



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN TÉCNICA DE UN SOPORTE
PLÁSTICO EN UN REACTOR DE LECHO FIJO
PARA DEGRADAR COMPUESTOS FENÓLICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA**

P R E S E N T A

MARISCAL JURADO GABRIELA



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Néstor Noé López Castillo

VOCAL: María Rafaela Gutiérrez Lara

SECRETARIO: Landy Irene Ramírez Burgos

1° SUPLENTE: Rolando Salvador García Gómez

2° SUPLENTE: Sergio Adrián García González

SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 301, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. en I. Ma. Rafaela Gutiérrez Lara

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en I. Sergio Adrián García González

SUSTENTANTE:

Gabriela Mariscal Jurado

**AGRADECIMIENTO ESPECIAL POR EL APOYO ECONÓMICO BRINDADO
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO AL PROYECTO DGAPA PAPIIT
IN 106009-2**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la facultad de Química por ser mi casa de estudio.

A mi familia por su apoyo incondicional durante este tiempo.

A los profesores de la carrera de Ingeniería Química, mi formación académica y universitaria se la debo a ellos.

Agradezco a mis sinodales por su tiempo dedicado y comentarios a este trabajo de tesis. A la M. en I. Ma. Rafaela Gutiérrez Lara por supervisar mi trabajo, por sus sugerencias y observaciones. Al Dr. Alfonso Durán por permitirme ser parte de su equipo durante este tiempo. Al M. en I. Sergio García por su tiempo y consejos en este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 301 por hacer más grata mi estancia. En especial a Flor y Axel, gracias por tantas risas y buenos momentos, por su ayuda.

A mis amigos de la facultad, tanto de primer semestre como aquellos que en el último semestre tuve la oportunidad de conocer, por lo buenos momentos que hemos llegado a compartir y espero sean más.

A mi equipo favorito, Chio, Omar, Raúl y Oswaldo, gracias por tan buenos momentos y por ser mis amigos.

A mis amigos de la prepa, por tantos años juntos y por compartir esta etapa de mi vida. A mis amigas, Karla, Mish, Ilse, Cooky y Sony, por estar juntas, por escuchar y apoyar, por las risas y los llantos. A Coquito, por todo el tercer semestre que viviste en la facultad de química siendo de arquitectura, uno de los mejores semestres. A Elihut y Nacho por ser mis amigos y escucharme, por sus consejos. Gracias también a aquellas personas que noche tras noche me acompañaron en los desvelos por tareas a través de la computadora. A Pieras por los dibujitos de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres, por que sin su apoyo este logro hubiera sido imposible. A mis hermanas porque este es un logro más para la familia.

A mi abuelitos que en este momento están en un lugar mejor.

A Oswaldo, porque en este tiempo has estado siempre y bajo cualquier circunstancia a mi lado, por soportarme cuando me pongo neurótica, en verdad gracias. Gracias por hacer mi vida más especial y por dejarme formar parte de la tuya.

Contenido

CAPÍTULO 1

1.	PROBLEMÁTICA	14
1.1.	Introducción	14
1.2.	Objetivos.....	18
1.2.1.	Objetivo general	18
1.2.2.	Objetivos particulares	18
1.3.	Hipótesis.....	18

CAPÍTULO 2

2.	ANTECEDENTES	19
2.1.	Fenol	19
2.2.	Límites máximos permisibles y legislación del fenol.....	21
2.3.	Clasificación de microorganismos	24
2.4.	Mecanismo de degradación del fenol	26
2.5.	Crecimiento microbiano	31
2.6.	Cinética enzimática	33
2.6.1.	Inmovilización enzimática.....	41
2.6.2.	Modulación y regulación enzimática, una forma de inhibición.....	43
2.7.	Cinética de crecimiento microbiano.....	48
2.8.	Teoría de la biopelícula de microorganismos	50
2.9.	Reactores de biomasa adherida a un soporte	52
2.10.	Diseño de experimentos	53

CAPÍTULO 3

3.	METODOLOGÍA.....	56
3.1.	Técnicas analíticas realizadas.....	56

3.2. Elección de soporte	58
3.3. Pruebas en el reactor biológico de lecho fijo	59
3.3.1. Operación del reactor biológico de lecho fijo a dos flujos	60
3.3.2. Diseño de experimentos	61
3.3.3. Cuantificación de la biomasa adherida al soporte	63
3.4. Cinética de degradación del fenol en un reactor por lotes.....	64
3.5. Mantenimiento del reactor biológico por lotes	64
CAPÍTULO 4	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1. Selección del soporte	66
4.2. Pruebas en el reactor biológico de lecho fijo (RBLF).....	68
4.2.1. Operación del reactor biológico de lecho fijo a diferentes flujos	68
4.3. Cinética de degradación del fenol	82
4.4. Mantenimiento del reactor biológico por lotes	92
CAPÍTULO 5	
5. CONCLUSIONES	97
6. ANEXOS.....	99
6.1. Cálculos realizados	99
6.2. Técnica de determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método directo espectrofotométrico. NMX-AA-050-SCFI-2001	103
6.3. Técnica de determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método a refluo cerrado/ método espectrofotométrico. NMX-AA-030-SCFI-2001.	105
6.4. Técnica para la determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales. NMX-AA-034-SCFI-2001.....	108

6.5. Técnica para la determinación de carbono orgánico disuelto.....	109
7. REFERENCIAS.....	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Propiedades físicas y químicas del fenol.....	19
Tabla 2.2 Síntesis y usos industriales de los fenoles (Serra, 2002).	20
Tabla 2.3 Límites máximos permisibles para los constituyentes tóxicos orgánicos semivolátiles en el extracto PECT.....	22
Tabla 2.4 Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.....	23
Tabla 2.5 Clasificación general de microorganismos por fuente de energía y carbón (Metcalf & Eddy, 2003).....	25
Tabla 2.6 Efecto de los inhibidores sobre la ecuación de Michaelis-Menten, (Voet, 2006).....	46
Tabla 3.1 Tabla Técnicas, normas, procedimientos análogos y equipos utilizados durante la experimentación.	57
Tabla 3.2 Composición de las soluciones nutritivas añadidas a los reactores.	59
Tabla 3.3 Diseño compuesto central 2^3 para el reactor biológico de lecho fijo.....	62
Tabla 3.4 Cantidad de nutrientes añadida al reactor.....	63
Tabla 4.1 Condiciones de operación del reactor de lecho fijo.	69
Tabla 4. 2 Flujo de aire suministrado por la bomba.....	71
Tabla 4.3 Resultados de remoción obtenidos en el diseño experimental.....	73
Tabla 4.4 Resultados obtenidos con la ecuación de remoción de DQO.	75
Tabla 4.5 Resultados obtenidos con la ecuación de remoción de COD.....	77
Tabla 4.6 Resultados obtenidos con la ecuación de SSV.	80
Tabla 4.7 Coeficientes cinéticos.....	85
Tabla 4.8 Efecto de los inhibidores sobre los parámetros cinéticos.....	86
Tabla 4.9 Turbidez en el reactor en batch del periodo de julio a noviembre 2009.	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Algunos compuesto aromáticos metabolizados a través del intermediario catecol. Suarez, R.M., 2003 y Pares, F. R., Juárez, G.A., 1997.....	28
Figura 2.2 Escisión meta del catecol (Suarez, R. M., 2003).....	29
Figura 2.3 Escisión orto del catecol (Suarez, R. M., 2003).....	30
Figura 2. 4 Típica curva de crecimiento de un cultivo de microorganismos en un reactor tipo batch, (Bailey y Ollis, 1986).	33
Figura 2.5 Efecto de la concentración de sustrato sobre la rapidez inicial de una reacción catalizada por una encima. (Lehninger, Nelson y Cox, 2005).....	34
Figura 2.6 Comportamiento de las diferentes especies involucrada en una reacción enzimática $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$, Bailey y Ollis, 1986.....	36
Figura 2.7 Inhibición por sustrato, Bailey y Ollis, 1986.....	41
Figura 2.8 Técnicas de inmovilización de enzimas, a) métodos químicos y b) métodos físicos.	42
Figura 2.9 Inhibición competitiva.....	46
Figura 2.10 Inhibición incompetitiva.	47
Figura 2.11 Inhibición mixta.....	47
Figura 2.12 Crecimiento de la biopelícula, parte aerobia y anaerobia.....	51
Figura 2.13 Representación geométrica de un diseño experimental 2^3	55
Figura 3.1 Reactor biológico de lecho fijo.....	61
Figura 4.1 Superficie de respuesta para la disminución de DQO.....	76
Figura 4. 2 Gráfico de contorno de las superficies de respuesta estimada para el % de disminución de la DQO.....	76
Figura 4.3 Superficie de respuesta para la disminución de COD.....	78
Figura 4. 4 Gráfico de contorno de las superficies de respuesta estimada para la remoción de COD.....	79
Figura 4.5 Superficie de de respuesta para los SSV desprendidos en el reactor..	81

Figura 4.6 Método de Mkandawire et. al.(2009) para 100 mg/L de fenol de 0 a 2 horas.	89
Figura 4.7 Método de Mkandawire et. al. (2009) para 300 mg/L de fenol de 0 a 13 horas.	90
Figura 4.8 Método de Mkandawire et. al. (2009) para 300 mg/L de fenol de 14 h a 18horas.	90
Figura 4.9 Método de Mkandawire et. al. (2009) para 500 mg/L de fenol de 0 a 11 horas.	91
Figura 4.10 Método de Mkandawire et. al. (2009) para 500 mg/L de fenol de 11 a 18 horas.	91
Figura 6. 1 Curva de calibración para la determinación de fenoles totales.	104

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1 Desestabilización del reactor por lotes al probar un repuesto de rodillo para pintar como soporte.....	67
Gráfico 4. 2 Disminución de COD y fenol a ambos flujos de operación.	69
Gráfico 4.3 Disminución de DQO a ambos flujos de operación.....	70
Gráfico 4.4 Disminución de la concentración del fenol.....	82
Gráfico 4.5 Resultados de SSV.....	83
Gráfico 4.6 Coeficiente de crecimiento celular.	83
Gráfico 4.7 Obtención de los coeficientes cinéticos de la ecuación de Monod.	84
Gráfico 4. 8 Comportamiento de la cinética de crecimiento, utilizando la ecuación de Monod.	85
Gráfico 4. 9 Inhibición mixta a 300 y 500 mg/L de fenol.....	87
Gráfico 4. 10 Disminución de COD.	88
Gráfico 4. 11 Disminución de DQO	88
Gráfico 4.12 Seguimiento puntual del consumo de fenol en un periodo de 4 meses.	92
Gráfico 4.13 Concentración de DQO del reactor por lotes durante el primer periodo.	93
Gráfico 4.14 Concentración de COD del reactor por lotes durante el pimer periodo.	94
Gráfico 4.15 Seguimiento puntual del consumo de fenol en un periodo de 2 meses.	95
Gráfico 4.16 Concentración de COD del reactor por lotes durante el segundo periodo.	95
Gráfico 4.17 Concentración de DQO del reactor por lotes durante el segundo periodo.	96
Gráfico 4.18 SST y SSV del reactor por lotes durante el segundo periodo.....	96
Gráfico 6.1 Curva de calibración de DQO para la segunda parte experimental. .	107

NOMENCLATURA

EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.

OSHA: Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de los Estados Unidos.

NIOSH: Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional.

INE: Instituto Nacional de Ecología.

PECT: Prueba de extracción para compuestos tóxicos.

COT: Carbono orgánico total.

COD. Carbono orgánico disuelto.

r_0 : Rapidez inicial.

[S]: Concentración de sustrato.

[E]: Concentración de enzima.

[ES]: Concentración del complejo enzima-sustrato.

DQO: Demanda química de oxígeno.

COD: Carbono orgánico disuelto.

SSV: Sólidos suspendidos totales.

SST: Sólidos suspendidos volátiles

Θ_{RH} : Tiempo de retención hidráulico.

r_{Max} Rapidez máxima en la ecuación de Michaelis- Menten.

k_m : Constante de Michaelis-Menten.

Y : Coeficiente de crecimiento celular.

x : Masa celular, medida como SSV.

μ : Velocidad específica de crecimiento.

k_d : Velocidad específica de muerte.

C_N : Cantidad de nutrientes, en el intervalo de 1 a 0.

C_F : Concentración de fenol, en el intervalo de 0 mg/L a 500 mg/L.

F_A : Flujo de aire suministrado por la bomba en mL/min.

CAPÍTULO 1

1. PROBLEMÁTICA

1.1. Introducción

Las nuevas reglamentaciones ambientales nacionales e internacionales de las aguas residuales hacen necesaria la modificación de los tratamientos convencionales debido a la gran demanda de agua tratada para ser reutilizada.

Actualmente en México, referente al agua para uso y consumo humano, la NOM-127-SSA1-1994 establece el límite de fenoles en 0.001 mg/L, a nivel internacional, la Agencia de Protección Ambiental (EPA), y la norma italiana 152/1999 "Texto único sobre las aguas", establecen ciertos límites máximos permisibles de fenol en agua. La Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (por sus siglas en inglés OSHA) y el Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional (NIOSH) establecen ciertos límites máximos permisibles de fenol en aire durante la jornada laboral.

El fenol y sus derivados son comúnmente usados en muchas ramas de la industria química, petroquímica, farmacéutica, papel, curtiduría, etc. Debido a esto, el fenol se encuentra generalmente en el agua residual de este tipo de industrias. Este contaminante inhibe el crecimiento de las bacterias por encima de 50 mg/L y es bactericida a concentraciones de 2000 mg/L si no están adaptadas (Bajaj, Gallert y Winter, 2008). El fenol puede ser letal para los peces a concentraciones relativamente bajas de 5-25 mg/L (Kwon y Yeom, 2009). Este es un gran problema ya que las aguas residuales con altos contenidos de compuestos fenólicos no pueden ser tratados fácilmente en plantas convencionales de tratamiento biológico debido a la toxicidad que estos contaminantes presentan para las bacterias (Estrada, 2006). Estos compuestos son muy resistentes a la degradación debido a la estabilidad de los anillos aromáticos (Leahy & Colwell 1990).

