro de 2.5 cm y manguera para pecera. El mecanismo de control, arranque y paro de bombas, fue manual, manteniéndose así los periodos de aireación.

4.1.1 Obtención de microorganismos para la degradación

Las 6 cepas se obtuvieron del medio ambiente, previamente identificadas como *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona alcaligenes*, *Pseudomona fluorescens*, *Pseudomona stutzeri* y *Achromobacter xylosoxidans*. Se sembraron en un medio mineral sólido en cajas petri, a base de Agar McConkey y Agar Soya Trypticaseina para su posterior utilización.

4.1.2 Agua y agua residual de refinería enriquecida con fenol

El agua con 100 mg/L de fenol, se elaboró con un medio para fenoles y se preparó 1 L por reactor. El agua residual de refinería enriquecida con fenol se elaboró agregando fenol a un determinado volumen de agua residual de refinería para así tener como resultado un agua residual con una concentración inicial de 100 mg/L de fenol, lo anterior debido a que la cantidad de fenol contenido en aguas residuales de refinería es de 76 mg/L.





4.1.3 Reactores de flujo cerrado

Los reactores operaran a una temperatura constante de 28 °C y con suministro continuo e intermitente de aire húmedo en reactores de flujo cerrado. En la figura 4.1, se muestra un esquema que ejemplifica el dispositivo.

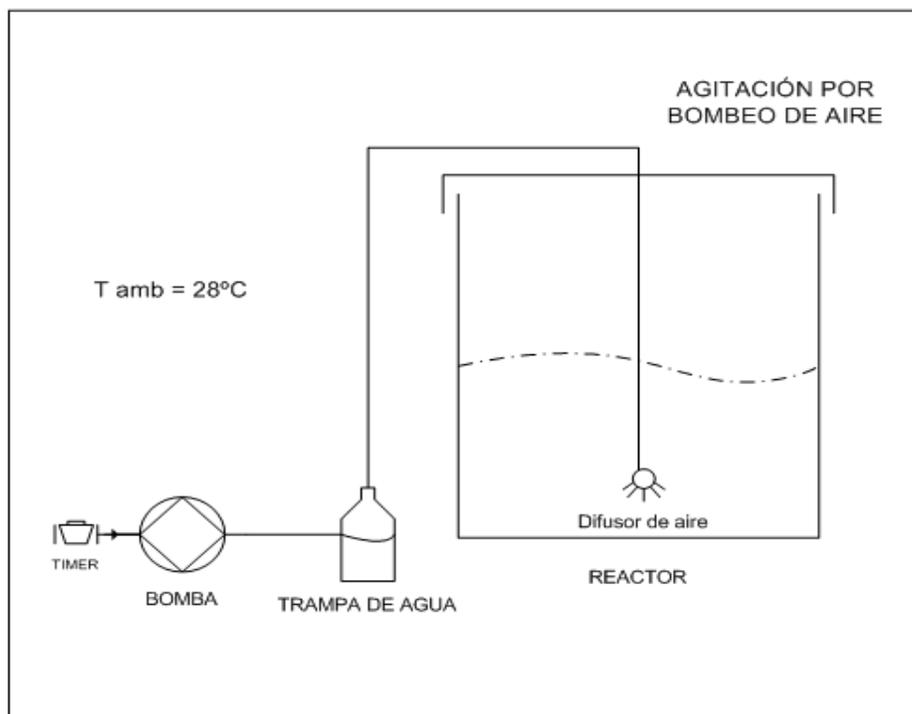


Fig. 4.1 Dispositivo experimental dentro de un “cuarto caliente”

4.1.4 Condiciones de operación para los reactores

Las condiciones de operación que se establecieron para los reactores se muestran en la tabla 4.1 y la seguridad del reactor, depende realmente de todos los componentes (bomba, trampa de agua, temperatura, control de tiempo), pues todos son importantes para el buen desempeño y evitar algún desastre.



**Tabla 4.1 Condiciones de operación para los dos tipos de reactores.**

Parámetro	Reactor Continuo	Reactor Combinado
Temperatura (°C)	28 ± 2	28 ± 2
pH (unidades de p H)	7.5-8.6	7.5-8.6
Luz (lux)	Ausencia	Ausencia
Inóculo (UFC)/100 mL	39 x10 ⁸	39 x10 ⁸
Tiempo de aireación (hr)	24	12 de aireación intermitente y 12 de aireación continua

4.1.5 Reactores

En total se utilizaron 10 reactores de los cuales 5 trabajaron en condiciones de aireación continua y 5 en condiciones de aireación combinada. Para la distribución de aire, dentro de los reactores, se utilizó un difusor de bola conectado a la manguera plástica.

4.1.6 Técnicas y equipos usados para la determinación de los parámetros analizados

Los parámetros que se monitorearon de manera continúa durante toda la etapa experimental fueron Fenoles, DQO (ver Anexo1) y pH.

Para medir el pH. Se utilizó un potenciómetro OAKTON.

Al realizar la investigación bibliográfica se encontraron condiciones favorables de aireación intermitente para el tipo de microorganismos que utilizamos, que fue 30 minutos de aireación por 105 minutos de no aireación (Segura, 2007).





Capítulo 5. ETAPAS EXPERIMENTALES

Para llevar a cabo la experimentación fue indispensable dividirla en 3 etapas, ya que fue necesario fijar las bases operativas. Las dos primeras etapas experimentales fueron consideradas como etapas previas, ya que darían la pauta para alcanzar las condiciones operativas necesarias para la última etapa experimental. A continuación se explica en que consistió cada etapa.

La primera etapa experimental, tuvo como objetivo, adquirir la cepa y la concentración con la cual se trabajó para iniciar la degradación del fenol, tomando en consideración la mayor remoción de fenol en 24 hr y además, que la cepa siguiera activa.

En la segunda etapa experimental, se inició la degradación de fenol en agua preparada con la concentración y la cepa elegida en la primera etapa experimental y entonces, se continuó con la degradación de fenol en un reactor a flujo cerrado con aireación húmeda continua y aireación húmeda intermitente.

Por último, se realizó la degradación de fenol en agua residual de refinería enriquecido con fenol (ARR esterilizada y ARR sin esterilizar), para lograr la concentración inicial requerida y así estar en condiciones de realizar el experimento de degradación empleando la cepa seleccionada en la primera etapa experimental. De esta forma se evaluó la velocidad de degradación de fenol en





dos reactores a flujo cerrado, uno con aireación húmeda continua y otro con aireación húmeda intermitente.

5.1 Primera etapa experimental

En esta etapa, se efectuó el montaje y ensayo de las técnicas analíticas previstas (DQO, fenoles y pH) para ser empleadas a lo largo de los experimentos.

Para realizar los bioensayos, se emplearon seis cepas bacterianas puras, que se acondicionaron mediante un medio mineral para fenoles (Anexo 2) y diferentes concentraciones de fenol.

5.1.1 Primera concentración 975 mg/L

Se prepararon 6 matraces de un volumen de 250 mL, a los que se les adicionó 100 mL de medio mineral conteniendo 975 mg/L de fenol cada uno con su respectivo control. En donde la cantidad de microorganismos o UFC (unidades formadoras de colonias) en cada matraz inoculado fue de aproximadamente 39×10^8 en cada matraz.

Se incubaron las 6 cepas a 35 °C y agitación de 150 RPM durante 28 días y se determinó la concentración de DQO, fenoles totales y pH

5.1.2 Segunda concentración 475 mg/L

Se siguió el mismo procedimiento que la primera concentración durante 24 hr y se les determinó la concentración de DQO, fenoles totales y pH.





5.1.3 Agua residual de refinería

Se guardó una muestra de aguas residuales de refinería, sin tratamiento. Después de éste periodo, se determinó la concentración de fenoles, la cual fue de 76 mg/L, por lo tanto para los experimentos con cepas puras, se incrementó la concentración hasta llegar a un total de 100 mg/L.

Posteriormente, se realizaron los bioensayos durante 55 hr, con las cepas bacterianas puras por separado, sembrándolas en los 6 matraces de 250 mL, con 100 mL de aguas residuales de refinería sin esterilizar, además de sus respectivos controles (Fig 5.1) y se determinó la concentración de DQO, fenoles totales y pH.



Fig. 5.1 Cepas que se utilizaron para la biodegradación en los bioensayos.

5.1.4 Análisis microbiológicos

Para complementar esta experimentación fue necesario realizar un estudio del crecimiento y desarrollo de cada cepa bacteriana pura.





Por lo tanto para la degradación de cada concentración de fenol y agua de refinería, se realizaron siembras de cepas en un medio mineral sólido a base de Agar McConkey y Agar Soya Trypticaseina en cajas petri, para determinar si la cepa continuaba en activa.

5.1.5 Estudio de Crecimiento de la cepa

Para complementar esta decisión fue necesario realizar un estudio del crecimiento y desarrollo de cada cepa, durante la degradación de cada concentración de fenol y agua de refinería. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 5.4, las cepas que mostraron crecimiento y desarrollo en la degradación fueron *A. xylosoxidans* y *P. fluorecens*.

Tabla 5.4 Valores promedio del desarrollo y crecimiento de cada cepa en las diferentes concentraciones de fenol

Cepa	975 mg/L fenol	475 mg/L fenol	75 mg/L fenol
<i>A. faecalis</i>	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-
<i>P. alcaligenes</i>	-	-	-
<i>P. fluorecens</i>	+	+	+
<i>P. stutzeri</i>	-	-	-
<i>A. xylosoxidans</i>	+	+	+

+ Hubo desarrollo -No hubo desarrollo

Fue necesario, realizar algunas pruebas bioquímicas para conocer como es la función enzimática de cada cepa bacteriana y así ser útil





en la toma de decisiones para elegir la cepa que utilizaremos para la evaluación de la degradación de fenol en agua y agua de refinería. En la tabla 5.5 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas que se determinaron para tener información sobre cada cepa bacteriana.

Para las *pseudomonas* las respuestas importantes son las pruebas de caldo nitrato y citrato ya que fueron iguales para estas, lo cual nos dice que las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con la producción de amoníaco y así alcalinizando el medio, de esta manera el desarrollo del microorganismo es visible, ya que debe encontrarse en la fase logarítmica, la cual es factible sólo si el carbono y el nitrógeno han sido asimilados. Para el caldo nitrato, en esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre, lo cual las *pseudomonas* lo hacen sin problema.