Existen varios métodos de tratamiento que se usan para remover los compuestos fenólicos, métodos electroquímicos, biológicos, oxidación química, estos son métodos destructivos ya que eliminan el fenol del agua, pero algunas veces, los métodos fisicoquímicos pueden causar problemas secundarios en los efluentes debido a la formación de compuestos intermediarios. Existen métodos de recuperación de este contaminante en aguas industriales mediante un tratamiento con NaCl, basado en la insolubilidad que presenta el fenol en soluciones salinas (Serna, Torres y Hoyos, 2003) pero al recuperar el fenol, se tiene un agua con grandes concentraciones de sal, que requiere un tratamiento posterior para eliminar esta sal.

Existen dos tipos de reactores utilizados en el tratamiento biológico, el proceso de lodos activados y los reactores de lecho, en este último, los microorganismos están sujetos en un soporte estacionario formando una biopelícula. Desde hace algunas décadas este tipo de reactores ha ganado interés debido a que la concentración de biomasa en una biopelícula puede llegar a ser diez veces mayor que la concentración en un cultivo líquido (Casey, Glennon y Hamer, 1999), esta ventaja ayuda a reducir el volumen de los equipos, mejorar la eficiencia de remoción, reducir los olores, soportar variaciones en el influente y choques tóxicos en la concentración de entrada comparados con los reactores de lodos activados. Otro punto importante es que con este tipo de reactores se elimina el clarificador posterior, el cual constituye una parte esencial en el proceso de lodos activados (Benthack, Srinivasan y Bonvin, 2000) debido a que las biopelículas ofrecen la ventaja de que la cantidad de biomasa necesaria a remover a la salida del reactor es mucho menor que en un reactor de tanque agitado con células suspendidas. El desarrollo de nuevas tecnologías para el tratamiento de aguas residuales se encamina a aquellas tecnologías donde la producción de lodos sea mínima.

Pan Li, Masayoshi y Kaneo (2009) estudiaron la degradación del fenol mediante microburbujas de aire, realizando un experimento para conocer la volatilidad de fenol a diferente pH. No encontraron una volatilidad del fenol

significativa que afectara los resultados a un pH neutro, además de no obtener una disminución significativa de carbono orgánico total (COT) con microburbujas de aire, a pH de 10.5, 4.5 y 3.1, en estos casos la disminución de COT obtenida fue menor a un 3%, mientras que para pH ácido de 2.7 y 2.3 obtuvieron una disminución de COT de un 27%.

La biodegradación del fenol es un proceso alternativo a los tratamientos fisicoquímicos y es preferido debido a la posibilidad de llegar a tener una mineralización completa, (Bajaj, et al., 2008).

El límite de un proceso biológico está relacionado con el tiempo de aclimatación de la biomasa, en este caso del fenol, y a la variabilidad en la composición del agua residual (Marrot, Moulin, Barrios y Roche, 2008). Kwon y Yeom (2009) reportan que la degradación del fenol por microorganismos esta generalmente limitado por la inhibición del sustrato y por las bajas tasas de conversión, una preadaptación con otros compuestos como el benceno y tolueno incrementa la degradación del fenol, que una preadaptación únicamente con fenol.

La dificultad asociada con la inhibición de sustrato en aguas residuales puede ser superada con estrategias tales como la inmovilización celular (Tay, Jiang, Tay, 2004). Los gránulos microbianos aerobios inmovilizados (biomasa adherida a un soporte) y cultivados en un reactor discontinuo tienen una estructura fuerte, compacta, buena capacidad de sedimentación y retención de biomasa con la capacidad para soportar altas cargas orgánicas.

Pseudomonas putida inmovilizada en membranas de fibra hueca degradó 500 mg/L de fenol completamente aproximadamente en 19 h, la tasa máxima de crecimiento específico obtenida fue de 0.393 h^{-1} . A una concentración inicial de fenol de 1000 mg/L no se obtuvo un crecimiento celular, ni la degradación del fenol se produjo, existió una inhibición por sustrato. (Tay et al., 2004).

Otro microorganismo capaz de utilizar el fenol como única fuente de carbono fue aislado de petróleo crudo en un suelo contaminado (Kwon y Yeom, 2009), y se identificó como *Pseudomonas fluorescens*, este microorganismo fue capaz de

degradar muchos compuestos aromáticos como el fenol, benceno, tolueno y ácido benzoico.

Estudios realizados por Rigo y Alegre (2003) encontraron un microorganismo capaz de crecer en concentraciones de fenol de hasta 1000 mg/L, basados en su morfología, fisiología y características bioquímicas este microorganismo fue identificado como *Candida parapsilopsis*. *Candida tropicalis* también ha sido referida como degradador de fenol.

Lin y Hsien (2009) usaron cubos de esponja de poliuretano con plástico Ballast® como medio de soporte para inmovilizar los microorganismos y tratar el agua contaminada con fenol. Bajaj, Gallert y Winter (2008) usaron granos de arcilla para jardín, como soporte en un reactor de lecho fijo para degradar el fenol en agua. Otros autores, como Guo, Ngo, Dharmawan y Palmer (2009), han usado espuma de poliuretano como soporte en reactores de lecho fijo y móvil para el tratamiento de aguas domésticas.

La degradación de los compuestos fenólicos puede llevarse a cabo bajo condiciones aerobias y anaerobias. La degradación aerobia produce pirocatecol a partir del fenol vía epoxi y la formación de un trans-diol catalizada por una enzima monooxigenasa y trans-1,2-dihidrobenceno-1,2-diol por una enzima deshidrogenasa. En la degradación anaerobia, el anillo aromático no es oxidado, es reducido y el intermediario clave en esta vía es la ciclohexanona (Rigo y Alegre, 2004).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el funcionamiento de un sistema de tratamiento biológico mediante un reactor biológico de lecho fijo utilizando fibras como soporte, para el tratamiento de aguas residuales sintéticas conteniendo compuestos fenólicos como contaminantes modelo.

1.2.2. Objetivos particulares

- Establecer el estado del arte en la investigación de reactores biológicos de lecho fijo, aplicados a la depuración de aguas residuales sintéticas conteniendo compuestos orgánicos y en particular, compuestos derivados del fenol.
- Llevar a cabo la cinética de la degradación del fenol, para determinar en cuanto tiempo cierta cantidad de fenol es degradado por los microorganismos.
- Determinar la cantidad de biomasa contenida en el soporte.
- Determinar las mejores condiciones de operación con el soporte seleccionado al utilizar diferentes concentraciones de fenol, flujo de aire y concentración de nutrientes.

1.3. Hipótesis

Si se logra que la biomasa se adhiera a un soporte fijo formando una biopelícula, se reducirá la cantidad de biomasa suspendida en el efluente de salida así como la producción de lodos en el reactor. Además se podrán degradar concentraciones más altas de fenol, se tendrá un reactor más compacto y se reducirá el tiempo de retención hidráulico para el tratamiento del agua sintética.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1. Fenol

La presencia de fenoles en el medio ambiente es consecuencia tanto de acciones naturales, como del aporte antropogénico, fundamentalmente, de carácter industrial.

La mayoría de los compuestos fenólicos encontrados en aguas residuales son de origen industrial. El cual es utilizado 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, fabricación de resinas, incluso 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 actividades agrícolas y su entrada en la cadena alimenticia. En la tabla 2.1, se encuentran las propiedades del fenol y en la tabla 2.2 la gran variedad de fenoles utilizados comúnmente en la industria y su origen.

El fenol en forma pura es un sólido cristalino de color blanco-incoloro a temperatura ambiente. Su fórmula química es C_6H_5OH .

Tabla 2.1 Propiedades físicas y químicas del fenol

Propiedades del fenol	
Peso Molecular	94.11 g/gmol
Punto de Fusión	41°C
Punto de ebullición	182°C
Presión de vapor a 20°C	0.2 mmHg
Presión de vapor a 100°C	54 hPa
Solubilidad a 15°C	82 000 mg/L
Concentración de saturación en aire a 20°C	0.77 g/m ³

La toxicidad de los fenoles varía con la posición y el número de sustituyentes en el núcleo aromático. 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- . También se produce un aumento en la toxicidad con el número y el volumen de los sustituyentes (Ahumada y Gómez, 2009)

Algunos compuestos fenólicos se han encontrado en mejillones como es el caso del pentaclorofenol, tetraclorofenol y otros compuestos orgánicos halogenados. El pentaclorofenol se ha encontrado también en aves, corroborando así su condición de contaminante global (Serra, 2002).

Tabla 2.2 Síntesis y usos industriales de los fenoles (Serra, 2002).

Tipo de fenol	Origen	Usos
Fenol	Cumeno, benceno	Resinas fenólicas, bisfenol A y alquilfenoles.
Cresoles	Petróleo o brea	Resinas fenólicas, desinfectantes, antioxidantes, limpiadores metálicos y disolvente de esmaltes.
Clorofenoles	Fenol, clorobenceno y nitrobenzeno	Biocidas e intermedios para biocidas y preservación de la madera.
Alquilfenoles	Fenol	Antioxidantes, gasolina, aceite, grasas y plásticos.
Pirocatecol	Resinas naturales y ligninas	Antioxidantes y colorantes.
Resorcinol	Halofenoles, ácido bencenodisulfónico, ácido fenosulfónico y benceno	Antioxidantes, colorantes, antisépticos, medicamentos y explosivos.
Hidroquinona	Anilina	Fotografía, antioxidantes y medicamentos.
Nitrofenoles	Fenol, benceno y nitroclorobenceno	Tintes, intermediarios de síntesis y explosivos.

2.2. Límites máximos permisibles y legislación del fenol

La agencia de protección ambiental (EPA) recomienda que en aguas superficiales (lagos y arroyos) el límite de concentración de fenol no debe exceder de 3.5 mg/L. La Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido un límite de exposición ocupacional de 5 ppm de fenol en el aire dentro de un área de trabajo en una jornada de 8 horas diarias. El Instituto Nacional de Seguridad Ocupacional y Salud (NIOSH) recomienda que el aire en el lugar de trabajo no deba contener más de 5 ppm durante una jornada diaria de 10 horas y que la concentración no deba exceder 16 ppm durante un período de 15 minutos.

La norma italiana 152/1999 “Texto único sobre las aguas” se refiere a salvaguardar la calidad del ambiente acuático de las descargas de contaminantes con particular consideración a los microorganismos, estableciendo valores límite de 0.05 mg/L de fenol presente en aguas residuales industriales y con una concentración de 0.01 mg/L de compuestos fenólicos en aguas frescas.

En México, la norma oficial mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Esta Norma Oficial Mexicana establece el procedimiento para identificar si un residuo es peligroso, el cual incluye, los listados de los residuos peligrosos y las características que hacen que se consideren como tales. Los residuos peligrosos, en cualquier estado físico, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, inflamables, tóxicas y biológico-infecciosas, y por su forma de manejo pueden representar un riesgo para el equilibrio ecológico, el ambiente y la salud de la población en general.

Los fenoles y compuestos fenólicos se encuentran incluidos en estas listas como constituyentes tóxicos. La tabla 2.3 muestra los límites máximos permisibles para los contaminantes orgánicos considerados tóxicos.

Tabla 2.3 Límites máximos permisibles para los constituyentes tóxicos orgánicos semivolátiles en el extracto PECT.

No. CAS ¹	Contaminante	LMP ² (mg/L)
94-75-7	ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	10
93-72-1	ácido 2,4,5-triclorofenoxipropiónico (Silvex)	1
57-74-9	clordano	0.03
95-48-7	o-cresol	200
108-39-4	m-cresol	200
106-44-5	p-cresol	200
1319-77-3	cresol	200
121-14-2	2,4-dinitrotolueno	0.13
72-20-8	endrin	0.02
76-44-8	heptacloro (y su epóxido)	0.008
67-72-1	hexacloroetano	3
58-89-9	lindano	0.4
74-43-5	metoxicloro	10
98-95-3	nitrobenceno	2
87-86-5	pentaclorofenol	100
8001-35-2	toxafeno	0.5
95-95-4	2,4,5-triclorofenol	400
88-06-2	2,4,6-triclorofenol	2

¹No. CAS: Número del Chemical Abstracts Service (Servicio de Resúmenes Químicos).

²LMP: Límite Máximo Permissible.

En la norma oficial mexicana NOM-127-SSA-1994 denominada Salud ambiental, agua para uso y consumo humano, se refiere a los límites permisibles de calidad y tratamientos a los cuales debe someterse el agua para su potabilización, en esta norma se mencionan los límites máximos para fenol y compuestos fenólicos en agua de consumo así como las características del agua potable y los límites máximos permisibles de otros contaminantes. En la tabla 2.4 se enlistan los compuestos y límites máximos permisibles establecidos en esta norma.

Tabla 2.4 Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

Característica	Límite permisible	Unidad
Aluminio	0.20	mg/L
Arsénico (Nota 2)	0.05	mg/L
Bario	0.70	mg/L
Cadmio	0.005	mg/L
Cianuros (como CN ⁻)	0.07	mg/L
Cloro residual libre	0.2-1.50	mg/L
Cloruros (como Cl ⁻)	250	mg/L
Cobre	2	mg/L
Cromo total	0.05	mg/L
Dureza total (como CaCO ₃)	500	mg/L
Fenoles o compuestos fenólicos	0.3	mg/L
Fierro	0.30	mg/L
Fluoruros (como F ⁻)	1.50	mg/L
Hidrocarburos aromáticos		
Benceno	10	mg/L
Etilbenceno	300	mg/L
Tolueno	700	mg/L
Xileno (tres isómeros)	500	mg/L
Manganeso	0.15	mg/L
Mercurio	0.001	mg/L
Nitratos (como N)	10	mg/L
Nitritos (como N)	1	mg/L
Nitrógeno amoniacal (como N)	0.50	mg/L
pH	6.5-8.5	mg/L
Plaguicidas		
Aldrín y dieldrín (separados o combinados)	0.03	µg/L
Clordano (total de isómeros)	0.20	µg/L
DDT (total de isómeros)	1	µg/L
Gamma-HCH (lindano)	2	µg/L
Hexaclorobenceno	1	µg/L
Heptacloro y epóxido de heptacloro	0.03	µg/L
Metoxicloro	20	µg/L
2,4 – D	30	µg/L
Plomo	0.01	µg/L
Sodio	200	µg/L
Sólidos disueltos totales	1000	µg/L
Sulfatos (como SO ₄ =)	400	µg/L
Sustancias activas al azul de metileno (SAAM)	0.50	µg/L

Característica	Límite permisible	Unidad
Trihalometanos totales	0.20	µg/L
Yodo residual libre	0.2-0.5	µg/L
Zinc	5	µg/L

Nota 1. Los límites permisibles de metales se refieren a su concentración total en el agua, la cual incluye los suspendidos y los disueltos.

Nota 2. El límite permisible para arsénico se ajustará anualmente.

2.3. Clasificación de microorganismos

Los organismos que usan carbón orgánico para la formación de su tejido celular son llamados heterótrofos, mientras que los que usan el carbón proveniente del dióxido de carbono (CO₂) son llamados autótrofos. La conversión del CO₂ a tejido celular es un proceso de reducción que requiere una entrada de energía. Los organismos autótrofos requieren más energía para su síntesis que los heterótrofos, esto se ve reflejado en rapidez de crecimiento lentas.

La energía requerida puede ser suministrada por luz o por reacciones químicas de oxidación. Aquellos que usan la luz como fuente de energía son llamados fotótrofos, y según la fuente de carbón que utilicen son autótrofos o heterótrofos. Mientras que aquellos organismos que derivan su energía de reacciones químicas son llamados quimiótrofos, los cuales a su vez pueden ser autótrofos o heterótrofos.

En nuestro caso de estudio se tienen organismos quimio-heterótrofos, los cuales obtienen su energía de la oxidación de compuestos orgánicos, en este caso, del fenol.

En la tabla 2.5 se encuentran la clasificación de microorganismos según Metcalf & Eddy, 2003.

Tabla 2.5 Clasificación general de microorganismos por fuente de energía y carbón (Metcalf & Eddy, 2003).

Clasificación	Fuente de energía	Fuente de carbón
Autótrofos		
Foto-autótrofos	Luz	CO ₂
Quimio-autótrofos	Reacciones de oxido-reducción inorgánicas	CO ₂
Heterótrofos		
Quimio-heterótrofos	Reacciones de óxido-reducción orgánicas	Carbón orgánico
Foto-heterótrofos	Luz	Carbón orgánico

2.3.1. Metabolismo para microorganismos quimio-heterótrofos

Los organismos quimio-heterótrofos pueden ser agrupados de acuerdo a su tipo de metabolismo y a sus requerimientos de oxígeno molecular. Los organismos que generan energía mediante enzimas en el transporte de electrones, de un donador de electrones a un aceptor externo de electrones, tienen un metabolismo respiratorio. Un metabolismo fermentativo no involucra la participación de un aceptor externo de electrones.

Cuando el oxígeno molecular es usado como un aceptor externo de electrones en la respiración, el proceso se llama respiración aerobia. Los organismos que dependen de la respiración aerobia para satisfacer sus necesidades energéticas y que sólo pueden existir en presencia de oxígeno molecular, son llamados aerobios obligados. Al oxidarse los compuestos inorgánicos como nitratos y nitritos, estos pueden funcionar como aceptores de electrones para algunos organismos con metabolismo respiratorio en ausencia de oxígeno molecular, estos son llamados organismos anóxicos. Los organismos que generan su energía mediante la fermentación y que sólo pueden existir en un entorno que carece de oxígeno, son llamados anaerobios obligados.

Los organismos facultativos son aquellos que tienen la habilidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno molecular. Dentro de estos existen aquellos organismos que pueden cambiar de una respiración aerobia a un proceso fermentativo dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno, también existen otros organismos que son anaerobios aero-tolerantes que tiene estrictamente un metabolismo fermentativo pero son insensibles a la presencia de oxígeno molecular.

2.4. Mecanismo de degradación del fenol

La biodegradación es un proceso por el cual algunas sustancias químicas pueden ser utilizadas como sustrato por microorganismos, que las emplean para producir energía y crear otras sustancias como aminoácidos, nuevos tejidos y nuevos organismos.

La biodegradación de un componente orgánico de un ecosistema se da principalmente por la actividad metabólica de microorganismos presentes (Lazcano, 2010). Existen tres tipos de biodegradación:

- Biodegradación primaria: Implica la transformación mínima de un compuesto, obteniendo pequeñas alteraciones en la estructura química del compuesto dando como resultado productos de bajo peso molecular.
- Biodegradación aceptable: Se remueven ciertas propiedades no deseadas del compuesto tales como toxicidad y espumabilidad.
- Biodegradación final: El compuesto orgánico es totalmente utilizado por los microorganismos, dando como resultado dióxido de carbono, agua, sales minerales y compuestos inorgánicos; también se conoce como biodegradación última o mineralización.

Este proceso se realiza por medio de enzimas y mecanismos a nivel de membrana que permite la entrada de nutrientes y dependen de varios factores como las características del contaminante, su concentración, los microorganismos

presentes, las condiciones geoquímicas y ambientales, entre otras (Ahumada y Gómez, 2009).

Entre los microorganismos capaces de crecer a expensas de compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía se encuentran muchas bacterias aerobias y anaerobias, algunas levaduras y hongos. Todos estos compuestos asimilan dichos compuestos a través de vías catabólicas que convergen en las rutas centrales del metabolismo.

La reacción de degradación del fenol provee a la bacteria de energía para su crecimiento y reproducción. Para que el microorganismo pueda disponer del material orgánico como alimento es necesario que este soluble en el medio, de lo contrario necesitará hidrolizarse para que pueda atravesar la pared celular del microorganismo.

Los organismos procariotas pueden metabolizar una amplia variedad de compuestos aromáticos a través de rutas degradativas relacionadas por compuestos intermediarios comunes. En la figura 2.1 se indican algunos compuesto aromáticos metabolizados por rutas que implica la formación del catecol como intermediario, el cual es un compuesto central en el que convergen la mayoría de las rutas degradativas de compuestos aromáticos que contiene un grupo OH en posición orto (Pares, F. R., Juárez, G.A.,1997, Suárez, R. M.,2003). Una ruta típica para metabolizar un compuesto aromático es la hidroxilación del anillo para formar el catecol y luego oxidar el anillo vía orto o meta.

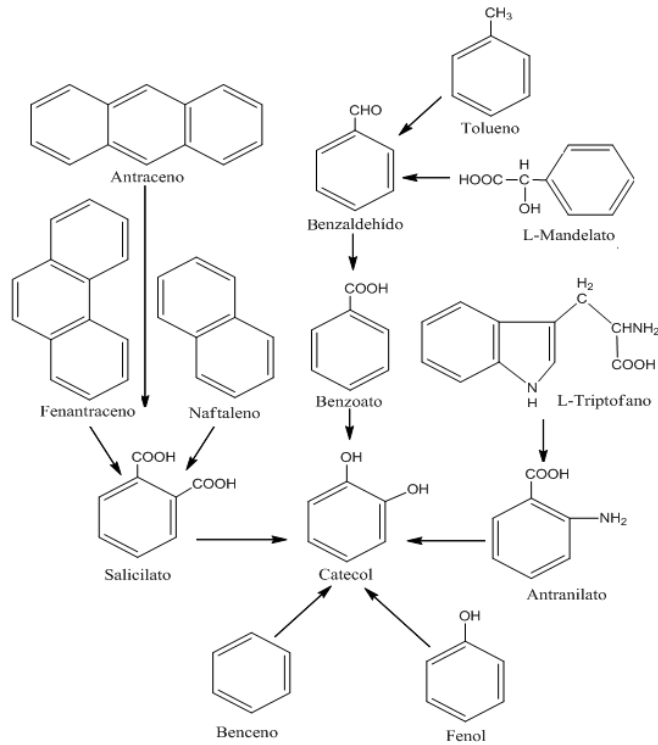


Figura 2.1 Algunos compuesto aromáticos metabolizados a través del intermediario catecol. Suarez, R.M., 2003 y Pares, F. R., Juárez, G.A., 1997.

Durante la biodegradación de una molécula aromática se siguen dos pasos: la activación del anillo y el rompimiento del anillo.

- **Activación del anillo:** Involucra la incorporación de oxígeno molecular al anillo, esto es, la hidroxilación del núcleo aromático. Este paso es llevado a cabo por enzimas conocidas como oxigenasas. Las monooxigenasas o hidroxilasas, características de hongos y otras eucariotas, catalizan la incorporación de un sólo átomo de oxígeno para formar un epóxido que puede hidratarse para dar un transdihidrodiol. Las dioxigenasas características de las bacterias, catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno molecular en un solo paso para formar un dihidrodiol.

Los dihidrodiolés después se oxidan a derivados dihidroxilados, como los catecoles, que son los precursores del rompimiento del anillo (Razo, 2003).

- Escisión del anillo: El catecol puede ser oxidado ya sea por la vía orto o meta. Escisión orto o ruta del β -cetoadipato tiene lugar entre los carbonos que llevan los grupos OH (intradiol, carbonos 1 y 2). Los productos de esta primera reacción oxigenolítica son cis-muconato, este se transforma a γ -cetoadipato enol-lactona, a partir de este compuesto se forma el β -cetoadipato que finalmente se degrada a succinato y acetyl-CoA.

Escisión meta: Esta escisión se produce entre el carbono que lleva el grupo funcional OH y el carbono adyacente (extradiol, carbonos 2 y 3) dando lugar al semialdehído 2-hidroxi-3-oxoheptanoico, transformándose en acetaldehído y piruvato.

La figura 2.2 muestra el mecanismo de escisión en posición meta y la figura 2.3 el mecanismo de escisión orto.

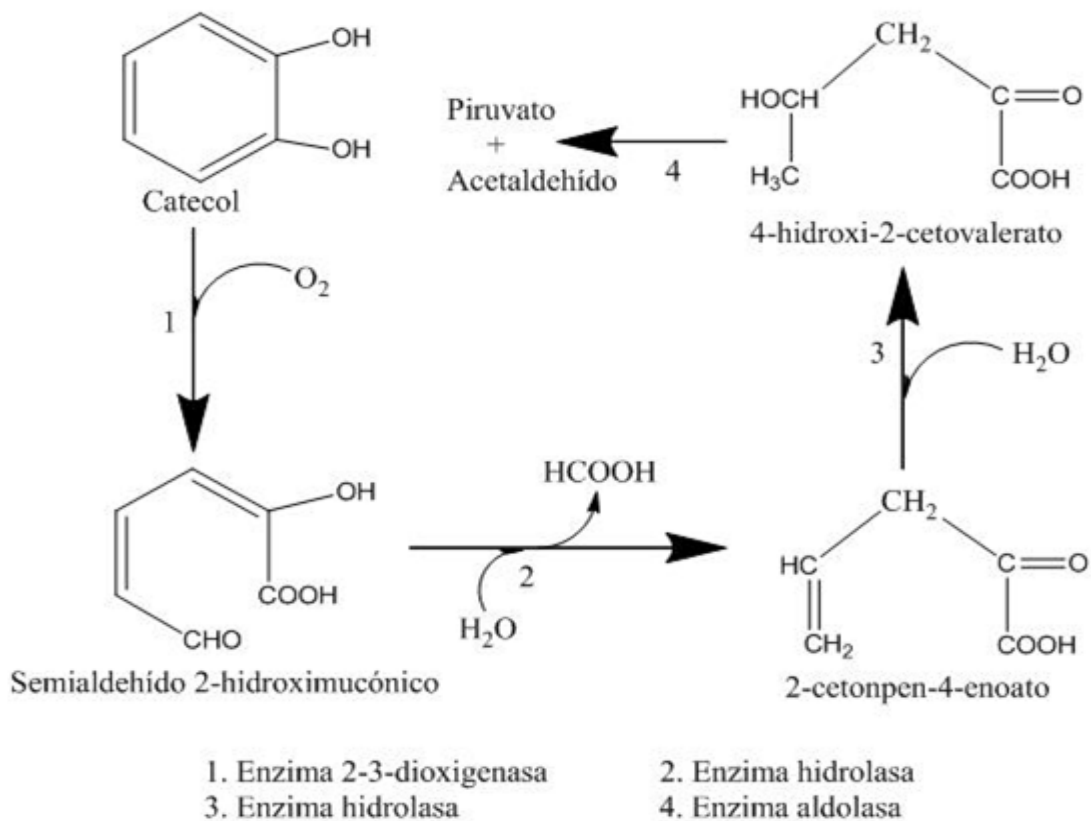


Figura 2.2 Escisión meta del catecol (Suarez, R. M., 2003).