La determinación de la capacidad de fermentación de la glucosa, donde se forman cantidades menores de ácido, acetato, succinino y los principales productos son butanodiol, etanol, H₂ y CO₂, se conoce por la prueba OF-XYL, que dieron positivo solo para dos *pseudomonas* según lo muestra la tabla 5.5, así como la *A. faecalis*





Tabla 5.5 Pruebas Bioquímicas: Identificación de cepas

Prueba bioquímica/ Cepa	A. <i>faecalis</i>	P. <i>aeruginosa</i>	P. <i>alcaligenes</i>	P. <i>fluorecens</i>	P. <i>stutzeri</i>	A. <i>xylooxidans</i>
LYS	-	-	-	-	-	-
AR	-	-	-	-	-	-
OR	-	-	-	-	-	-
CN	-	++	++	++	++	--
MAL	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-	-	-
GN	-	-	-	-	-	-
OF-GLU	+	-	-	-	-	-
OF-XYL	+	-	+	-	+	-
SIM	--+	--+	--+	--+	--+	--+
MIO	-	-	-	-	-	-
CITRATO	+	+	+	+	+	+
KL	-	-	-	-	-	-
CMF	++	+-	--	--	--	--

Se sembraron cepas bacterianas en diferentes medios para el análisis del desarrollo de estas en la degradación de fenol de las diferentes concentraciones. Fig. 5.2

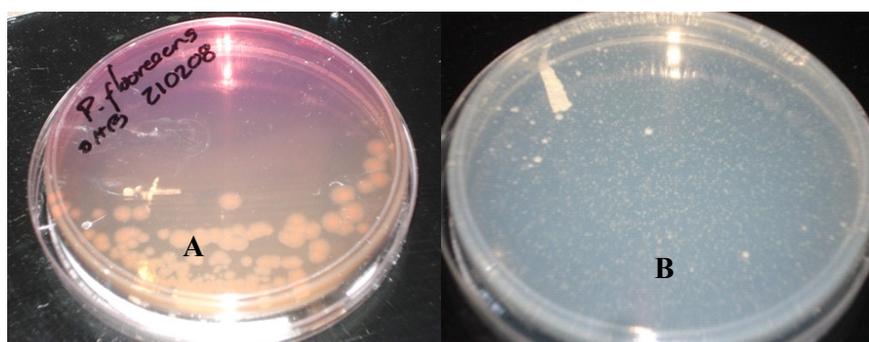


Figura 5.2 A) Cepa bacteriana lista para ser inoculada, B) Cepa después del tratamiento de 100 mg/L, que aun sigue en actividad





Antes de iniciar el estudio de la evaluación de la degradación de fenol en agua y agua de refinería en reactores a flujo cerrado, fue necesario conocer la curva de crecimiento de la cepa que para este fin utilizaremos con una concentración de fenol de 100 mg/L. Donde se observa que el mayor crecimiento se encuentra en las primeras cinco horas aproximadamente (Figura 5.3).

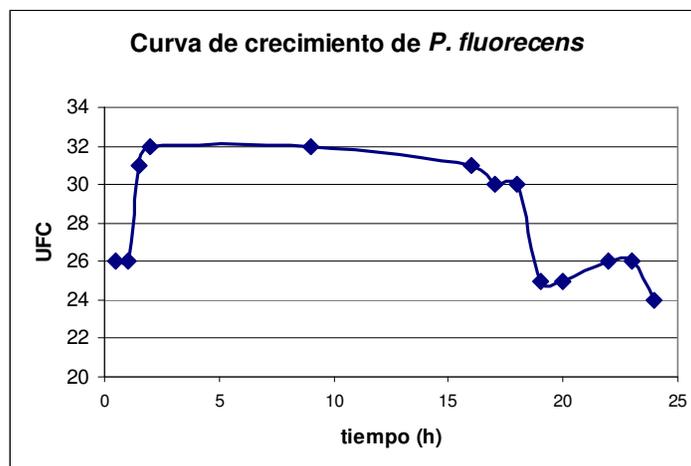


Figura. 5.3 Perfil de crecimiento de la cepa a lo largo del periodo de prueba

Se elige la concentración de 100 mg/L de fenol; concentración que en promedio registran los datos experimentales de descargas de agua de refinерías. Concentración que se utilizó para el bioensayo de aguas de refinерía.

5.1.6 Análisis y discusión de resultados, de la primera etapa experimental

La degradación de 975 mg/L de fenol a 35 C° y 150 RPM en un tiempo de 28 días se muestra en la tabla 5.1.





Donde cada cepa bacteriana tuvo la remoción presentada en la tabla 5.1 y para esta concentración la cepa que resultó con la mejor remoción fue ***P. fluorescens*** y ***P. stutzeri***. Si bien fueron dos cepas las que tienen una remoción grande, es muy pronto para tener idea de que cepa es la servirá para la evaluación de la degradación de fenol en agua y agua de refinería.

Tabla 5.1 Valores promedio de la remoción de 975 mg/L de fenol, por cada cepa bacteriana

Cepa	Remoción %
<i>A. faecalis</i>	77
<i>P. aeruginosa</i>	78
<i>P. alcaligenes</i>	77
<i>P. fluorescens</i>	84
<i>P. stutzeri</i>	84
<i>A. xylosoxidans</i>	83

Para la segunda degradación de 475 mg/L de fenol a 35 C° y 150 RPM en un tiempo de 1 día la cepa bacteriana que resultó con la mejor remoción fue ***A. xylosoxidans*** y ***A. faecalis*** (Tabla 5.2). Pero aún falta la última degradación de fenol en agua de refinería para determinar cual es la cepa bacteriana que nos servirá para la evaluación de la degradación de fenol en agua y agua de refinería.





Tabla 5.2 Valores promedio de la remoción de 475 mg/L de fenol, por cada cepa bacteriana

Cepa	Remoción %
<i>A. faecalis</i>	37
<i>P. aeruginosa</i>	25
<i>P. alcaligenes</i>	0
<i>P. fluorescens</i>	8
<i>P. stutzeri</i>	12
<i>A. xylosoxidans</i>	39

Finalmente para la degradación de 75 mg/L de fenol, contenido en aguas de refinera a 35 °C, 150 RPM y en un tiempo de 2.3 días la cepa que resultó con una mejor remoción fue ***P. fluorescens*** (Tabla 5.3). Entonces, se puede decir que, por los resultados obtenidos en los anteriores bioensayos, la cepa bacteriana que cumple con las características biodegradadora de fenol en agua y agua de refinera es la *P. fluorescens*.

Tabla 5.3 Valores promedio de la remoción de 75 mg/L de fenol, por cada cepa bacteriana

Cepa	Remoción %
<i>A. faecalis</i>	17
<i>P. aeruginosa</i>	1
<i>P. alcaligenes</i>	13
<i>P. fluorescens</i>	45
<i>P. stutzeri</i>	41
<i>A. xylosoxidans</i>	40





5.1.7 Conclusiones de la primera etapa experimental

La cepa bacteriana preseleccionada, debido a su mayor capacidad degradadora de fenol en agua y agua de refinería fue *P. fluorecens*.

5.2 Segunda etapa experimental

De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa experimental, se eligió trabajar con una concentración de 100 mg/L de fenol y con la cepa que tuvo la mejor capacidad degradadora de fenol en aguas de refinería.

Se inóculo el reactor con 1L de medio mineral para fenoles, con 38×10^8 UFC de cepa (*P. fluorecens*) por cada 100 mL de agua, utilizando los reactores mencionados en el capítulo 4.

El experimento se realizó por un periodo de 24 hr, en reactores con suministro de aire de manera continua y de manera combinada, la cual consiste en 12 hr de aireación intermitente y 12 hr de aireación continua (Segura, 2007).

Por último, se realizaron las determinaciones correspondientes de fenoles totales y DQO.





5.2.1 Análisis y discusión de resultados, de la segunda etapa experimental

Después de haber elegido la concentración (100 mg/L) de fenol y la cepa bacteriana (*P. fluorescens*). Iniciamos la degradación del fenol cuyos resultados se muestran a continuación.

Inicialmente tuvimos 100 mg/L de fenol, con suministro de aire húmedo continuo utilizando la cepa *P. fluorescens* en un tiempo de 24 h. Fig. 5.4. Puede observarse que las 24 hr de degradación no fueron suficientes para la eliminación total de fenol, no obstante que se hayan utilizado condiciones aptas para la degradación de éste. Para la materia orgánica disuelta, medida como DQO también nuestro el mismo comportamiento.

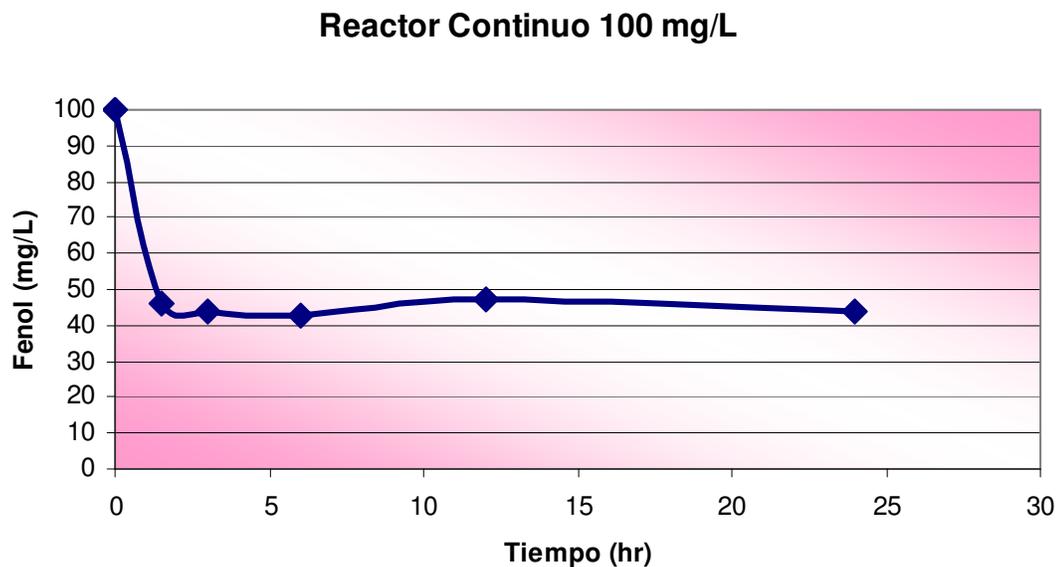


Figura 5.4 Perfil de degradación de fenoles en un reactor de flujo cerrado aireado de manera continua





Para la degradación de 100 mg/L de fenol en un reactor combinado (Figura 5.5), utilizando la cepa *P. fluorescens* en un tiempo de 24 hr, se puede observar que las 24 h de degradación tampoco fueron suficientes para la degradación total de fenol, no obstante que se utilizaron condiciones aptas para la degradación de este. Por lo que ni un sistema continuo, ni un sistema combinado funcionaron en la degradación de fenol, bajo estas condiciones.