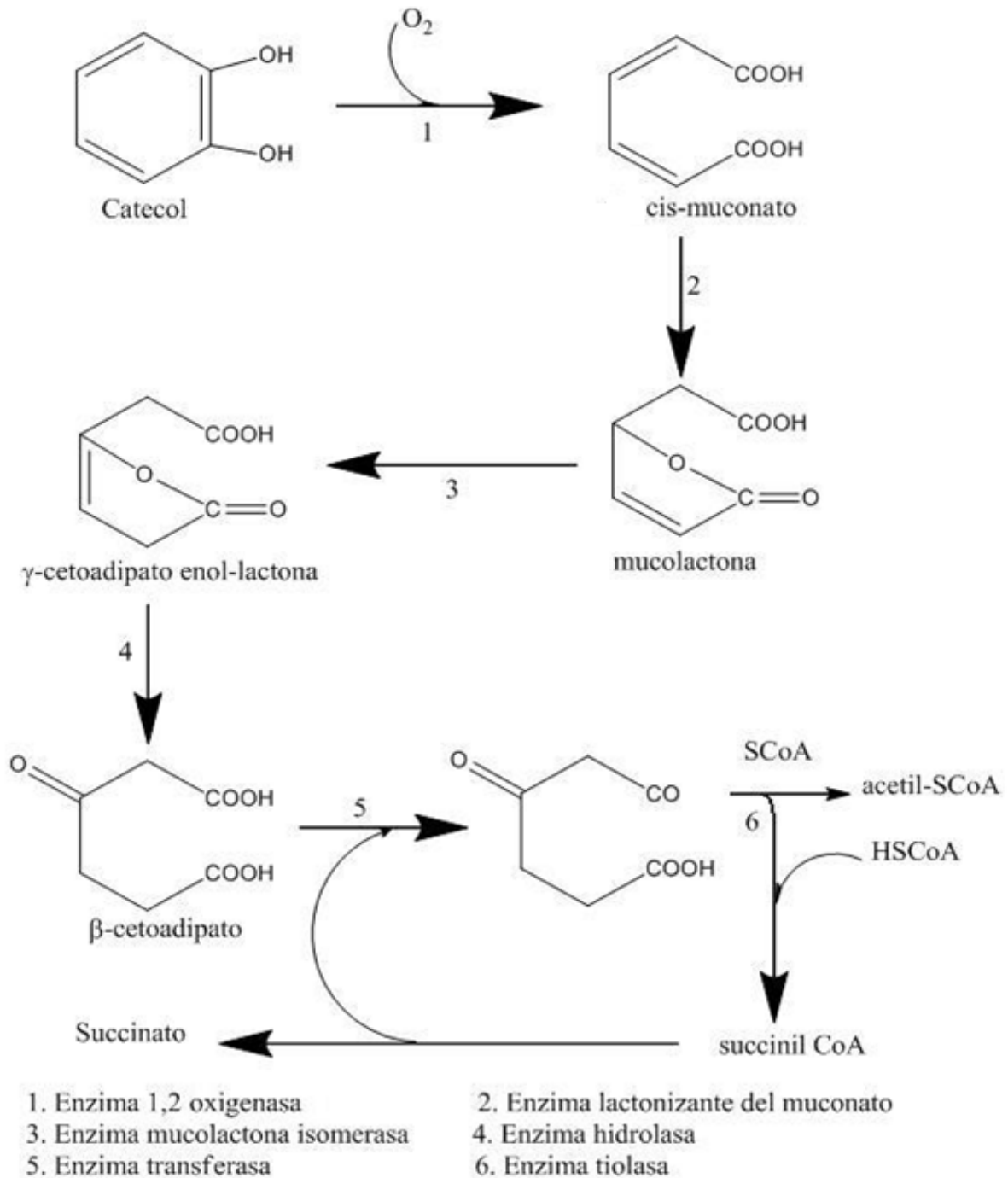


Figura 2.3 Escisión orto del catecol (Suarez, R. M., 2003).

Estudios realizados por Yang y Humphrey (1975), de la bacteria *Pseudomonas putida* utiliza el fenol vía meta, inducido por la enzima 2,3

dioxigenasa y el hongo *Trichosporon cutaneum* usa el fenol a través de la vía orto e inducido por la enzima 1,2 oxigenasa.

La biodegradación se ve afectada por diferentes factores como el pH, temperatura y nutrientes.

La temperatura afecta la supervivencia, el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos, a medida que aumenta la temperatura, aumenta la rapidez con que los microorganismos degradan la materia orgánica, hasta una temperatura a la que se desnaturalizan macromoléculas importantes, como ácidos nucleicos, proteínas, etc. esta temperatura es alrededor de los 50 °C (Bailey y Ollis, 1986).

El pH afecta a los microorganismos y sus enzimas, influyendo tanto en la disociación como en la solubilidad de diversas moléculas y en la disponibilidad de nutrientes. La mayoría de las bacterias heterótrofas y hongos se desarrollan óptimamente a valores de pH cercanos a la neutralidad dentro de un intervalo de 6.5-8.5 (Ahumada y Gómez, 2009).

Los nutrientes son importantes para el desarrollo y supervivencia de los microorganismos, estos son necesarios para llevar a cabo procesos de biosíntesis y otras funciones celulares. Cada organismo necesita diferentes nutrientes y a menudo los requerimientos son específicos para cada género, pero en todo los casos se requieren de macronutrientes (nitrógeno y fósforo) que se necesitan en grandes cantidades, mientras que otros llamados micronutrientes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+1} , K^{+1} , S^{2-}), se proporcionan en menores cantidades y a veces sólo en cantidades trazas (Ahumada y Gómez, 2009 y Bailey y Ollis, 1986).

2.5. Crecimiento microbiano

La mayoría de las bacterias reportadas capaces de llevar a cabo el proceso de biodegradación del fenol, son gram negativas, siendo el género *Pseudomonas sp.* el más mencionad, otros géneros de bacterias han sido *Agrobacterum*,

Acinetobacter, *Burkholderia*, *Klebsiella*. Entre las bacterias gram positivas que tienen la capacidad de degradar el fenol, se encuentra el género *Rhodococcus* sp., (Ahumada y Gómez, 2009). Sin embargo, independientemente del tipo de bacterias, éstas poseen gran actividad de monoxigenasas y dioxigenasas que permiten degradar este compuesto.

La curva de crecimiento microbiano se muestra en la figura 2.4 en la *fase lag*, mejor conocida como fase de adaptación, en esta etapa el microorganismo se va adecuando al sustrato y no hay un aumento evidente en el número de células, después de esta fase, el microorganismo entra en una *fase de crecimiento exponencial*, durante este periodo el microorganismo consume el sustrato manteniendo un crecimiento exponencial a altas velocidades durante largo tiempo, la rapidez de crecimiento es solo función de la habilidad del microorganismo por procesar el sustrato.

El crecimiento de las poblaciones bacterianas está limitado normalmente por el agotamiento del sustrato disponible o por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo debido a esto la rapidez de crecimiento disminuye y se detiene, en este punto el cultivo se encuentra en la *fase estacionaria*.

La transición entre la fase exponencial y la estacionaria implica un periodo de crecimiento desequilibrado, durante el cual, los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes rapidezces. La composición celular en la fase estacionaria depende del factor limitante específico de crecimiento. A pesar de esto pueden hacerse algunas generalizaciones: las células en fase estacionaria son más pequeñas que en la fase exponencial (dado que la división celular continúa después que el incremento de masa se ha detenido) y son más resistentes a agentes físicos (calor, frío, radiaciones) y químicos adversos.

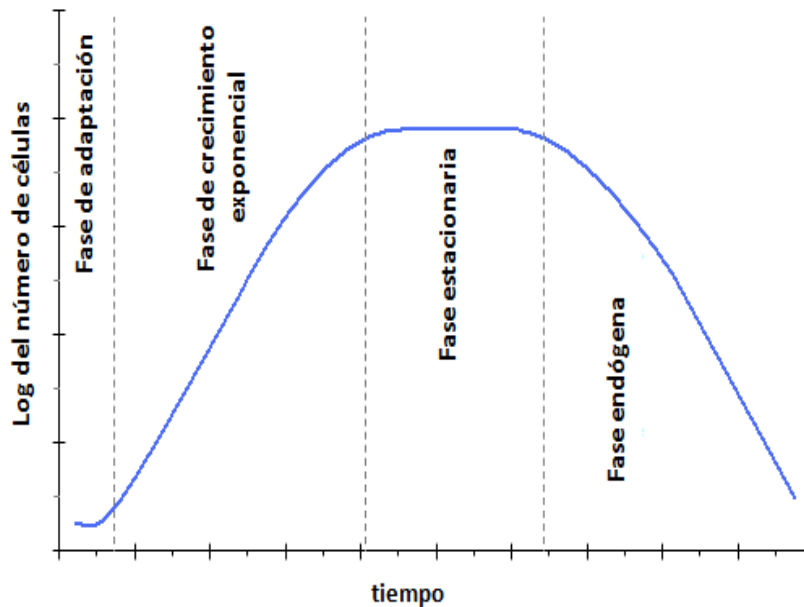


Figura 2. 4 Típica curva de crecimiento de un cultivo de microorganismos en un reactor tipo batch, (Bailey y Ollis, 1986).

Posteriormente a la fase estacionaria se encuentra la *fase endógena* (o fase de muerte), en esta fase, el sustrato se va terminando y la rapidez con que mueren los microorganismos es mayor que la rapidez con la que se reproducen por lo que las reservas celulares de energía se van agotando, lo que obliga a los microorganismos a consumir su propio protoplasma, durante esta fase se lleva a cabo un fenómeno en el que los nutrientes remanentes de las células muertas se difunden para proporcionar comida a los microorganismos que aún viven.

2.6. Cinética enzimática

La mayoría de las enzimas son proteínas altamente especializadas. Su actividad catalítica depende de la integridad de su formación proteica nativa. Si se desnaturaliza o disocia una enzima en sus subunidades se pierde normalmente la actividad catalítica. Una enzima proporciona un ambiente dentro del cual una reacción determinada, es energéticamente, más favorable. Una reacción catalizada enzimáticamente tiene lugar dentro de los confines de una bolsa de enzima

llamada sitio activo. La molécula fijada en el sitio activo y sobre la que actúa la enzima se denomina sustrato.

La cinética estudia cuantitativamente la rapidez de reacción y la forma en que se comporta con respecto a cambios en los parámetros experimentales. Uno de los factores clave que afectan la rapidez de una reacción catalizada por una enzima es la cantidad de sustrato presente $[S]$. En la figura 2.5 se muestra el efecto de la variación de la concentración del sustrato, $[S]$, sobre la rapidez inicial r_0 cuando se mantiene constante la concentración de enzima, $[E]$.

A concentraciones de sustrato relativamente bajas r_0 aumenta casi linealmente con el incremento de $[S]$. A mayores concentraciones de sustrato, r_0 aumenta incrementos cada vez menores en respuesta a incrementos de $[S]$. Finalmente se alcanza un punto más allá del cual se dan incrementos pequeñísimos de r_0 con el incremento de $[S]$. Esta meseta se denomina rapidez máxima r_{Max} .

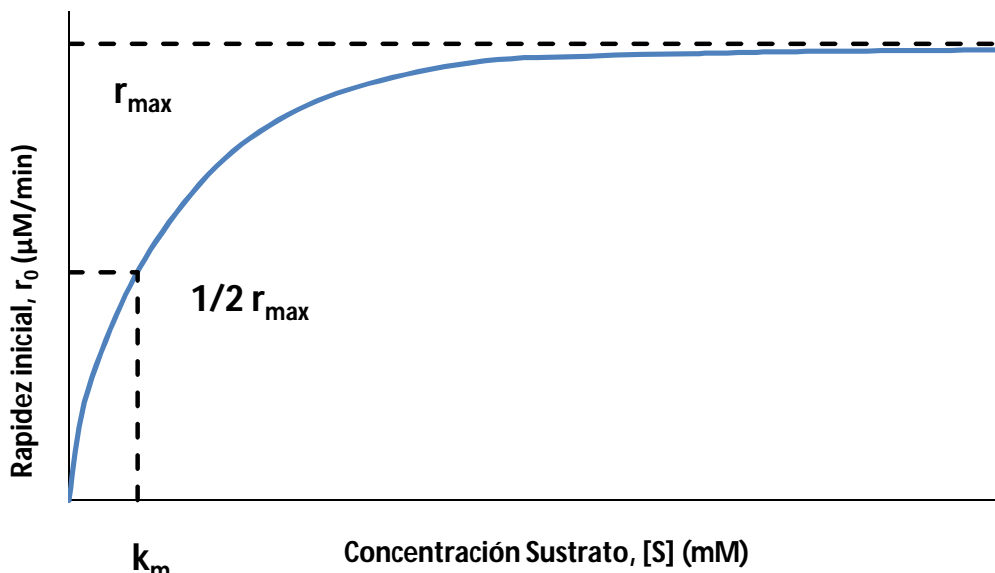
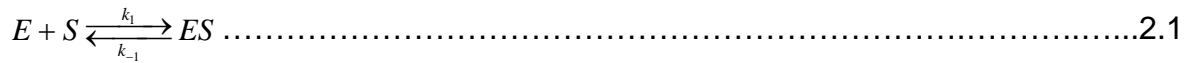
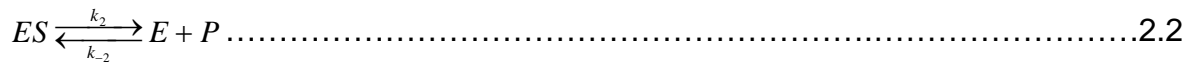


Figura 2.5 Efecto de la concentración de sustrato sobre la rapidez inicial de una reacción catalizada por una enzima. (Lehninger, Nelson y Cox, 2005).

El complejo formado por la enzima-sustrato ES en la reacción 2.1, constituye la clave para entender el comportamiento cinético. Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913, postularon que la enzima se combina primero de forma reversible con su sustrato formando un complejo enzima-sustrato ES en un paso reversiblemente rápido.



El complejo ES mostrado en la reacción 2.1, se descompone en un segundo paso más lento regenerando la enzima libre y produciendo un producto de la reacción, P .



En este modelo cinético, la segunda reacción es más lenta y por tanto limita, la rapidez global de la reacción. Es por esto que la reacción catalizada enzimáticamente ha de ser proporcional a la concentración de la especie que reacciona en el segundo paso, es decir ES .