Reactor Combinado 100 mg/L

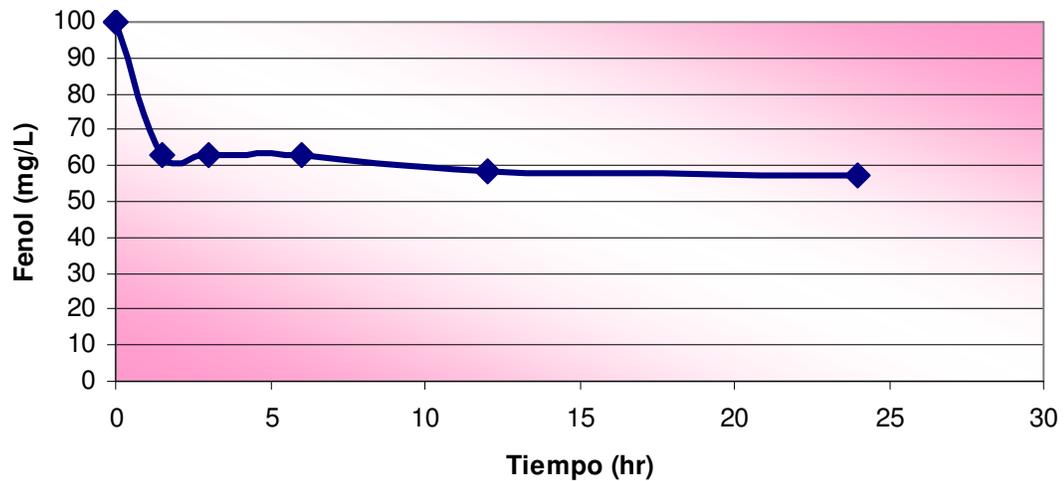


Figura 5.5 Perfil de degradación de fenoles en un reactor de flujo cerrado aireado de manera combinado

De acuerdo con los resultados obtenidos la degradación de fenol en el reactor de flujo cerrado con aireación húmeda continua fue de 56 %, mientras que para el reactor aireado de manera combinada fue de 43 %.





5.2.2 Conclusiones de la segunda etapa experimental

Se logró remover hasta un 56 % de fenol empleando un reactor de flujo cerrado con suministro de aire húmedo continuo, y una concentración inicial de fenol de 100 mg/L en agua corriente y 24 h de reacción a 28 °C. Para la materia orgánica disuelta, medida como DQO, la remoción fue de 39 y 19 % para el reactor continuo y el reactor combinado, respectivamente.

5.3 Tercer etapa experimental

5.3.1 Agua residual de refinería esterilizada

Se inoculo un reactor (ver esquema del capítulo 4) con 1L de agua residual de refinería (ARR esterilizada) enriquecida con fenol para tener una concentración inicial de 100 mg/L, con 38×10^8 UFC de cepa (*P. fluorescens*) por cada 100 mL de agua.

En esta etapa también se emplearon reactores con suministro de aire de manera continua y de manera combinada, teniendo un tiempo total de degradación de 24 hr (Segura, 2007).

5.3.2 Análisis y discusión de resultados, ARR Esterilizada

Para la evaluación de la degradación de fenol contenido en aguas residuales de refinería (ARR) esterilizadas con suministro de aire húmedo continuo, utilizando la cepa *P. fluorescens* en un tiempo de 24 hr, los resultados mostraron (Figura 5.6), una degradación rápida al inicio de la degradación, es decir en las primeras cinco horas,





cosa que coincide con la curva de crecimiento de la cepa pura. Sin embargo, se mantuvo constante durante las restantes horas.

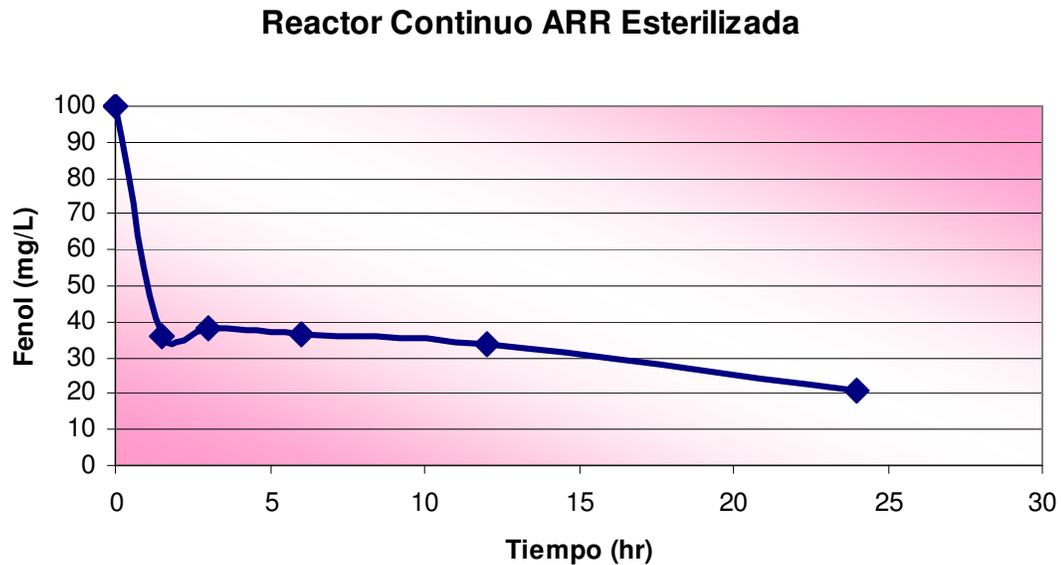


Figura 5.6 Perfil de degradación de fenoles en un reactor de flujo cerrado alimentado con aguas residuales de refinería y aireación continua

Los resultados muestran, que para la degradación de fenol en aguas residuales de refinería esterilizada con suministro de aire combinado, la degradación fue casi total adquiriendo un 94 % de remoción de fenol en aguas de refinería esterilizada. La DQO también muestra el mismo comportamiento, teniendo una remoción total de 52 y 99 % para el reactor continuo y el reactor combinado, respectivamente (Figura 5.7)





Reactor Combinado ARR Esterilizada

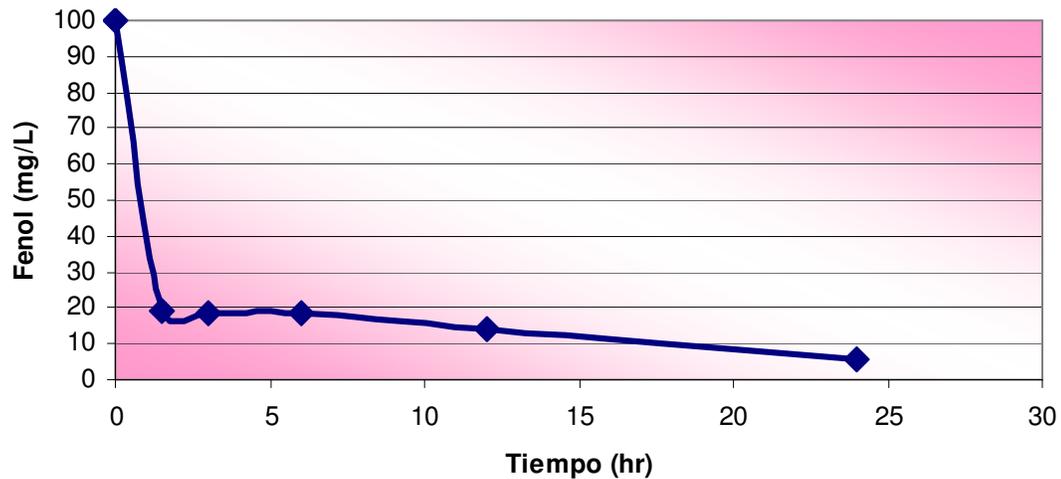


Figura 5.7 Perfil de degradación de fenoles en un reactor de flujo cerrado alimentado con aguas residuales de refinería y aireación combinada

5.3.3 Agua residual de refinería sin esterilizar

También, se trataron aguas residuales de refinería sin esterilizar (ARR sin esterilizar) de la misma manera que los reactores anteriores, es decir, con suministro de aire de manera continua y combinada.

5.3.4 Análisis y discusión de resultados, ARR sin esterilizar

La figura 5.8 muestra como la degradación de fenol contenido en aguas residuales de refinería (ARR) sin esterilizar con aireación húmeda continua utilizando la cepa *P. fluorescens* en un tiempo de 24 hr, fue mayor que en los sistemas con suministro de aire de manera continua parte experimental anterior, logrando una remoción de 77 %.