En cualquier reacción catalizada por una enzima, E , existe en su forma libre y en su forma como complejo ES . La máxima rapidez inicial de la reacción catalizada r_{Max} , se observará cuando toda la enzima se encuentra como complejo, ES y la concentración de la enzima, E , sea muy pequeña. En estas condiciones, la enzima se encuentra saturada con el sustrato de modo que el aumento adicional en la concentración de sustrato no tiene efecto sobre la rapidez, esta condición se produce cuando la concentración de S es suficientemente alta, de modo que toda la enzima libre se ha convertido en la forma ES . Cuando el complejo ES se descompone dando el producto P , la enzima queda libre para catalizar otra reacción. Este efecto de saturación es una característica distintiva de la catálisis enzimática y es el responsable de la meseta observada en la figura 2.5.

El comportamiento de la enzima al mezclarse con un gran exceso de sustrato se muestra en la figura 2.6. Se puede ver que existe un periodo inicial denominado estado pre-estacionario, durante el cual aumenta la concentración del

complejo ES , normalmente este estado es demasiado corto y no puede ser observado. La reacción alcanza rápidamente un estado estacionario en el que la concentración del complejo ES (así como la concentración de otros intermediarios) permanece aproximadamente constante con el tiempo. La r_0 medida refleja generalmente el estado estacionario aún cuando r_0 se limite a los primeros instantes de la reacción. Michaelis y Menten estudiaron la rapidez en el estado estacionario conociéndose este tipo de catálisis como cinética del estado estacionario.

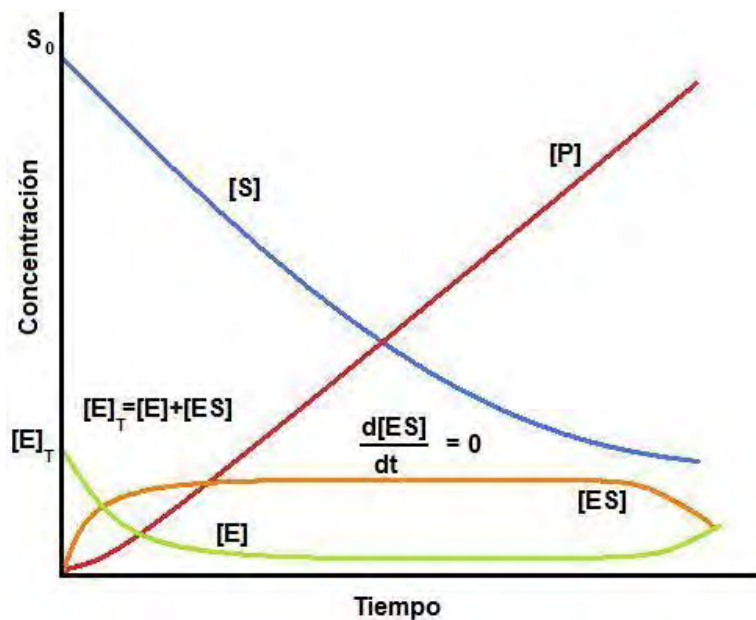
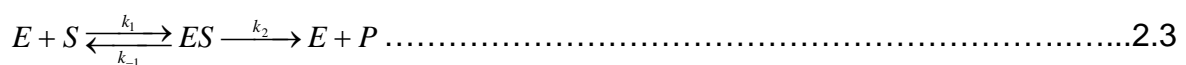


Figura 2.6 Comportamiento de las diferentes especies involucrada en una reacción enzimática $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$, Bailey y Ollis, 1986.

En los primeros momentos de la reacción, la concentración del producto $[P]$ es insignificante, por lo que se hace la suposición que la constante de la reacción 2.2, k_{-2} puede ignorarse. Reduciéndose la reacción global a la reacción 2.3.



La rapidez de descomposición, r_0 del complejo ES para dar producto, viene determinada por la concentración de ES .

$$r_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \dots\dots\dots 2.4$$

La concentración de la enzima total $[E_T]$, esta descrita por la suma de la concentración de la enzima libre $[E]$ y la enzima que se encuentra formando el complejo $[ES]$:

$$[E_T] = [E] + [ES] \dots\dots\dots 2.5$$

despejando la enzima libre se obtiene:

$$[E] = [E_T] - [ES] \dots\dots\dots 2.6$$

Los balances de masa para el sustrato y el complejo pueden escribirse como:

$$r = -\frac{d[S]}{dt} = k_1[S][E] - k_{-1}[ES] \dots\dots\dots 2.7$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)[ES] \dots\dots\dots 2.8$$

Sustituyendo la ecuación de la enzima libre en las ecuaciones anteriores, se tiene dos ecuaciones diferenciales ordinarias, con dos incógnitas $[S]$ y $[ES]$. Las condiciones iniciales son:

$$[S](0) = [S_0] \quad [ES](0) = 0 \dots\dots\dots 2.9$$

estas ecuaciones no se pueden resolver de forma analítica, deben ser integradas en una computadora para encontrar, las concentraciones de S , E , ES y P como funciones del tiempo; Bailey y Ollis (1986), refieren que con base a resultados calculados, según la figura 2.6, una buena aproximación después de un breve periodo, una vez iniciada la reacción es:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \dots\dots\dots 2.10$$

Esta suposición es llamada aproximación en el estado casi estacionario, y es válida para los casos en que la relación $[E_T]/[S_0]$ es suficientemente pequeña.

Como se puede ver en la figura 2.6 en los primeros instantes de la reacción la concentración de enzima total $[E]_T$ empieza a disminuir debido a que se forma el complejo ES y la concentración de este empieza a aumentar, el tiempo en el que se da este fenómeno es muy pequeño. Posteriormente llega un momento en el que la concentración del complejo ES no cambia en el transcurso de tiempo y bajo estas condiciones se hace la aproximación del estado casi estacionario. Mientras tanto la concentración de sustrato disminuye conforme se va llevando a cabo la reacción y se va produciendo el producto P .

Realizando el desarrollo matemático la ecuación del balance del complejo queda:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \dots\dots\dots 2.11$$

sustituyendo la ecuación de la concentración de la enzima libre y despejando la concentración del complejo, se obtiene la ecuación:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{\left(\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} + [S]\right)} \dots\dots\dots 2.12$$

El término $(k_{-1} + k_2)/k_1$ se define como constante de Michaelis-Menten k_m , y la expresión puede simplificarse a:

$$[ES] = \frac{[E_T][S]}{k_m + [S]} \dots\dots\dots 2.13$$

ahora r_0 se puede expresar como:

$$r_0 = \frac{k_2 [E_T][S]}{k_m + [S]} \dots\dots\dots 2.14$$

Dado que la rapidez máxima se obtiene cuando la enzima está saturada, $[E_T] = [ES]$, r_{Max} se puede definir como:

$$r_{Max} = k_2 [E_T] \dots\dots\dots 2.15$$

quedando la ecuación simplificada como:

$$r_0 = \frac{r_{Max} [S]}{k_m + [S]} \dots\dots\dots 2.16$$

La ecuación 2.16 corresponde a la ecuación de Michaelis-Menten, la cual representa la rapidez de una reacción catalizada enzimáticamente con un sustrato. Esta ecuación se ajusta solamente en la situaciones límite donde la concentración del sustrato, $[S]$, es muy grande o muy pequeña.

La ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar algebraicamente en formas más útiles para representar los datos experimentales en un plano, tomando los inversos en ambos miembros de la ecuación 2.16, se obtiene la ecuación 2.17, esta ecuación se conoce como ecuación de Lineweaver-Burk.

$$\frac{1}{r_0} = \frac{k_m}{r_{Max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{r_{Max}} \dots\dots\dots 2.17$$

Otras opciones para representar los datos son las ecuaciones 2.18 y 2.19:

$$\frac{S}{r_0} = \frac{k_m}{r_{Max}} + \frac{1}{r_{Max}} S \dots\dots\dots 2.18$$

$$r_0 = r_{Max} - k_m \frac{V}{S} \dots\dots\dots 2.19$$

Es importante mencionar que no todas las reacciones catalizadas por una enzima siguen el comportamiento hiperbólico de r_0 frente a $[S]$ (cinética de Michaelis-Menten). Las enzimas que siguen este comportamiento hiperbólico pueden tener mecanismos de reacción diferentes. La ecuación 2.16 no depende

del mecanismo relativamente sencillo de dos pasos propuesta por Michaelis-Menten.

La magnitud como el significado de r_{Max} y k_m cambian de una enzima a otra en incluso puede variar para diferentes sustratos y una misma enzima. El significado real de k_m depende de aspectos específicos del mecanismo de reacción tales como el número y la rapidez relativa de los pasos individuales de la reacción. En una reacción de dos pasos como la mostrada en la reacción 2.3 de este texto, el valor de k_m representa:

$$k_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \dots\dots\dots 2.20$$

En la reacción de Michaelis-Menten, ecuación 2.3, la constante de rapidez de reacción k_2 limita la velocidad, debido a que es un paso lento, por lo que $k_2 \ll k_{-1}$ quedando k_m simplificada a k_{-1}/k_1 , en esta situación k_m se define como constante de disociación, k_s , del complejo ES . Cuando se dan estas condiciones k_m representa una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato en el complejo ES .

Hay veces que el paso más lento es la reacción 2.1, teniendo que $k_2 \gg k_{-1}$ por lo que $k_m = k_2/k_1$, en estas situaciones k_m es una función más compleja de las tres constantes de rapidez. Debido a esto, k_m no siempre se puede considerar como una medida sencilla de la afinidad por el sustrato.

La r_{Max} varía de una enzima a otra, si una enzima reacciona según el mecanismo de Michaelis-Menten de dos pasos $r_{Max} = k_2 [E_T]$, donde la constante de rapidez de reacción k_2 limita la velocidad. No obstante, el número de pasos en

la reacción y la identidad del paso limitante (o pasos limitantes) de rapidez varían de una enzima a otra.

A veces, cuando una gran cantidad de sustrato está presente, la reacción catalizada por la enzima es disminuida por el exceso de sustrato. Este fenómeno se conoce como inhibición por sustrato, en una gráfica de r en función de S se nota claramente que la rapidez de reacción r pasa a través de un máximo cuando la concentración de sustrato aumenta. Cuando S es mayor que $S(r = r_{Max})$ una disminución en la concentración de sustrato provoca un aumento en la rapidez de reacción, figura 2.7.

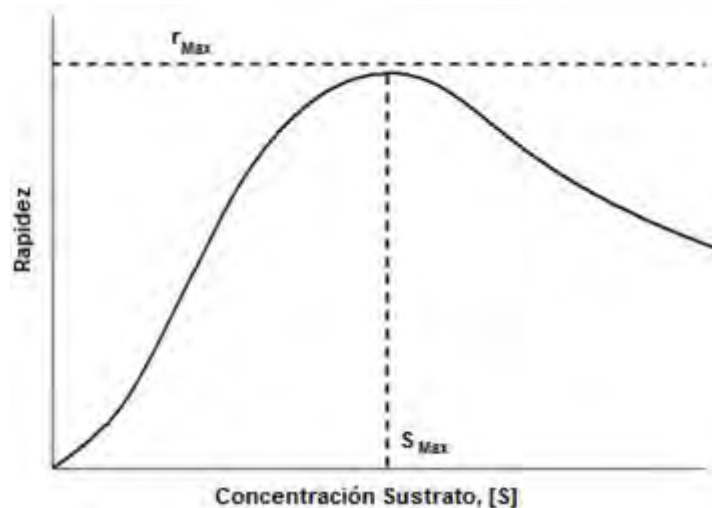


Figura 2.7 Inhibición por sustrato, Bailey y Ollis, 1986.

El comportamiento de reacciones inhibidas por sustrato pueden ser modeladas utilizando el método de Michaelis-Menten.

2.6.1. Inmovilización enzimática

La inmovilización de una enzima significa que se ha limitado o localizado en algún soporte de manera que se pueden reutilizar de forma continua, una de las principales razones es que al ser inmovilizadas son retenidas en el reactor, ya que

al estar solo en solución, algunas enzimas abandonan el reactor junto con el producto final aumentando las impurezas en el producto y deben agregarse nuevas enzimas al reactor, o bien los microorganismos deben producir más enzimas. Muchas enzimas de las células son inmovilizadas en materiales insolubles en agua. Existen dos métodos para inmovilizar enzimas, los métodos químicos, donde se forman enlaces covalentes con la enzima y métodos físicos, donde las interacciones débiles de las enzimas están involucradas, esto se muestra en la figura 2.8.

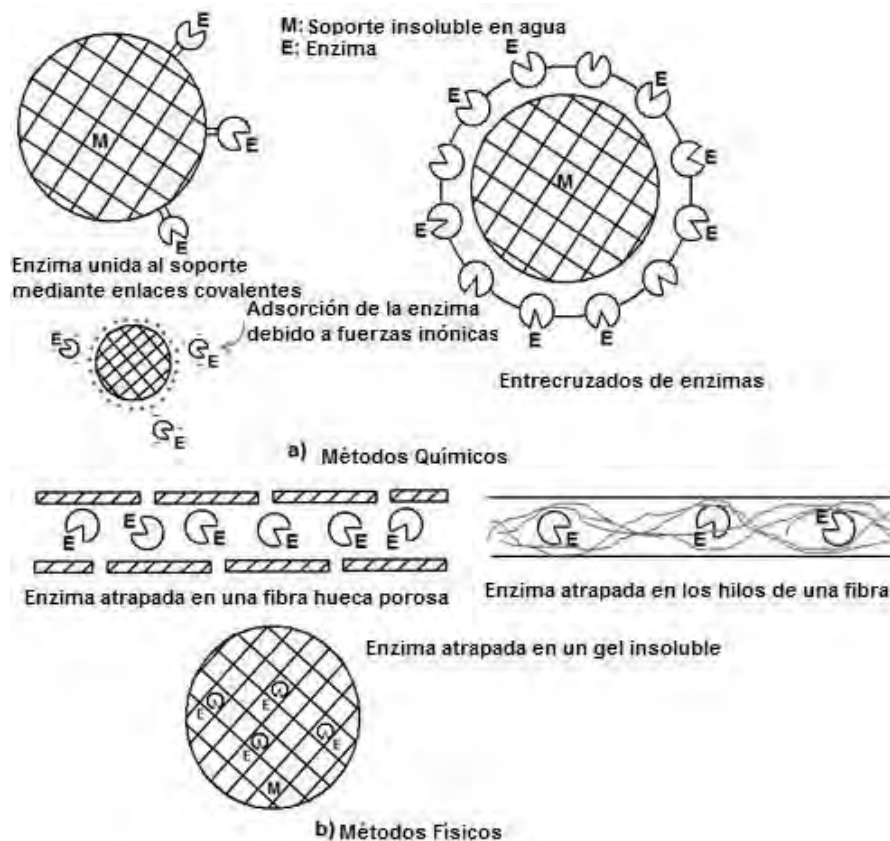


Figura 2.8 Técnicas de inmovilización de enzimas, a) métodos químicos y b) métodos físicos.