Reactor Continuo ARR S/Esterilizar

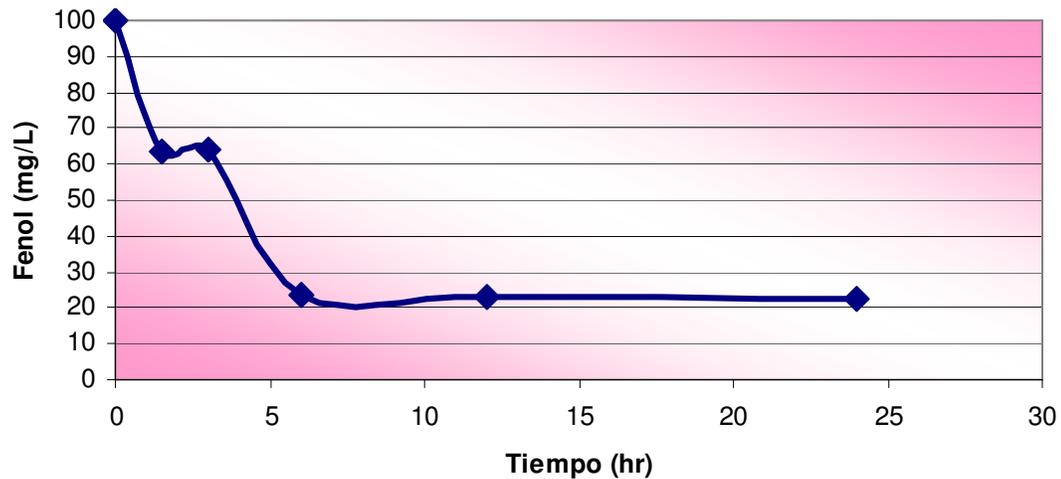


Figura 5.8 Perfil de degradación de fenoles en un reactor de flujo cerrado alimentado con aguas residuales de refinería sin esterilizar y con aireación continua

Por último, en la degradación de fenol contenido en aguas residuales de refinería (ARR) sin esterilizar, con aireación húmeda intermitente, utilizando la cepa *P. fluorescens* en un tiempo de 24 hr, fue igualmente casi total que para el sistema con suministro de aire de manera combinada esterilizado, teniendo inicialmente a las 2 hr de experimentación la degradación fue mas rápida, continuando con una degradación constante en las siguientes 10 hr y en el tiempo restante se obtuvo una remoción final de 98 % de fenol, siendo esta la mayor remoción en todo el tratamiento. La materia organica disuelta, medida como DQO también muestra el mismo comportamiento, teniendo una remoción total de 70 y 95 % para el





reactor continuo y el reactor combinado, respectivamente. (Figura 5.9)

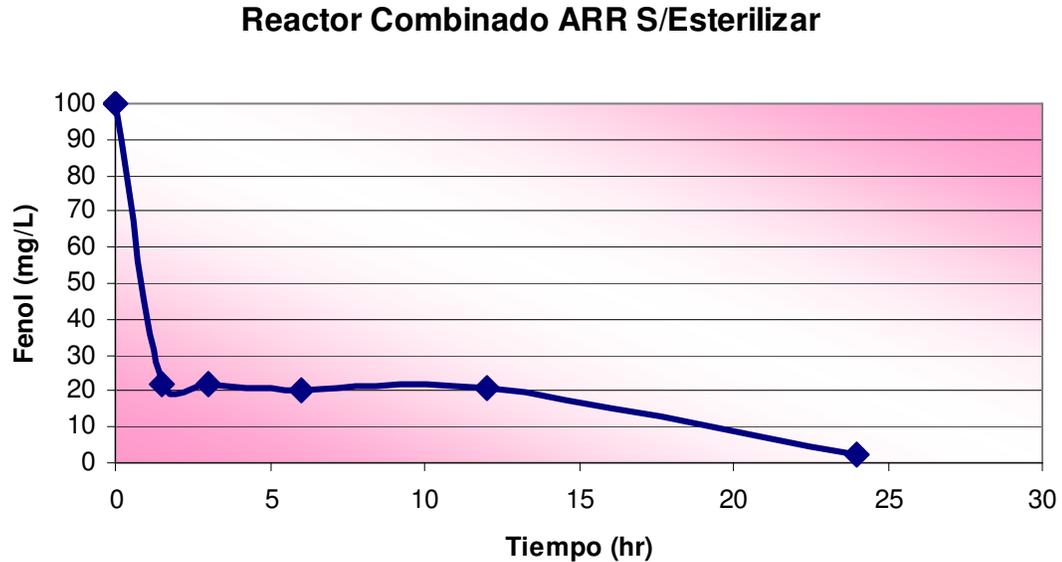


Figura 5.9 Perfil de degradación de fenoles en un reactor de flujo cerrado alimentado con aguas residuales de refinera sin esterilizar y con aireación combinada

5.3.5 Cinética de reacción

Por tanto cabe destacar que los modelos más usados para describir los procesos de biodegradación y biogeneración son las cinéticas de orden cero, primer orden, segundo orden y pseudo primer orden. De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que, la degradación de ARR en reactores a flujo cerrado, con suministro de





aire húmedo intermitente son los mejores sistemas para la biodegradación de fenol, teniendo un orden de reacción igual a 1 con un valor de **k** promedio de **0.087 s⁻¹** y siguiendo un comportamiento en la siguiente forma:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A] \Rightarrow \ln[A] = -kt - \ln[A]_0$$

Donde [A] es la concentración de fenol, t el tiempo y k la constante de reacción. Las tecnologías existentes no han logrado propiciar una remoción eficiente. Por este motivo, es necesario continuar en la búsqueda de soluciones técnicas, económicas y ambientalmente aceptables.

5.3.6 Conclusiones de la tercera etapa experimental

- ✓ Para las ARR, esterilizadas, la mayor degradación de fenoles durante 24 hr y 28 °C fue en un reactor con suministro de aire combinado con una remoción de 94 % de fenoles.
- ✓ Para las ARR sin esterilizar, el mejor reactor fue el de suministro de aire intermitente, obteniendo una remoción de fenoles de 98 %.

5.4 Análisis de costos por el concepto de energía eléctrica.

Para efecto del análisis de costos, se tomó como referencia el consumo de energía, considerando el precio de Kwh en \$ 1.467 pesos (SIE, 2008), así como el uso de periodos de aireación / no aireación.





En el caso de la segunda y tercera etapa experimental donde el tiempo de degradación de los reactores combinados es de 24 hr y el precio de Kwh es de \$ 1.467.^oM/N, el costo total energético de esta etapa fue de \$ 35. ^oM/N Mientras que para los reactores Intermitentes donde en realidad trabajan 15 hr de 24 hr, el costo total energético de esta etapa fue de \$ 22. ^oM/N Teniendo un ahorro de energía del 37 % con remociones casi totales de fenol.





Capítulo 6. CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ Empleando reactores de flujo cerrado con suministro de aire húmedo intermitente, es posible ahorrar el 37 % del costo de energía eléctrica, respecto de los reactores aireados de manera continua.

- ✓ Se considera que es técnicamente factible mejorar, mediante un adecuado manejo del suministro de aireación, la remoción de compuestos fenólicos que actualmente ocurre en sistemas de tratamiento biológicos convencionales existentes en las refinerías.





REFERENCIAS

1. Altamira, B. (2005), Degradación de fenoles totales durante el tratamiento biológico de aguas de producción petroleras. *Ciencia*, 13 (3), 281-291pp
2. Aguilar, H. (1998). Descomposición de Fenol en medio acuoso con Peróxido de hidrógeno catalizada por cenizas provenientes de la combustión de carbón mineral. *IMP*. 272-274 pp.
3. APHA, AWWA y WEF. (1999). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20 th edition. Clesceri LS, Greenber AE, Eaton AD. Editors. American Public Health Association.
4. Arriaga M. (2006). Degradación de clorofenoles por fotocátalisis. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. 97 (1)
5. Bermúdez, G. (2007). Producción de Lacasa extracelular, remoción de fenoles y cafeína por *pleurotus spp.* cultivado en pulpa de café. *Tecnología química*. 27 (3)
6. Boyd S. (1983). Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Applied Environment Microbiology*. 46 50-54
7. Buitrón G. (2006). Biodegradación de efluentes altamente contaminados por compuestos fenólicos utilizando una estrategia de control optima. XIV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Instituto de Ingeniería UNAM
8. Canul A. (2006). Tratamiento biológico para la remoción de compuestos organoclorados en los efluentes provenientes de la industria petroquímica. Tesis Maestría en Ingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 74 pp.





9. Castillo I. (1998). Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. *Madera y Bosques*. 4 (2) 21-37.
10. Castañón, C. (2001). Phenol Biodegradation Using a Repeated Batch Culture of *Candida tropicalis* in a Multistage Bubble Column, *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43 19-25.
11. Clair S. (2001). *Química para Ingeniería Ambiental*, 4 ed. Mc Graw Hill. Colombia. pp 247-249
12. Daza C. (2004). Bentonita colombiana modificada con Al-Cu para la oxidación de fenol en medio acuoso diluido. *Scientia et Técnica*. 25 0122-1701.
13. Cerino, G. (2007). Empleo de *Aspergillus niger* en la bioremediación de ambientes contaminados con Cr (vi) y fenol. Congreso Regional. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de Nuevo León.
14. Díaz A. (2005). Degradación de fenoles totales durante el tratamiento biológico de aguas de producción petroleras. *Ciencia*, 13 (3) 281-291.
15. Díaz L. (2005). Crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* en antraceno y naftaleno por recuento en placas y microscopía de epifluorescencia. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*. 1 (39) 27-42.
16. Estrada E. (2006). Remoción de compuestos aromáticos mediante un sistema combinado anaerobio/aerobio de lecho fluidizado. Tesis Maestría en Ingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 123 pp.
17. Errasquín, P (2002). Segregación de Efluentes. XIV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Scadeem S.C.





18. Forero J. (2005). Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería. Ciencia Tecnología y Futuro. ICP. 3 (1)
19. Fuentes V. (2001). Evaluación Técnico-Económica del Tratamiento de las aguas residuales municipales en México. Tesis Licenciatura en Ingeniero Civil. Facultad de Química, UNAM. 83 pp.
20. García F. (1996) Oxidación catalítica de compuestos fenolicos en aguas residuales. Facultad de CC. Universidad Complutense de Madrid.
21. González, J. (2007), Aprovechamiento de lodos de EDARs urbanas como carbón activo: aplicación a la remoción de fenol. Revista de Ingeniería Química Madrid . (454) 102-107
22. Guillén H. (2001). Degradación de compuestos Xenobióticos provenientes de una industria papelera con un consorcio bacteriano. Tesis Licenciatura en Químico farmacobiología. Departamento de Química y Biología, Universidad de las Américas Puebla. México. 66 pp.
23. Kumaran P. (1996). Kinetics of phenol biotransformation. Water Researh 31 (1) 11-12.
24. Laguna W. (2004). Estudio sobre las posibilidades de aplicación de la fotocatalisis heterogénea a los procesos de remoción de fenoles en medio acuoso. Trabajo Dirigido de Grado presentado como requisito parcial para optar al Título de Ingeniería de Petróleos e Ingeniero Químico. Escuela de Procesos y Energía,





- Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Colombia. 76 pp.
25. Ludwing O. J. (2006). Fenoles. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Trujillo.
 26. Mijaylova P. (2000) Uso de un producto biotecnológico en el tratamiento aerobio de aguas residuales. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
 27. Mijaylova P. (2006) Características y reutilización del agua en refinerías. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. XIV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental
 28. Moreno I. (2006). Biodegradación óptima de compuestos fenólicos, en un reactor discontinuo secuencial. Tesis Doctoral en Ciencias, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 147 pp.
 29. NOM-AA-050-SCFI-2001. Análisis de Agua - Determinación de Fenoles Totales en Aguas Naturales, Potables, Residuales y Residuales Tratadas
 30. NOM-052-SEMARNAT-1993. Que Establece las Características de los Residuos Peligrosos, el Listado de los Mismos y los Límites que hacen a un Residuo Peligroso por su Toxicidad, que Incluye la Aplicación de la Norma al Agua Residual y Pruebas para Determinar la Peligrosidad de una Sustancia.
 31. NOM-CCA-031-ECOL/1993. Que Establece los Límites Máximos Permisibles de Contaminantes en Las Descargas de Aguas Residuales Provenientes de la Industria, Actividades Agroindustriales, de Servicios y el Tratamiento de Aguas





- Residuales a los Sistemas de Drenaje y Alcantarillado Urbano o Municipal. (no vigente).
32. Neumann G. (2004) Simultaneous Degradation of Atrazine and Phenol by *Pseudomonas* sp. Strain ADP: Effects of Toxicity and Adaptation. *Applied Environment Microbiology* 70.
 33. Olgúin P. (2004). Anaerobic biodegradation of phenol in sulfide-rich media. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. (79) 554-561.
 34. Reyes I. (2008). Estudio comparativo del reactivo fenton contra el reactivo fenton modificado en la degradación de fenol y 4-clorofenol. Tesis licenciatura. Facultad de Química. UNAM
 35. Rodier J. (1990). Análisis de las aguas; aguas naturales, aguas residuales agua de mar; química, fisicoquímica, bacteriología y biología. Ediciones Omega. Barcelona. Pp. 393.
 36. Smith JM. (1999). Ingeniería de la cinética química. 12 Ed. CECSA Editor., México.
 37. Serra B. (2002). Desarrollo de electrodos compósitos enzimáticos para la detección y determinación de compuestos fenólicos. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
 38. US EPA. (1991). Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de América. Método EPA 8260 B.
 39. Villegas Ma. L. (2003). Inmovilización de una Peroxidasa de Chayote [*Sechium Edule* (JACQ.) SW] y su potencial aplicación en la Remoción de sustancias Fenólicas en Aguas Contaminadas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 19 (02) 73-81





40. Whiteley A. (2000). Bacterial Community Structure and Physiological State within an Industrial Phenol Bioremediation System. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 2400-2407
41. (<http://www.lennotech.com/index.htm>) (19/02/ a las 19 hrs)
42. Yen H. (2006). Kinetics of Phenol Degradation in an Anaerobic Fixed- Biofilm Process. *Water Environment Research*. 78 (6) 598
43. Zhang Y. (2004). IAL-CHS (internal airlift loop – ceramic honeycomb supports) reactor used for biodegradation of 2,4-dichlorophenol and phenol. *Water Science and Technology*, 49 (11–12) pp 247–254 IWA Publishing.





GLOSARIO

Aguas residuales: Son las aguas usadas y los sólidas que por uno u otro medio se introducen en las cloacas y son transportados mediante el sistema de alcantarillado.

Adaptación. Ajuste de los sistemas naturales o humanos a un medioambiente nuevo o cambiante.

Aerobio. Necesitado de oxígeno libre

Anaerobio. Cualquier proceso que puede ocurrir en ausencia de oxígeno, u organismo que puede vivir sin oxígeno; los organismos anaerobios estrictos no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno

Bacilo. Bacteria en forma de bastón.

Bacteria. Organismo procariota.

Bioensayo: Ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes.

Biomasa. Peso seco total de los organismos de una determinada población, muestra o área.





Bioquímica. Estudio de los procesos y compuestos químicos en organismos vivos.

Catalizador. Sustancia que acelera, la tasa de una reacción química pero sin que sea consumida en la reacción; los enzimas son catalizadores

Cepa: Es una variante genotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias

Coenzima. Molécula orgánica, o cofactor orgánico no proteínico, que juega un papel accesorio en los procesos catalizados por enzimas, con frecuencia actúan como dadores o receptores de electrones; el [NAD⁺](#) y el [FAD](#) son dos coenzimas comunes.

Contaminantes orgánicos persistentes. Sustancias químicas que persisten en el medio ambiente, se bioacumulan en la cadena alimentaria y suponen un riesgo de causar efectos adversos a la salud humana y al medio ambiente. Este grupo de contaminantes prioritarios está compuesto de pesticidas (como DDT), químicos industriales (como los bifenilos policlorados, los PCBs), y de forma no intencionada de productos derivados de procesos industriales (como las dioxinas y los furanos).





Control: Es un tratamiento en una investigación que duplica todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada.

Cuerpo receptor: Son las corrientes, depósitos naturales de agua, presas, cauces, zonas marinas o bienes nacionales donde se descargan aguas residuales, así como los terreros.

Descarga: Acción de verter, infiltrar, depositar o inyectar aguas residuales a un cuerpo receptor en forma continua, intermitente o fortuita, cuando éste es un bien del dominio público de la Nación.

Ecosistema. Sistema principal de interacciones que incluye tanto a los seres vivos como a su ambiente físico.

Enzima. Proteína capaz de acelerar reacciones químicas específicas disminuyendo la energía de activación requerida, pero que permanece inalterada durante el proceso; catalizador biológico.

Espora. Célula reproductora, habitualmente unicelular, capaz de dar lugar a un adulto sin fusionarse con ninguna otra célula

Glucosa. Azúcar común con seis carbonos ($C_6H_{12}O_6$); [monosacárido](#) más frecuente en la mayoría de los organismos.





Límite máximo permisible: Valor o rango asignado a un parámetro, el cual no debe ser excedido en la descarga de aguas residuales.

Oxidación. Pérdida de un electrón por un átomo o molécula. La oxidación y la reducción (ganancia de un electrón) tienen lugar simultáneamente, ya que un electrón que ha sido perdido por un átomo es aceptado por otro. Las reacciones de oxidación-reducción son un medio importante de transferencia de energía en los seres vivos.

Patógeno. Organismo que causa una enfermedad

Xenobióticos. Sustancias no naturales





Anexo 1**MÉTODOS DE ANÁLISIS****DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES
(MÉTODO VOLUMÉTRICO)**Introducción

Los fenoles, definidos como hidroxiderivados del benceno y sus núcleos condensados, pueden estar presentes en las aguas residuales domésticas e industriales (desinfectantes, fungicidas, germicidas y conservadores), en las aguas naturales y en los suministros de agua potable. El fenol es conocido por el público como ácido carbólico. Ha sido muy usado como germicida.

El fenol se extrae del alquitrán de hulla y se produce sintéticamente en grandes cantidades. Existe como componente natural en los desechos industriales del gas de carbón, del carbón coque y de las industrias del petróleo, además de encontrarse en una gran variedad de desechos industriales de procesos que utilizan el fenol como materia prima.

Para prevenir problemas como daños hacia los ecosistemas y riesgos a la salud humana, es muy importante el conocer cuantitativamente la presencia de éstos.





Principio

Después de concentrar y extraer el fenol, se somete a una bromación y después se hace una titulación por retroceso.

Reactivos

- Solución de hidróxido de sodio 1 N
- Solución de bromuro de potasio al 25 % (25 g de bromuro de potasio en 100 mL de agua destilada)
- Solución de yoduro de potasio al 20 % (20 g de yoduro de potasio en 100 mL de agua destilada)
- Soluciones de ácido clorhídrico 1 N y al 0.5 N
- Solución titulante de tiosulfato de sodio 1 N
- Solución de bromato de potasio al 0.3 % (0.3 g de bromato de potasio en 100 mL de agua destilada)
- Éter etílico 99.8 %
- Agua destilada

Si es necesario:

- Ácido sulfúrico concentrado
- Sulfato de cobre pentahidratado (100 g de sulfato de cobre pentahidratado en 1000 mL de agua destilada).

(Ver Recolección, preparación y almacenamiento de muestras)

- Cloroformo





Materiales

- 2 Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 1 L
- Embudo de separación de 150 mL
- Bureta de 100 mL
- Parrilla de agitación
- Barra magnética
- Potenciómetro que mida el pH calibrado
- Varilla de vidrio para agitación
- 5 Vasos de precipitados de 250 mL
- 1 Recipiente de vidrio grande donde quepa el matraz de 1 L, para baño María
- 2 Probetas de 50 mL
- Balanza analítica
- Espátula

Recolección, preparación y almacenamiento de muestras

1. Debe tomarse un mínimo de 2 L de muestra en un envase de vidrio o polietileno. Pueden utilizarse muestras compuestas o simples
2. Si las muestras no se analizan en un período de 4 h después de la toma, acidificar la muestra con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado por L de muestra y 5 mL de la disolución de sulfato de cobre





3. Determinar la presencia de agentes oxidantes. En caso de existir su presencia, eliminarlos mediante la adición de sulfato ferroso (FeSO_4) o arsenito de sodio (NaAs_2O_3) en exceso
4. Mantener en refrigeración a 4 °C hasta su análisis
5. El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 28 días.

Procedimiento

1. Se procede a una extracción líquido-líquido en un embudo de separación, introducir el volumen de 50 mL de muestra final y tratar 2 veces con 10 mL de éter, es decir a los 50 mL se le agrega 10 mL de éter y se agita, para retirar la presión que genera la reacción, se coloca de cabeza el matraz tapado y se abre la perilla.
2. Colocar la fase orgánica en un vaso de precipitado para utilizarlo posteriormente, la fase acuosa se vierte nuevamente en el embudo de separación para agregarle 10 mL de éter y se agita, se libera la presión y desechar la fase acuosa, la fase orgánica se junta con la que se colocó en el vaso de precipitado.
3. A la fase orgánica colocarla en el embudo de separación y agregarle 50 mL de NaOH al 1 N, agitar y decantar la fase acuosa que es la que contiene los fenoles en forma de fenolatos.