Un procedimiento de inmovilización física muy prometedor es el atrapamiento de la enzima en una fibra, la enzima se encuentra en solución, pero esta solución está físicamente confinada en un soporte y no puede escapar.

2.6.2. Modulación y regulación enzimática, una forma de inhibición

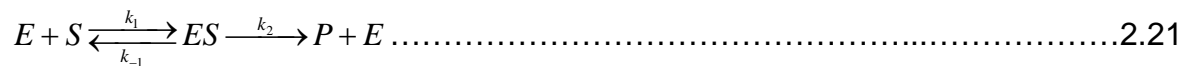
Para poder degradar el fenol mediante microorganismos son necesarias ciertas enzimas que estos sintetizan. Existen otras especies, no solo el sustrato, que se pueden combinar con las enzimas para alterar o modular la actividad catalítica. Este tipo de sustancias son llamadas moduladores o efectores y pueden ser componentes normales de la célula. Si el modulador disminuye la actividad de la enzima provoca una inhibición. La combinación de una enzima con un modulador es una reacción química y por lo tanto puede ser completamente reversible, parcialmente reversible o irreversible.

Voet (2006), tiene una clasificación parcial de los inhibidores en base a su influencia en los parámetros de de la ecuación de Michaelis-Menten.

- Inhibición Competitiva

Una sustancia que compite directamente con un sustrato normal por un sitio de fijación enzimático, se denomina inhibidor competitivo. Este tipo de inhibidor normalmente, se parece al sustrato al fijarse al sitio activo, pero difiere del mismo en que no es reactivo.

El modelo general de inhibición competitiva viene dado por las ecuaciones 2.21 y 2.22.



Donde el inhibidor, I se une, reversiblemente a la enzima estando en equilibrio y el complejo EI , es catalíticamente inactivo. Por consiguiente, un inhibidor competitivo actúa reduciendo la concentración de enzima libre disponible para la fijación del sustrato.

La ecuación 2.23 representa este tipo de inhibición, esta es la ecuación de Michaelis-Menten con k_m modulada por α , que es función de la concentración de inhibidor, ecuación 2.24. El valor de $[S]$ a $r_0 = \frac{r_{Max}}{2}$, es decir, el valor de $k_m^{Aparente}$ es igual a αk_m .

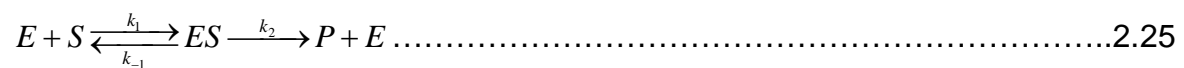
$$r_0 = \frac{r_{Max}[S]}{\alpha k_m + [S]} \dots\dots\dots 2.23$$

$$\alpha = \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \dots\dots\dots 2.24$$

Cuando no existe un inhibidor, el valor de $\alpha = 1$ y se obtiene la ecuación de Michaelis.-Menten, ecuación 2.16.

- Inhibición Incompetitiva

En este tipo de inhibición, el inhibidor se fija directamente al complejo enzima-sustrato, pero no a la enzima libre. El mecanismo de reacción de este tipo de inhibición se muestra en las reacciones 2.25 y 2.26.



La etapa de fijación del inhibidor, ecuación 2.26, se encuentra en equilibrio, y se considera que la fijación del inhibidor incompetitivo, que no necesita parecerse al sustrato, produce una distorsión estructural del sitio activo inactivando a la enzima. El inhibidor competitivo afecta la función catalítica de la enzima pero no la fijación del sustrato. La ecuación 2.27 es la ecuación de Michaelis-Menten para la inhibición incompetitiva.

$$r_0 = \frac{r_{Max}[S]}{k_m + \alpha [S]} \dots\dots\dots 2.27$$

Donde el valor de α' es función de la concentración de inhibidor, ecuación 2.28.

$$\alpha' = \left(1 + \frac{[I]}{K_I'} \right) \dots\dots\dots 2.28$$

- Inhibición Mixta

Este tipo de inhibición ocurre si la enzima así como el complejo enzima sustrato fijan inhibidor, las ecuación 2.29, 2.30 y 2.31 muestran el mecanismo de reacción de la inhibición mixta.



Las dos etapas de fijación del inhibidor, ecuaciones 2.30 y 2.31 se encuentran en equilibrio. La ecuación 2.32 es la ecuación de Michaelis-Menten para la inhibición mixta, donde el valor de α y α' se definen en las ecuaciones 2.24 y 2.28 respectivamente.

$$r_0 = \frac{r_{Max}[S]}{\alpha k_m + \alpha'[S]} \dots\dots\dots 2.32$$

La tabla 2.6 muestra el efecto de los inhibidores sobre los parámetros de la ecuación de Michaelis-Menten.

Tabla 2.6 Efecto de los inhibidores sobre la ecuación de Michaelis-Menten, (Voet, 2006).

Tipo de Inhibición	r_{Max} Aparente	k_m Aparente
Ninguna	r_{max}	k_m
Competitiva	r_{max}	αk_m
Incompetitiva	r_{max}/α'	k_m/α'
Mixta	r_{max}/α'	$\alpha k_m/\alpha'$

Las ecuaciones de Michaelis-Menten de los tres tipos de inhibición, 2.23, 2.27 y 2.32 se pueden linealizar de la misma forma que la ecuación 2.17 para representar los datos experimentales en un plano. Las figuras 2.9, 2.10 y 2.11 muestran los tipos de inhibición al representar los datos experimentales en un plano.

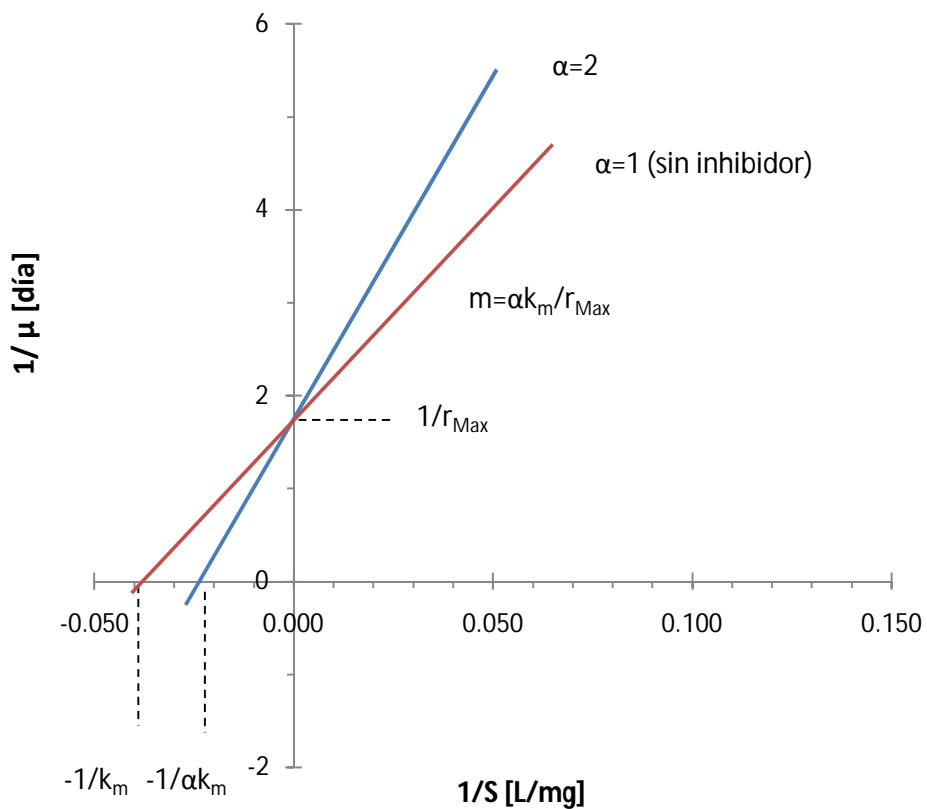


Figura 2.9 Inhibición competitiva

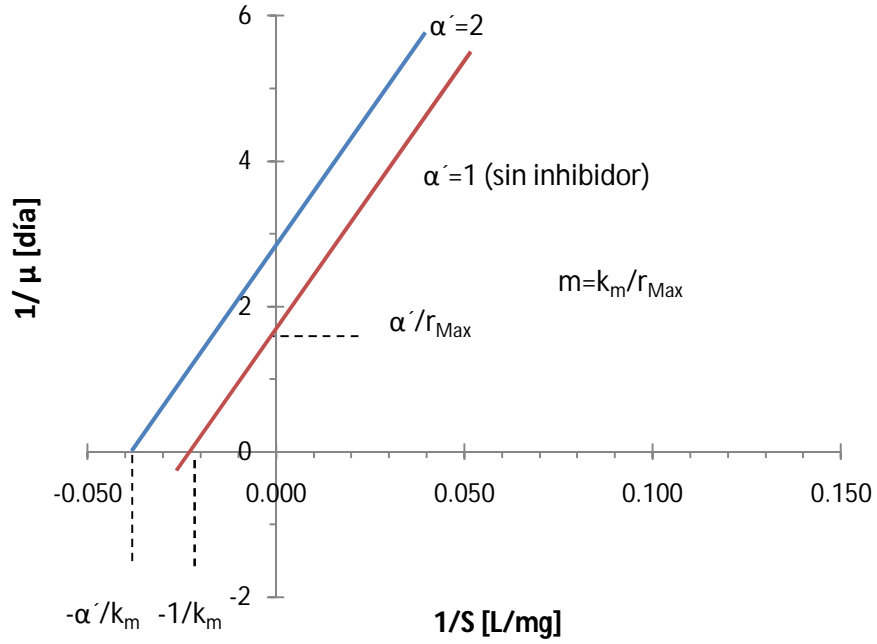


Figura 2.10 Inhibición incompetitiva.

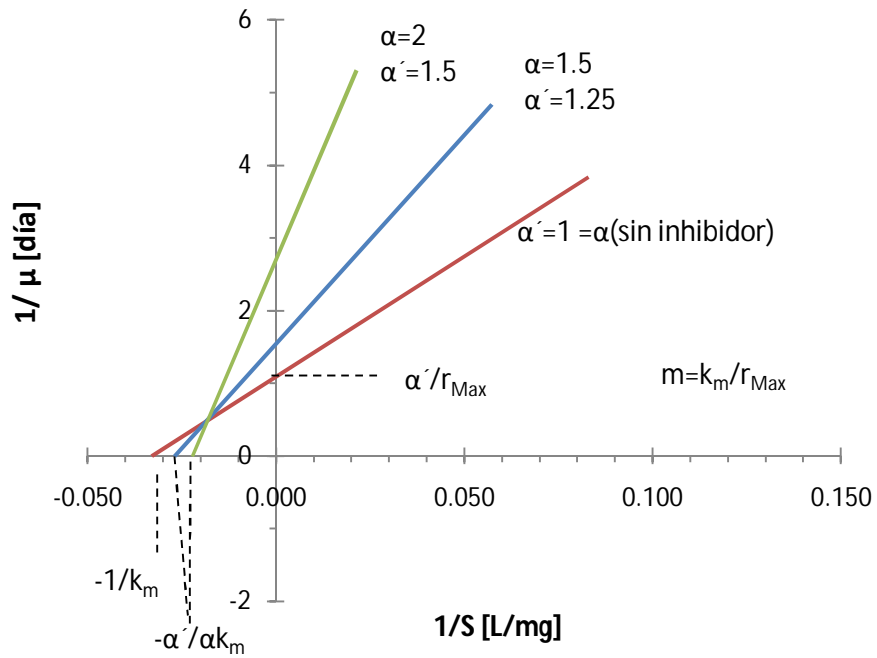


Figura 2.11 Inhibición mixta

2.7. Cinética de crecimiento microbiano

Para el estudio de la cinética del crecimiento de microorganismos que crecen aislados, generalmente se utiliza la ecuación de Monod.

Si la concentración del sustrato es variada, la rapidez específica de crecimiento de los microorganismos se comporta de la misma forma que la ecuación de rapidez para una reacción catalizada por una enzima con un solo sustrato, propuesta por Michelis-Menten, figura 2.5. En el eje de las abscisas se encontraría la concentración del sustrato y en el eje de las ordenadas la rapidez específica de crecimiento.

Monod en el año de 1942, propuso una ecuación que relaciona la rapidez de crecimiento μ y la concentración de un componente esencial para el crecimiento de los microorganismos S . La ecuación propuesta por Monod es:

$$\mu = \frac{\mu_{Max} S_i}{k_i + S_i} \dots\dots\dots 2.33$$

donde μ_{Max} es la rapidez específica de crecimiento máxima expresada en h^{-1} , k_i es un coeficiente de saturación característico de cada microorganismo, es aquel valor igual a la concentración de S cuándo $\mu = \mu_{Max}/2$ y S_i , es la concentración del sustrato.