4. Neutralizar la fase que contiene los fenolatos, es decir llevar a un pH=7 con solución de HCl 1 N, ajustar a un volumen de 150 mL con agua destilada
5. Verter la solución en el matraz de 1 L y añadir 23 mL de bromuro de potasio al 25 %, 10 mL de HCl al 0.5 N, calentar a baño María y agitar
6. Esperar que la solución alcance una temperatura de 50 °C y añadir 25 mL de bromato de potasio al 0.3 % (la solución adquiere una coloración amarillenta)
7. Dejar en cuarto de incubación (a 28 °C) durante una hora
8. Introducir 25 mL de yoduro de potasio y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 min
9. Valorar el yodo liberado con la solución de tiosulfato de sodio 1 N, la solución pasa de rojo a transparente. Hacer lo mismo para el blanco.

Expresión de Resultados

$$\text{mg/L}_{(\text{fenol})} = ((n_2 - n_1) * 98 * 0.025 * 10000) / (1000 * V)$$

Donde:

n₂ mL de tiosulfato utilizados para el blanco

n₁ mL de tiosulfato gastados en la muestra

V volumen de mL de la muestra inicial.

Nota: Los resultados se expresan en mg/L de fenol.





Observaciones

El tiempo de incubación es muy importante, al igual, que el tiempo en que se realiza la reacción con Yoduro potásico.

Limitaciones e interferencias

Las bacterias que descomponen los fenoles, son una fuente importante de interferencias, las cuales se eliminan al preservar adecuadamente las muestras.

Para la mayoría de las muestras se requiere una destilación preliminar, para remover las interferencias. Algunas aguas residuales altamente contaminadas pueden requerir técnicas especializadas para eliminar interferencias y para la recuperación cuantitativa de los compuestos fenólicos.

Agentes oxidantes: Los agentes oxidantes tales como el cloro, deben removerse inmediatamente después del muestreo mediante la adición de sulfato ferroso o arsenito de sodio en exceso. Si los agentes oxidantes no son removidos, los compuestos fenólicos podrían oxidarse parcialmente.

Un exceso de sulfato ferroso o arsenito de sodio, no interfiere ya que estos son removidos por el procedimiento de destilación.

Los sulfuros son eliminados por acidificación de la muestra con ácido sulfúrico a un pH menor de 4 y una breve aireación por medio de agitación, los compuestos que se eliminan con esta acidificación son el ácido sulfhídrico (H_2S) y el bióxido de azufre (SO_2).

La presencia de aceites y alquitrán pueden ser eliminados por una extracción alcalina ajustando el pH entre 12 y 12,5 con hidróxido de sodio.





Extraer los aceites y el alquitrán de la solución acuosa con 50 mL de cloroformo (CHCl_3). Remover el exceso de cloroformo de la fase acuosa, calentando en un baño maría antes de proceder con la etapa de destilación.

Control de calidad

1. Cada laboratorio que utilice este método está obligado a operar un programa de control de calidad (CC) formal
2. Es obligatorio para el laboratorio mantener los siguientes registros:
 - Los nombres y títulos de los analistas que ejecutaron los análisis y el encargado de control de calidad que verificó los análisis, y
 - Las bitácoras manuscritas del analista y del equipo en los que se contengan los siguientes datos:
 - a) Identificación de la muestra
 - b) Fecha del análisis
 - c) Procedimiento cronológico utilizado
 - d) Cantidad de muestra utilizada
 - e) Número de muestras de control de calidad analizadas
 - f) Trazabilidad de las calibraciones de los instrumentos de medición
 - g) Evidencia de la aceptación o rechazo de los resultados





3. Además el laboratorio debe mantener la información original reportada por los equipos en disquetes o en otros respaldos de información
4. De tal forma que permita a un evaluador externo reconstruir cada determinación mediante el seguimiento de la información desde la recepción de la muestra hasta el resultado final
5. Cada vez que se adquiriera nuevo material volumétrico debe de realizarse la verificación de la calibración de éste tomando una muestra representativa del lote adquirido.

Seguridad

1. No ha sido determinada la carcinogenicidad de todos los reactivos con precisión. Por lo que cada sustancia química debe tratarse como peligro potencial a la salud. La exposición a estas sustancias debe reducirse al menor nivel posible
2. El laboratorio es responsable de mantener un ambiente de trabajo seguro y un archivo de las medidas de seguridad respecto a la exposición y manejo seguro de las sustancias químicas especificadas en éste método
3. Debe tenerse en un archivo de referencia de las hojas de información de seguridad el cual debe estar disponible a todo el personal involucrado en estos análisis
4. Los ácidos y bases concentradas empleados en este método pueden causar severas quemaduras e irritaciones en la piel, por lo que debe utilizarse ropa protectora tal como: Batas, guantes y lentes de seguridad





5. El Fenol es una sustancia tóxica, manipular con extremo cuidado
6. El laboratorio debe contar con una buena ventilación.

Manejo de residuos

1. Los residuos de la extracción, se mandan a tratamiento de residuos de la facultad. Una vez titulada la solución se puede desechar en la tarja.

DQO MÉTODO DE REFLUJO CERRADO (micrométodo)

Introducción

La demanda química de oxígeno (DQO) es ampliamente utilizada como una forma de medir la carga contaminante de desechos domésticos e industriales. El análisis de la DQO se basa en el hecho de que todos los compuestos orgánicos, con algunas excepciones pueden ser oxidados por la acción de un oxidante fuerte bajo condiciones ácidas a dióxido de carbono y agua, sin considerar la biodisponibilidad de las sustancias. Una de sus ventajas es la rapidez con que se obtienen la información (3 hrs) sin embargo no evalúa si la materia orgánica es biodisponible.

Principio

La muestra es digerida con dicromato de potasio en un medio fuertemente ácido, en presencia de un catalizador a alta temperatura.





Después de la digestión, el dicromato remanente es titulado con sulfato ferroso amoniacal. De esta forma se puede conocer la cantidad de dicromato de potasio consumido y por lo tanto la cantidad de materia orgánica oxidada en términos de equivalentes de oxígeno.

Interferencias

Ciertos iones inorgánicos como los cloruros, se oxidan bajo las condiciones de oxidación de la DQO, incrementando el resultado del análisis. Esta interferencia se puede eliminar con la adición de sulfato mercúrico a la muestra antes de la adición de los otros reactivos.

Preservación de muestras

Las muestras se almacenan preferentemente en botellas de vidrio. Cuando no puede llevarse a cabo la determinación de manera inmediata se conservan acidificándolas a un pH menor o igual a 2 con H_2SO_4 concentrado.

La ventaja de este método, son su economía en el empleo de reactivos, pero si la muestra contiene sólidos, debe homogenizarse para obtener resultados reproducibles.

Materiales

- Tubos de borosilicato de 20 x 150 mm con cuello roscado y tapa recubierta de teflón.
- Equipo de filtración Millipore





- Filtros Whatman GF/A de 5 cm de diámetro
- Estufa a 150 °C
- Pipetas volumétricas
- Matraces Erlenmeyer de 50 mL
- Gradillas
- Matraz Kitasato
- Guantes de asbesto

Soluciones

- 1) Reactivo de ácido sulfúrico: Añadir 10.12 g de AgSO_4 , ya sea en cristales o en polvo (grado analítico) por cada litro de H_2SO_4 concentrado, esto da una proporción de 5.5 g $\text{AgSO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$. Para un garrafón de 3.5 L de H_2SO_4 concentrado se requieren 35.42 g de AgSO_4 . Permitir su disolución de 1 a 2 días a temperatura ambiente
- 2) Solución estándar de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0.25 N: Disolver 12.25 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, previamente secado a 103°C por 2 hrs, en 1000 mL de agua destilada
- 3) Solución indicadora de ferroína: Disolver 1.485 g de 1,10 fenantrolina monohidratada y 695 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 80 mL de agua destilada. Aforar a 100 mL. También puede utilizarse el reactivo disponible comercialmente
- 4) Solución de FAS (sulfato ferroso amoniacal) Disolver 39.2 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 600 mL de agua destilada y agregar cuidadosamente 20 mL de H_2SO_4 concentrado enfriar y aforar a 1000 mL con agua destilada.





- 5) Esta solución tiene un concentración aproximada de 0.1 N, su concentración exacta se conoce cuando se titula el blanco frío el cual se corre junto con las muestras.

Procedimiento

Como medida de precaución se recomienda utilizar guantes y lentes de protección cuando se adicionen los reactivos que contienen H_2SO_4 .

- 1) Lavar previamente los tubos y tapones a utilizar con H_2SO_4 al 20 % para evitar contaminación de las muestras. Para análisis subsecuentes lavar los tubos con agua de la llave y posteriormente con agua destilada, secar perfectamente antes de adicionar los reactivos.
- 2) En un tubo de 16 x 150 mm, colocar 5 mL de muestra o de su dilución, adicionar 3 mL de solución de dicromato y con la punta de una espátula una pequeñísima porción de sulfato mercúrico (catalizador). En los blancos se adiciona agua destilada en lugar de la muestra. Si se desconoce totalmente el valor de DQO de la muestra se prueban diferentes diluciones de 1:100 y 5:100, la dilución más recomendable será aquella que no cambie la coloración del dicromato.
- 3) Adicionar cuidadosamente 7 mL del reactivo de ácido sulfúrico, permitiendo que resbale por las paredes internas del tubo.





- 4) Si es necesario, colocar el tubo en un baño de agua fría para disipar el calor de la reacción.
- 5) Cerrar herméticamente los tubos, invertir cada tubo varias veces para mezclar completamente y verificar que no hay fuga. En caso de presentarse fuga preparar otro tubo con la muestra correspondiente.
- 6) Colocar los tubos en la estufa precalentada a 150 ± 2 °C, para permitir la digestión durante 2 hrs.
- 7) Preparar tubos adicionales que servirán como blanco frío para conocer la concentración exacta de la solución FAS. Este tubo se prepara simultáneamente a las muestras, pero se mantiene bien tapado a temperatura ambiente.
- 8) Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente retirar las tapas verter su contenido en matraces.
- 9) Enjuagar el tubo con poca agua destilada y adicionarla al matraz.
- 10) Agregar dos gotas del indicador de ferroína y titular con la solución FAS agitando constantemente, hasta el vire del indicador de azul verdoso a pardo.

Expresión de resultados

Para conocer el valor de DQO total y soluble de una muestra, siga el siguiente ejemplo del cálculo.

Ejemplo

(mL) FAS gastados en la titulación

Blanco caliente: 3 mL

Blanco frío: 3 mL





FAS de la muestra: 2.3 mL

Volumen de la muestra: 5 mL

Calculo:

1. La normalidad de la solución FAS se calcula una vez titulado el blanco frío de la siguiente manera:

$$N_{FAS} = \left(\frac{(mL \text{ solución } K_2Cr_2O_7) * (N \text{ } K_2Cr_2O_7)}{mL \text{ de FAS gastados para titular}} \right)$$

Substituyendo:

$$N_{FAS} = \frac{(3mL) * (0.25)}{3mL} = 0.25 N$$

2. La DQO expresada en mg O₂/L se calcula a partir de la siguiente formula:

$$DQO = \frac{(mL \text{ de FAS}_{BC} - mL \text{ de FAS}_{muestra}) * (N \text{ FAS}) * (8) * (1000) * (dilución)}{mL \text{ de muestra}}$$

Substituyendo:

$$DQO = \frac{(3mL - 2.3mL) * (0.1) * (8) * (1000) * (10)}{5mL}$$

Donde:

m L de FAS_{muestra}=Volumen de la solución FAS empleando para titular la muestra

m L de FAS_{BC}=Volumen de la solución FAS empleando para titular el blanco caliente





N_{FAS} =Normalidad de la solución FAS obtenida al titular el blanco frío

8=Equivalentes de oxígeno

1000= Factor para covertir de mL a litros

Recomendaciones

- Homogeneizar la muestra antes de tomar cada alícuota
- Procurar que al adicionar el H_2SO_4 la pérdida de material volátil sea mínima, esto se logra agregando muy despacio el ácido
- Si al agregar la muestra, el dicromato toma un color verde, descartar este tubo y disminuir el tamaño de la muestra diluyéndola
- El punto de equivalencia en la titulación será el primer vire de azul verdoso a pardo, aún cuando el primer color vuelva a aparecer.





Anexo 2

MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Pruebas bioquímicas (biotipificación) y fundamento de estas pruebas. La tipificación, es el uso de pruebas bioquímicas para caracterizar e identificar a las bacterias hasta especie, lo que da un biotipo, utilizando sustratos o poniendo de manifiesto la presencia de productos metabólicos específicos.

La identificación microbiana se da en dos pasos:

- 1.- Pruebas primarias: En las cuales se puede determinar la familia, o incluso el género a la que pertenece un microorganismo aislado. Éstas pruebas involucran tinción de Gram, morfología, prueba de la catalasa, reacción de oxidasa, prueba óxido fermentación de la glucosa, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis además de movilidad y reducción de nitratos
- 2.-Pruebas secundarias y terciarias se realizan a efectos de determinar la especie. Éstas pruebas dependen de la familia o genero determinado.

Enseguida, se mencionan las pruebas bioquímicas mas utilizadas con fines de identificación microbiana.





OXIDASA. Basada en la producción bacteriana de un enzima oxidasa. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que actúa en la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

CATALASA. Es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos, si se acumula es letal para las células.

MEDIO KLIGLER o Agar Hierro de Kligler (AHK). Determina la capacidad de un microorganismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción, o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico (H_2S). El Medio de Kligler (AHK) sirve para determinar las fermentaciones de los hidratos de carbono, y la producción de ácido sulfhídrico.

Un microorganismo puede utilizar diversos sustratos incorporados en el medio, los sustratos metabolizados son usados para diferenciar entre varios grupos, géneros o especies, sobre todo entre las Enterobacterias.

Este medio contiene dos hidratos de carbono: lactosa y glucosa.





Algunos microorganismos tienen la capacidad de fermentar ambos sustratos, otros microorganismos solo fermentan la glucosa y otros no son capaces de fermentar ni la lactosa ni la glucosa. Ésta fermentación se produce aeróbicamente (en el pico de la flauta) y anaeróbicamente (en la capa inferior del cultivo). La fermentación de la glucosa (alcalina/ácida), se observa después de haber incubado entre 18 y 24 horas cuando en el pico de flauta torna de color rojo (alcalino), lo que indica que se ha realizado la degradación aeróbica de la glucosa, que ha sido consumida por completo y el organismo comienza a utilizar las peptonas que se encuentran en el medio, para obtener los nutrientes para su crecimiento; el catabolismo de las peptonas libera amoníaco dando un p H alcalino con el rojo de fenol (indicador incorporado al medio); y en la capa profunda del tubo es ácida (alcalina/ácida) se observa un color amarillo debido a la degradación anaeróbica de la glucosa. Aquí, la glucosa también es degradada después de 18 a 24 horas de incubación; sin embargo, se forman productos terminales ácidos dando como resultado un p H ácido (color amarillo).

Cuando los microorganismos tienen la capacidad de fermentar ambos hidratos de carbono, en el medio se observa una producción ácida/ácida dando color amarillo tanto en el pico de flauta como en la capa profunda, después de haber incubado 18 a 24 horas.





Entonces, cuando el microorganismo no fermenta ni la lactosa ni la glucosa utiliza las peptonas para obtener sus nutrimentos en la parte aerobia, que se encuentra en el pico de flauta de color rojo intenso, debido a la producción de amoníaco, sin embargo en la parte profunda del medio no haya cambio (alcalina/sin cambio), pero también, puede utilizar la peptona de manera anaerobia o aerobia, donde tanto el pico de flauta como la capa profunda son alcalinas (rojo).

TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI). Determina la capacidad de un organismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción ácido sulfhídrico (H_2S). Es un medio sumamente útil para la identificación de microorganismos entéricos Gram negativos por medio de su capacidad para fermentar dextrosa, lactosa y sacarosa, y deliberar sulfuros. En caso de que un microorganismo fermente dextrosa únicamente, la pequeña cantidad de ácido producido por la utilización de dextrosa (visible como un plano inclinado amarillo en las primeras horas de incubación) se oxida en condiciones aerobias en dicho plano, que luego vuelve al estado alcalino (rojo). En el fondo, en condiciones anaerobias, la reacción no se invierte y se mantiene el estado ácido (amarillo). Los microorganismos que producen H_2S muestran ennegrecimiento del agar. Los microorganismos que fermentan la lactosa y/o sacarosa muestran plano y fondo ácidos (amarillo).





La formación de gas se muestra por burbujas en el fondo, a veces el medio se divide.

AGAR HIERRO LISINA (LIA). Permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de ácido sulfhídrico (H_2S). Es más sensible que TSI para la detección de H_2S .

Las siguientes pruebas también son muy utilizadas y sus fundamentos bioquímicos se indican más profundamente, porque se utilizaron para la adaptación del micrométodo.

UTILIZACIÓN DE CITRATO. Determina la capacidad de un microorganismo para utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para metabolismo y desarrollo. El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs). Es una prueba útil en la identificación de Enterobacterias y se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y/o la alcalinización del medio, observándose un color azul en el medio tras la incubación de 18 a 24 horas debido a que hubo la formación de productos alcalinos y se visualizan con el indicador azul de bromotimol que vira a alcalino a un pH de 7.6. El medio incluye citrato de sodio, un anión, como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno.





Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con la producción de amoníaco y así alcalinizando el medio. Esta prueba es positiva cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría acompañado de un vire del indicador al azul o solamente crecimiento del microorganismo, esto es posible debido a que, para que el desarrollo del microorganismo sea visible, debe encontrarse en la fase logarítmica, la cual es factible sólo si el carbono y el nitrógeno han sido asimilados.

REACCIÓN DE LA UREASA. El sustrato urea es una diamina de ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida. La hidrólisis de la urea es catalizada por la enzima ureasa, la cual es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. La ureasa es considerada una enzima constitutiva, dado que es sintetizada por bacterias sin tener en cuenta la presencia o ausencia de su sustrato. Esta prueba determina la capacidad de un organismo de hidrolizar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Dicha acción se puede detectar por el vire del indicador rojo de fenol hacia un color rojo rosado que indica la alcalinización del medio por la presencia del amoniaco.

REDUCCIÓN DE NITRATOS. La reducción del nitrato (NO_3) en nitrito (NO_2) y en gas nitrógeno (N_2), tiene lugar generalmente en condiciones anaerobias, en las cuales un organismo realiza su respiración con el nitrato, el que sirve como aceptor de electrones.





La mayoría de las bacterias aerobias son anaerobias facultativas y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. En la reducción del nitrato, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculas específicas. A través de esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre.

Ésta reacción se revela mediante dos reactivos: Reactivo A (α -naftilamina y ácido acético 5 N) y Reactivo B (ácido sulfanílico y ácido acético 5 N). Un resultado positivo lo da el color rojo, que indica la presencia de nitritos. La ausencia de color después de haber adicionado los reactivos puede indicara que los nitratos no han sido reducidos (una verdadera reacción negativa) o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos, como óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), nitrógeno molecular (desnitrificación). Dado que los reactivos detectan sólo nitritos, este último proceso llevaría a una lectura falsa negativa. Por lo tanto, es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas. Los iones zinc reducen los nitratos, y el desarrollo de un color rojo tras adicionar el polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirman la reacción negativa verdadera, pero si no aparece el color rojo tras haber adicionado el polvo de zinc confirma la prueba positiva.

FENILALANINA DESAMINASA. La fenilalanina es un aminoácido, que por desaminación oxidativa forma un cetoácido, (ácido fenilpirúvico). Sólo los génes Proteos y Providencia poseen esta





enzima, que permite diferenciarlos del resto de las enterobacterias. La prueba se basa en la detección del ácido fenilpirúvico luego del desarrollo del microorganismo en un medio que contiene fenilalanina. Para eso se agrega cloruro férrico que forma un complejo de color verde con el ácido fenilpirúvico que indica reacción positiva. El medio de cultivo no puede contener extractos de carne o peptonas por su contenido variable en fenilalanina.