La ecuación 2.34 modela el crecimiento de la biomasa al consumirse el sustrato, donde γ es un coeficiente de crecimiento celular, y es diferente para cada microorganismo, el cual está definido como la relación de la masa de células formadas, x , en comparación al sustrato consumido, ecuación 2.35.

$$\frac{dx}{dt} = -Y \frac{dS}{dt} \dots\dots\dots 2.34$$

$$Y = \frac{x_{Max} - x_0}{S_0 - S_{Max}} \dots\dots\dots 2.35$$

Cuando se tiene la máxima cantidad de microorganismos, se puede suponer que se ha terminado el sustrato, por lo que $S_{Max} = 0$, y por lo tanto la ecuación 2.35 quedaría de la siguiente forma:

$$x_{Max} = YS_0 + x_0 \dots\dots\dots 2.36$$

El crecimiento microbiano, es descrito por:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - k_d x \dots\dots\dots 2.37$$

donde el primer término corresponde al crecimiento de los microorganismos, es decir a la fase de crecimiento exponencial, mientras que el segundo término corresponde a la fase endógena, k_d que es la rapidez específica de muerte, para este caso en específico se tomará en cuenta la fase de crecimiento exponencial. Por lo tanto se tiene para este caso:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \dots\dots\dots 2.38$$

Sustituyendo la ecuación 2.38 en la ecuación 2.34 y despejando la variación del sustrato en el tiempo se obtiene:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{Y} \mu x \dots\dots\dots 2.39$$

despejando la rapidez específica de crecimiento μ de la ecuación 2.39 se obtiene:

$$\mu = -\frac{\left(\frac{dS}{dt}\right)Y}{x} \dots\dots\dots 2.40$$

Con los valores obtenidos, y linealizando la ecuación de Monod, al graficar $1/S$ contra $1/\mu$, con los valores de la pendiente y la ordenada al origen se pueden obtener los parámetros cinéticos del crecimiento microbiano, k_s y μ_{Max} .

$$\frac{1}{\mu} = \frac{k_s}{\mu_{Max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{Max}} \dots\dots\dots 2.41$$

2.8. Teoría de la biopelícula de microorganismos

Los principales objetivos del tratamiento biológico de aguas residuales son transformar los componentes disueltos o partículas biodegradables en productos finales menos complejos o incluso la mineralización de ellos, capturar o incorporar sólidos coloidales suspendidos o no sedimentables en un flóculo o en una biopelícula y, en algunos casos, remover trazas de compuestos orgánicos (Metcalf & Eddy 2004).

Cualquier superficie en contacto con un medio nutriente que contenga microorganismos desarrollará una capa biológicamente activa. Cuando la capa de agua residual fluye sobre el medio de empaque cubierto de la biopelícula, el oxígeno y los otros nutrientes se consumen según se difunden dentro de la biopelícula. Dentro de esta el sustrato se transporta por difusión dentro de los conglomerados celulares, sin embargo, también existen poros y canales llenos de líquido donde el transporte de masa se lleva a cabo por convección y .difusión.

Una biopelícula está formada por pequeños conglomerados celulares sumergidos en una red de polímeros producidos por las mismas células. El carbono que forma estos polímeros extracelulares representa entre el 50 y el 90 % del carbono total en una biopelícula, González y López, (2008).

Los microorganismos presentes en la biopelícula crecen y según se engruesa la biopelícula, las regiones cercanas a la superficie sólida de soporte se vuelven anaerobias. Esta condición anaerobia es una de las causas del inicio del desprendimiento ya que esta capa al transcurrir el tiempo padece hambre, muere, se disuelve y se separa de la superficie del soporte. La figura 2.12 muestra la formación de la biopelícula en un soporte permeable.

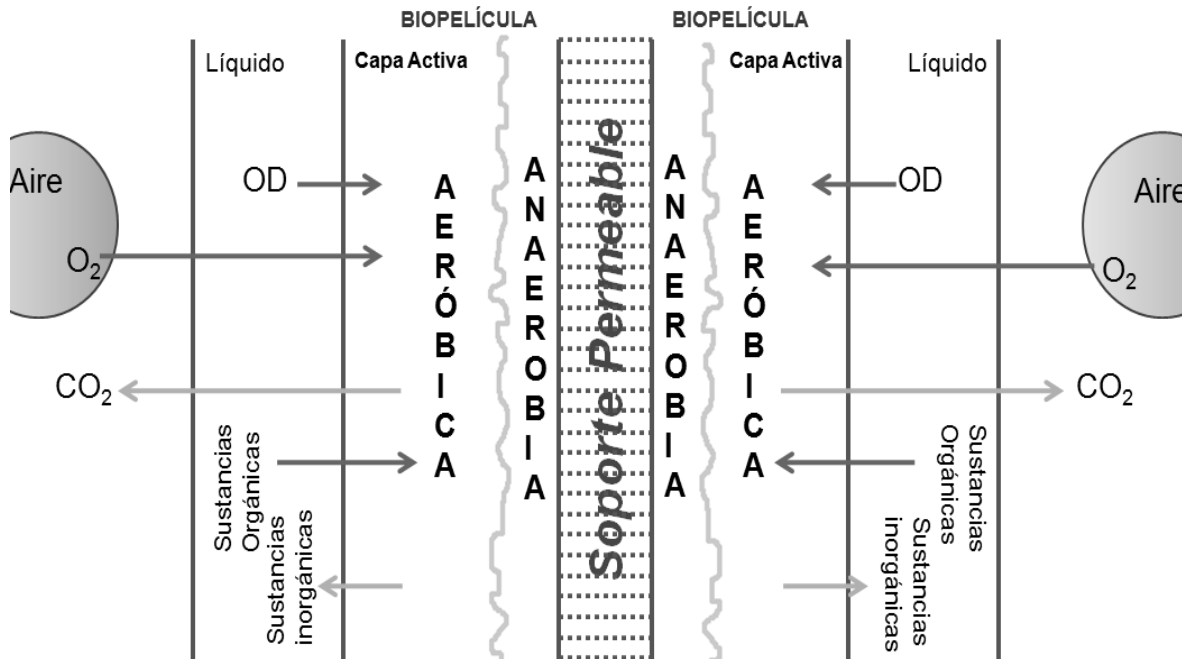


Figura 2.12 Crecimiento de la biopelícula, parte aerobia y anaerobia.

La eficiencia de la purificación de la proporción aeróbica de la biopelícula se reducirá según los productos metabólicos de las regiones anaeróbicas de la biopelícula, estos productos (alcoholes, aldehídos y ácidos) pueden entonces inhibir la toma de nutrientes de la capa líquida por los organismos aeróbicos.

La eficiencia de purificación de la biopelícula alcanza un máximo cuando hay una delgada biopelícula completamente aeróbica, y la eficiencia puede bajar ligeramente según aumente el espesor de la biopelícula y las regiones más profundas se vuelvan inactivas o anaeróbicas, Winkler, M. A. (1986).

El espesor de la biopelícula y la profundidad de la capa activa estarán afectados por la carga de nutrientes del sistema y la actividad metabólica de los organismos presentes. El crecimiento de la biopelícula se lleva a cabo en etapas, Characklis y Marshal (1990), describieron de manera general la formación de la película biológica como resultado de la interacción entre una serie de procesos físicos, químicos y biológicos los cuales son:

-
-
- *Colonización o Inducción:* Los microorganismos comienzan a adherirse sobre la superficie inerte; la adhesión puede darse por secreción de polímeros o por fijación con flagelos.
 - *Adherencia:* Una vez que algunos organismos logran adherirse a la superficie, se inicia el desarrollo de las primeras capas de bacterias que garanticen su adherencia y de las generaciones siguientes.
 - *Oportunismo:* Es un proceso que, conforme transcurre el tiempo, un mayor número de especies tienen oportunidad de utilizar la biopelícula como medio de vida.
 - *Estabilización:* Esta fase se lleva a cabo cuando se ha alcanzado un equilibrio entre todas las especies presentes. Los nutrientes y el oxígeno penetran completamente la biopelícula.
 - *Desprendimiento:* Conforme aumenta el grosor de la biopelícula empieza a haber una deficiente difusión de nutrientes y oxígeno hasta llegar al punto en que los microorganismos facultativos cambian su metabolismo consumiendo sus reservas, lo que provoca un desprendimiento de la biopelícula.

2.9. Reactores de biomasa adherida a un soporte

Los sistemas de películas adheridas se pueden considerar de dos tipos: sistemas estacionarios o de medio fijo y sistemas de medio en movimiento. En ambos tipos de sistemas el agua residual se mueve en relación con la película de lama microbiana y el soporte sólido al que esta adherida. La superficie mojada del medio de soporte desarrolla una biopelícula donde el oxígeno se disuelve en la superficie de la capa del líquido en movimiento y es transferido a través de la capa líquida a la biopelícula.

Los soportes usados en estos sistemas están diseñados de manera que presenten un área de contacto muy grande entre la capa del líquido y el aire aumentando la absorción del oxígeno por la capa líquida y presentando de manera similar una gran área de contacto entre el líquido y la biopelícula aumentando la transferencia de nutrientes y oxígeno a los microorganismos.

Los sistemas de biomasa representan una muy buena alternativa para la remoción de contaminantes en comparación de los lodos activados. Las principales ventajas de la biopelícula incluyen cargas volumétricas altas, rapidez específica de remoción alta e incrementa la estabilidad del proceso, además de reactores más compactos y con una mayor densidad de biomasa (Kaballo, 1997).

2.10. Diseño de experimentos

La experimentación es una técnica utilizada para encontrar el comportamiento de una variable a partir de diferentes combinaciones de factores o variables de entrada de un proceso, que al cambiar afectan la respuesta. El diseño de experimentos, busca la manipulación sistemática de las variables de entrada de un proceso para entender el efecto que estas pueden causar en la variable respuesta. Este se lleva a cabo para efectuar la investigación lo más eficiente posible, ahorrar tiempo, personal, dinero y material experimental ya que proporciona la máxima cantidad de información al mínimo costo.

El diseño de experimentos consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos, que al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas y, de esa manera, clarificar los aspectos inciertos de un proceso, o lograr alguna mejora en este.

El diseño factorial completo 2^k describe los experimentos más adecuados para conocer simultáneamente qué efecto tienen k factores sobre una respuesta y descubrir si interaccionan entre ellos. Estos experimentos están planeados de forma que se varían simultáneamente varios factores pero se evita que se cambien siempre en la misma dirección. Al no haber factores correlacionados se evitan experimentos redundantes. Además, los experimentos se complementan de tal modo que la información buscada se obtiene combinando las respuestas de todos ellos.

Un diseño compuesto central permite un nivel de prueba intermedio que se le conoce como punto central. Existen dos razones para correr el punto central con cierto número de réplicas: Obtener grados de libertad adicionales para el error en la tabla del ANOVA, lo cual permite una mejor estimación del error y permite detectar una posible curvatura en alguno de los factores objeto de estudio, (García, G. S, 2008).

En el diseño factorial 2^3 se tienen 3 factores y cada uno se evalúa en dos niveles (1, -1). Un diseño experimental de esta naturaleza requiere de $2^3=2 \times 2 \times 2=8$ tratamientos pero debido a que es un diseño compuesto central, en total se realizan 16 experimentos. La representación geométrica de un diseño experimental 2^3 se muestra en la figura 2.13, donde la región experimental es un cubo centrado en el origen (0,0,0) y los vértices del cubo son los 8 experimentos.

Las variables que se estudiaron en el diseño de experimentos establecido fueron la cantidad de nutrientes, el flujo de aire suministrado y la concentración de fenol en la entrada del reactor.

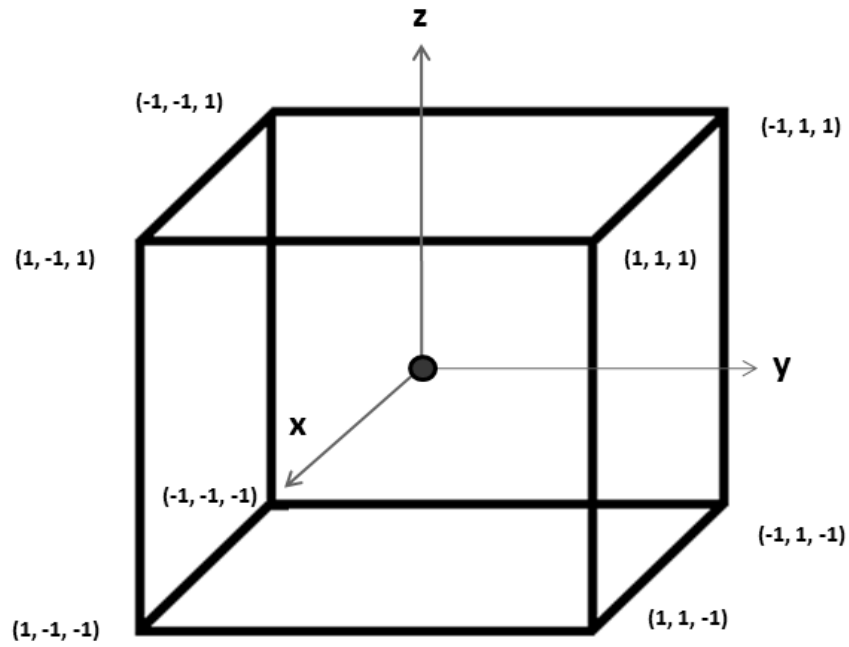


Figura 2.13 Representación geométrica de un diseño experimental 2^3 .

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

En este capítulo se presenta la metodología experimental desarrollada en este trabajo de tesis, se describen las diferentes técnicas empleadas para la caracterización del agua sintética así como el diseño experimental establecido.

Una descripción más amplia sobre la metodología de las técnicas utilizadas se describe en los anexos.

La metodología experimental consta de la elección del soporte, posteriormente se hicieron pruebas en el reactor biológico de lecho fijo, se operó a dos flujos de alimentación diferentes, después se llevó a cabo un diseño de experimentos para determinar las mejores condiciones de operación del reactor para remover la mayor cantidad de contaminante y finalmente se cuantificó la biomasa adherida al soporte.

A continuación se llevó a cabo, una cinética de la degradación del fenol para 100 mg/L, 300 mg/L y 500 mg/L de fenol respectivamente.