ARGININA, ORNITINA Y LISINA DESCARBOXILASA. La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de ejercer acción a los aminoácidos en su grupo carboxilo (COOH), dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico. Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la reacción es completa e irreversible.

Los aminoácidos ensayados habitualmente para identificación son la Lisina, la Ornitina y la Arginina. El caldo descarboxilasa de Moeller, es el medio base más común usado para la determinación de las descarboxilasas en las Enterobacterias. Se prepara un tubo con el aminoácido a ensayar y un tubo control sin ningún aminoácido. Se cubren con una capa de aceite mineral (vaselina líquida, para hacer el medio anaerobio e inducir que ocurra la fermentación de la glucosa). Luego, si el aminoácido es descarboxilado, se forman aminas que provocan un retorno al color original del medio o un viraje al alcalino.





El aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina (una diamina) y anhídrido carbónico por acción de la enzima específica lisina-descarboxilasa.

El aminoácido L-ornitina es descarboxilado por la enzima ornitina-descarboxilasa para dar la diamina putrescina y anhídrido carbónico.

El aminoácido L-arginina es catabolizado a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultáneamente o separadamente. Estos sistemas son el de arginina-dehidrolasa y el de arginina-descarboxilasa. En el sistema de la descarboxilasa la arginina sufre una descarboxilación para dar agmatina y este producto a su vez se desdobla en putrescina y urea mediante la enzima agmatinasa. En el sistema dehidrolasa, la descomposición de la L-arginina, se produce en dos etapas: primero una descomposición de la arginina en L-citrulina, seguido por un sistema de desdoblamiento de la citrulina. La reacción general produce la formación de L-ornitina, CO_2 y NH_3 del sustrato L-arginina.

FERMENTACIÓN DE GLUCOSA, LACTOSA Y OTROS CARBOHIDRATOS. Para identificar los diferentes géneros de Enterobacterias, se utiliza la proporción de productos de fermentación de la glucosa. Se conocen dos tipos generales: la fermentación ácido-mixta y la fermentación del 2,3-butanodiol, donde se forman cantidades menores de ácido, acetato, succinino y los principales productos son butanodiol, etanol, H_2 y CO_2 .

La determinación de la capacidad de fermentación de la Glucosa es importante en las primeras etapas de identificación de bacterias quimiótrofas.





Se utiliza un caldo que contiene glucosa (azúcar del cual la mayoría de las bacterias quimiótrofas pueden obtener energía, ya sea por fermentación o respiración), peptona y un indicador de p H que permite detectar la producción de ácidos (característica de la fermentación de la glucosa)

Además en la fermentación se produce gas, ya sea CO₂ solo o una mezcla de H₂ y CO₂. Ambos son gases y se detecta por la formación de una burbuja en una campana de Durham presente en el medio.

La fermentación bacteriana de la lactosa es más compleja que la de la glucosa. La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa, conectadas mediante un átomo de oxígeno que constituye lo que se conoce como unión galactósidas. Por hidrólisis se destruye esta unión, liberándose glucosa y galactosa. Para que un microorganismo utilice la lactosa deben estar presentes dos enzimas: la β -galactósido permeasa que permite la trans migración de β -galctósidos (tales como la lactosa) a través de la pared celular y la β -galatosidasa, requerida para hidrolizar la unión β -galatósido una vez que el disacárido ha ingresado en la célula. La reacción final proviene de la degradación de la glucosa.

La capacidad de fermentar diferentes carbohidratos es una característica muy utilizada en la identificación de microorganismos. Esta prueba determina la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas. Estos hidratos de





carbono son lactosa, ramnosa, arabinosa, rafinosa, melibiosa, maltosa, manitol, sorbitol, trehalosa, adonitol, entre otros. La fermentación es un proceso metabólico de oxido-reducción anaerobio en el cual un sustrato orgánico sirve como el aceptor de hidrógeno final (aceptor de electrones) en lugar de oxígeno. Los productos de la fermentación de los hidratos de carbono depende de varios factores: 1) el tipo de microorganismo que lleva a cabo el proceso de fermentación, 2) la naturaleza del sustrato, y 3) a veces, los factores ambientales como la temperatura y la acidez. Las bacterias pueden generar distintos productos finales dependiendo de la vía de fermentación que utilice: la vía alcohólica, láctica, fórmica, propiónica, y la vía acetona-butanolica.

ELABORACIÓN DE SUSTRATOS BIOQUÍMICOS EMPLEADOS

Reducción de Nitrato.

Ingredientes:

-Caldo Nitrato 16.5 g/L

Preparación:

Pesar exactamente la cantidad, disolver con agua destilada.

Esterilizar por autoclave a 118 °C, 15 libras por 15 minutos.

Interpretación:

Reactivos para revelar la reacción





1) Reactivo A (α -naftilamina 0.5 %)

2) Reactivo B (ácido sulfanílico 0.8 %)

Adicionar unas gotas del reactivo A y unas gotas del reactivo B al tubo de ensayo que contiene este medio.

Reacción positiva (+): color rojo en el medio o en la superficie (formación de un compuesto diazoico)

Reacción negativa (-): incoloro, una vez que fue incolora adicionar polvo de zinc la coloración cambia a rojo.

Producción de Indol:

Ingredientes:

Peptona de caseína*	0.2 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Agua destilada pH = 7.0 \pm 0.05	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada.

Esterilizar por autoclave a 118 °C, 15 libras por 15 minutos.

Interpretación

Para revelar la reacción, se utiliza el reactivo de Ehrlich, adicionar dos gotas del reactivo al tubo de ensayo.

Reacción positiva (+): se observa rojo o un anillo rojo en la superficie del medio.

Reacción negativa (-): se observa incolora o ligeramente amarilla.





*La caseína contiene 1.2 g de triptófano por cada 100 g.

Reacción de Ureasa de Christensen:

Ingredientes:

Peptona	0.001 g
Cloruro de sodio	0.005 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0.002 g
Glucosa (dextrosa)	0.001 g
Urea (20 %)	0.020 g
Rojo de fenol	0.0013 g
Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada.

Esterilizar por autoclave a 118 °C, 15 libras por 15 minutos.

Interpretación

Reacción positiva (+): se observa cambio de color del medio a un naranja intenso a rojo rosado intenso.

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio naranja tenue.





Utilización de Citrato de Simmons:

Ingredientes:

-Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	0.002 g
-Monofosfato de amonio ($(NH_4)H_2PO_4$)	0.01 g
-Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	0.01 g
-Citrato de sodio	0.02 g
-Azul de bromotimol	0.0008 g

Preparación

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada.

Esterilizar por autoclave a 118 °C, 15 libras por 15 minutos.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color verde bandera fuerte a un azul intenso.

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio verde tenue.





Descarboxilación de aminoácidos

Lisina Descarboxilasa (LDC)

Ingredientes:

-L-Lisina (2 %)	0.2 g
-Base de Mouller (BBL)	0.105 g
-Agua destilada	10.0 m L

Preparación

Disolver la base de Mouller en el agua destilada, adicionar el aminoácido L-Lisina. Esterilizar por autoclave a 118 °C, 15 libras por 15 minutos.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color violeta intenso ó violeta tenue.

Reacción negativa (-): un color amarillo tenue o no hay cambio del medio lila tenue.

Ornitina Descarboxilasa (ODC)

Ingredientes:

-L-Ornitina (2 %)	0.2 g
-Base de Mouller (BBL)	0.105 g
-Agua destilada	10.0 m L

Preparación





Disolver la base de Mouller en el agua destilada, adicionar el aminoácido L-Ornitina. Esterilizar por autoclave a 118 °C, 15 libras por 15 minutos.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color violeta intenso ó violeta tenue.

Reacción negativa (-): un color amarillo tenue o no hay cambio del medio lila tenue.

Arginina Deshidrolasa (ADH)

Ingredientes:

-Arginina (2 %)	0.2 g
-Base de Mouller (BBL)	0.105 g
-Agua destilada	10.0 m L

Preparación

Disolver la base de Mouller en el agua destilada, adicionar el aminoácido Arginina. Esterilizar por autoclave a 118 °C, 15 libras por 15 minutos.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color violeta intenso ó violeta tenue.

Reacción negativa (-): un color amarillo tenue o no hay cambio del medio lila tenue.





Fenilalanina- Desaminasa (FDA)

Ingredientes:

-DL-Fenilalanina (2 %)	0.2 g
-Extracto de levadura	0.03 g
-Glucosa (Dextrosa)	0.01 g
-Rojo de fenol	0.0002 g
-Agua destilada	10.0 m L

Preparación

Disolver los ingredientes con el agua destilada, calentar suavemente, hasta completa dilución.

Tomar el p H con un potenciómetro y ajustar a un p H de 6.55 ± 0.01 .

Esterilizar por autoclave a 118°C , 15 libras por 15 minutos.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa que al agregar el cloruro férrico (FeCl_3) al 10%, hay un cambio de coloración verde a verde oscuro

Reacción negativa (-): no hay cambio en el medio o del reactivo, naranja ambos.





Utilización de Malonato (MALO)

Ingredientes:

-Malonato de sodio	0.03 g
-Extracto de levadura	0.01 g
-Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	0.02 g
-Fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	0.006 g
-Fosfato (KH ₂ PO ₄) monopótasico	0.004 g
-Cloruro de sodio (NaCl)	0.02 g
-Glucosa (Dextrosa)	0.0025 g
-Azul de bromotimol	0.0003 g
-Agua destilada	10.0 m L

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada.

Ajustar a un p H con un potenciómetro e 6.80 ± 0.01 .

Esterilizar por autoclave a 118 °C, 15 libras por 15 minutos.

Interpretación

Reacción positiva (+): se observa color verde tenue a azul fuerte

Reacción negativa (-): no hay cambio en el color del medio (ligeramente amarillo).





Medio para Fenoles

El medio mineral para fenoles, se preparó con los siguientes reactivos:

NH_4NO_3 (g)	5.0
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (g)	0.2
$\text{MgSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)	2.0
CaCl_2 (g)	0.1
H_2O de la llave (mL)	1000