A la par de este trabajo de tesis se cuidó de un reactor biológico por lotes con biomasa suspendida, alimentándolo a 2 diferentes concentraciones de fenol.

3.1. Técnicas analíticas realizadas

Los parámetros que se monitorearon durante la experimentación fueron: demanda química de oxígeno (DQO), carbón orgánico disuelto (COD), fenoles totales, sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), pH y turbidez.

Para la evaluación de los parámetros antes mencionados se recurrió al empleo de las normas técnicas mexicanas vigentes y algunos métodos estándar que son

análogos a los US Standar Methods, en la tabla 3.1 se indican las pruebas y métodos empleados, así como los equipos utilizados.

Tabla 3.1 Tabla Técnicas, normas, procedimientos análogos y equipos utilizados durante la experimentación.

Prueba	Técnica	Procedimiento análogo	Equipo
Determinación de DQO	NMX-AA-030-SCFI-2001	Standard Methods 5220D	-Thermo Spectronic Genesys 20 -International Centrifuge model H
Determinación de fenoles totales	NMX-AA-050-SCFI-2001	Standard Methods 5530	-Cary 50 U-V visible Spectrophotometer
Determinación de turbiedad	NMX-AA-038-SCFI-2001	Standard Methods 2130B	-Turbidímetro Hanna Instruments
Determinación de Ph	NMX-AA-008-SCFI-2001	Standard Methods 4500-H ⁺ B	-Electrodo Orion modelo 5258

Demanda química de oxígeno (DQO): Este parámetro se determinó con base a la norma NMX-AA-030-SCFI-2001. Mediante esta prueba casi todas las sustancias orgánicas se oxidan completamente, con la excepción de ciertos compuestos aromáticos como la piridina, benceno y tolueno. El valor de la DQO nos indica el contenido orgánico total de un residuo, sea o no biodegradable. Esta prueba está sujeta a la interferencia por los cloruros.

Carbono orgánico disuelto (COD): Con esta prueba se determina la materia orgánica en un residuo. El principio de funcionamiento de este método, es la oxidación de muestras líquidas a 680 °C en presencia de un catalizador, obteniéndose como productos agua y CO₂, El CO₂ producido por la oxidación del carbono orgánico presente, es detectado mediante un analizador infrarrojo. El carbono inorgánico como los carbonatos, se pueden o bien eliminar antes de la oxidación o medirlos por separado a 150 °C acidificando la muestra y luego restarlos del resultado total. Se utilizó el equipo TOC-V_{SCN} Total Organic Carbon analyzer, marca Shimadzu.

Fenoles totales: Se utilizó un método espectrofotométrico con base a la norma NMX-AA-050-SCFI-2001. Los compuestos fenólicos reaccionan con 4-aminoantipirina a un pH de 10 en presencia de ferrocianuro de potasio, formando compuestos de un color amarillo intenso a rojo. La absorbancia del complejo formado es leída directamente a una longitud de onda de 510 nm. La absorbancia de este producto coloreado es proporcional a la concentración de fenoles presentes en la muestra. La 4-aminoantipirina reacciona con los compuestos fenólicos sustituidos en posición “orto” y “meta”, pero no así en posición “para” de los grupos alquilo, arilo, benzoilo, nitro, nitrosos y aldehído. Estos compuestos fenólicos reaccionan de manera diferente frente a la 4-amino-antipirina dando coloraciones no directamente proporcionales a la que se obtiene con fenol.

Sólidos suspendidos totales y volátiles: Esta prueba se desarrolló con base a la norma NMX-AA-034-SCFI-2001. Los SST lo constituyen las partículas inorgánicas (arcilla, arena, suelos) y orgánicas (fibras de plantas, células de algas, bacterias, microorganismos, etc.), de acuerdo a esto se utilizó esta técnica para poder cuantificar el crecimiento microbiano en el reactor expresada como SSV, Scragg, 2004. Se utilizó un horno para alcanzar una temperatura de 105 °C y una mufla para temperaturas de 550 °C.

3.2. Elección de soporte

Para la elección del soporte, se probó con un repuesto de rodillo para pintar fabricado de nylon y poliéster, esponjas para lavar trastes y un paño de cocina para secar fabricado de rayón y poliestireno.

En los lodos de un reactor por lotes, previamente adaptados al fenol en el laboratorio (Torres, 2009) provenientes de la planta de tratamientos de aguas de C.U., se sumergieron los soportes seleccionados para su inoculación y se observó que los microorganismos se adhirieran a éste.

Se usó un medio nutritivo para suplementar la base mineral que requieren los microorganismos para su crecimiento. Para proveer los iones necesarios para el buen funcionamiento de las células, la base mineral contiene un buffer de fosfatos para reducir las fluctuaciones de pH durante el ciclo de crecimiento. Las soluciones nutritivas utilizadas así como la composición de estas se muestran en la tabla 3.2, donde se adicionaron 10 mL de la solución A, 1 mL de las soluciones B, C y D por litro, por cada litro de alimentación al reactor (Torres, 2009).

Tabla 3.2 Composición de las soluciones nutritivas añadidas a los reactores.

Solución A	Fórmula	Concentración [g/L]
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	0.850
Fosfato dibásico de potasio	K_2HPO_4	2.175
Fosfato dibásico de sodio	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.340
Cloruro de amonio	NH_4Cl	0.050
Solución B	Fórmula	Concentración [g/L]
Cloruro de calcio	CaCl_2	0.275
Solución C	Fórmula	Concentración [g/L]
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.225
Solución D	Fórmula	Concentración [g/L]
Cloruro férrico	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.003

3.3. Pruebas en el reactor biológico de lecho fijo

Una vez elegido el soporte con mejor adherencia por parte de los microorganismos, se montó el reactor y se probó el soporte a dos flujos de alimentación para conocer si se obtenían buenas remociones del contaminante. Una vez comprobado esto y tomando en cuenta las variables que afectaban al sistema (cantidad de nutrientes, cantidad de aire suministrado por la bomba y concentración de contaminante) se decidió realizar un diseño experimental. Al finalizar los experimentos se cuantificó la cantidad de biomasa adherida al soporte.

3.3.1. Operación del reactor biológico de lecho fijo a dos flujos

Con el soporte elegido, se montó el reactor biológico de lecho fijo, y se inoculó por 2 días con los lodos del reactor por lotes, se trabajó a una concentración fija de contaminante (100 mg/L de fenol) y a dos diferentes flujos de alimentación, 0.64 y 1.51 mL/min, a un flujo constante de aire de aproximadamente 0.99 L/min (flujo máximo suministrado por la bomba de aire), y con una concentración fija de cada solución nutritiva, posteriormente se hicieron pruebas de fenoles totales, DQO y COD en el efluente e influente del reactor, pH dentro del reactor y turbidez en el efluente.

Para la alimentación al reactor se utilizó agua sintética con fenol y la cantidad de nutrientes necesarios. El soporte elegido se cortó en rectángulos y fue colocado en forma de un cono invertido, el soporte fue amarrado en la parte inferior del reactor. El área del soporte fue de 1504.8 cm².

El reactor utilizado para las pruebas y colocación del soporte fue de acrílico con una altura de 24 cm y un radio interno de 3.5 cm, el volumen ocupado por el agua sintética fue de 0.9 L.

El aire se suministró por la parte inferior del reactor, para lo cual se utilizó una bomba de aire, ELITE OPTIMA (empleada para acuarios). Se colocaron dos difusores de piedra con la finalidad de tener burbujas de aire pequeñas y mejorar la transferencia de oxígeno.

A la salida del reactor se colocó un recipiente en el cual se podía recolectar el efluente ya tratado y posteriormente poder realizar las técnicas correspondientes de fenoles, DQO y COD. La figura 3.1 muestra una imagen del reactor biológico de lecho fijo utilizado durante la experimentación.



Figura 3.1 Reactor biológico de lecho fijo.

3.3.2. Diseño de experimentos

Las pruebas experimentales se realizaron siguiendo un diseño de experimentos llamado, diseño compuesto central 2^3 con repeticiones al centro y a través de una superficie de respuesta se obtuvieron las mejores condiciones de remoción de fenol y disminución de DQO y COD, así como la menor cantidad de lodos producidos, SSV.

En el diseño de experimentos se varió la cantidad de aire suministrado por la bomba, la concentración de fenol y la concentración de nutrientes.

Para cada experimento se realizaron análisis de fenoles totales, DQO y COD a la salida y entrada del reactor, así como el pH dentro de éste. Debido a la configuración del reactor, no se pudo medir la turbidez en la salida, ya que se notó que gran parte de los lodos se sedimentaban y la medición de esta turbidez sería errónea.

Las variables dependientes e independientes consideradas para el experimento son las siguientes:

- *Variable independiente (factor):* Concentración de fenol, cantidad de nutrientes y flujo de aire.
- *Variable dependiente (factores):* COD, DQO, fenoles, SSV.

En la tabla 3.3 se muestran los 16 experimentos establecidos, para esto se utilizó el programa estadístico Statgraphics®.

Tabla 3.3 Diseño compuesto central 2^3 para el reactor biológico de lecho fijo.

# Exp.	C_{Fenol} [mg/L]	Nutrientes X 100	Flujo Aire [L/min]	Soluciones Nutritivas		
				A [mL]	B [mL]	C [mL]
1	100	1.00	0.999	5.0	0.50	0.50
2	100	0.10	0.999	0.5	0.05	0.05
3	100	0.10	0.577	0.5	0.05	0.05
4	100	1.00	0.577	5.0	0.50	0.50
5	300	1.31	0.788	6.5	0.65	0.65
6	300	0.55	1.143	2.8	0.28	0.28
7	300	0.55	0.788	2.8	0.28	0.28
8	300	0.55	0.788	2.8	0.28	0.28
9	300	0.55	0.433	2.8	0.28	0.28
10	500	1.00	0.577	5.0	0.50	0.50
11	500	1.00	0.999	5.0	0.50	0.50
12	500	0.10	0.999	0.5	0.05	0.05
13	500	0.10	0.577	0.5	0.05	0.05
14	636	0.55	0.788	2.8	0.28	0.28
15	300	0.00	0.788	0.0	0.00	0.00
16	0	0.55	0.788	2.8	0.28	0.28

Para esta parte experimental, la cantidad de nutrientes se redujo a la mitad, donde los valores de 1.00, 0.55 y 0.10 de nutrientes corresponden a los mL de cada solución mostrados en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Cantidad de nutrientes añadida al reactor.

Nutrientes x 100	1	0.55	0.1
mL solución A	5.0	2.75	0.50
mL solución B	0.5	0.28	0.05
mL solución C	0.5	0.28	0.05
mL solución D	0.5	0.28	0.05

Para los experimentos 6 y 9, se manejó el flujo máximo y mínimo de aire proporcionados por la bomba. Para la realización de los 16 experimentos, se inició con las concentraciones de 100 mg/L, posteriormente con las de 300 mg/L y finalmente las de 500 mg/L, en la tabla 3.3 se encuentra el orden en el que se llevaron a cabo los experimentos.

Posteriormente con los datos obtenidos del diseño de experimentos, se generó una superficie de respuesta, donde se representa el comportamiento promedio en cada sitio de la región experimental.

3.3.3. Cuantificación de la biomasa adherida al soporte

Para la cuantificación de la biomasa adherida al soporte, al finalizar los 16 experimentos, se retiró un segmento del paño de rayón-poliestireno usado como soporte y se lavó cuidadosamente con agua destilada para quitar la biopelícula formada en este, estos lodos se contuvieron en un recipiente y se lavó el soporte hasta que ya no se notaran más lodos en este.

Posteriormente se realizó la técnica de SST y SSV con los lodos obtenidos del soporte para poder determinar la cantidad de biomasa adherida (SSV).

Teniendo en cuenta la cantidad de soporte dentro del reactor, se pudo obtener una cantidad aproximada de biomasa adherida al soporte en todo el reactor.

3.4. Cinética de degradación del fenol en un reactor por lotes

Se realizó la degradación del fenol a 100 mg/L, 300 mg/L y 500 mg/L de fenol, y un blanco; para cada experimento se usó la misma cantidad de biomasa adherida al soporte, es decir, se cuidó que en cada recipiente se tuviera la misma cantidad de lodos (2694 mg/L de SSV), se usó un difusor de aire en cada uno, el máximo flujo de aire suministrado por la bomba y una barra magnética con una parrilla de agitación para un buen mezclado. Al blanco no se le agregó fenol, se usó la misma cantidad de lodos y solo se instaló la aireación y la agitación.

Se agregó la cantidad de fenol correspondiente para tener concentraciones de 100 mg/L, 300 mg/L y 500 mg/L en cada recipiente. Para la determinación de COD, DQO, fenoles totales, SST y SSV así como un barrido de la muestra se tomaron 60 mL de cada reactor al tiempo de inicio y posteriormente cada hora.

Mkandawire, Förster, Fiedler, Bötcher y Pompe, 2009, verificaron mediante un espectrofotómetro la biodegradación del fenol, basados en la absorbancia en la región del espectro ultravioleta, por lo que cada muestra que se tomó, fue filtrada y analizada en el espectrofotómetro haciendo un barrido en la región UV-visible encontrando un pico a una longitud de onda de 269nm de, este valor corresponde a los valores en la literatura encontrados para el fenol, alrededor de 235-275 nm.

3.5. Mantenimiento del reactor biológico por lotes

Los microorganismos del reactor por lotes para realizar los objetivos establecidos para este trabajo de investigación ya habían sido aclimatados en meses anteriores al fenol. Para vigilar este reactor se realizaron diariamente pruebas de DQO, COD y fenoles totales y la turbidez se midió solamente durante el periodo de julio a noviembre del 2009. Los SST y SSV solo se midieron durante el segundo periodo de febrero a abril del 2010.

Para este reactor los nutrientes se agregaron cada 15 días y consistían en 5 mL de la solución A, 0.5 mL de las soluciones B, C y D. El reactor consiste en un prisma rectangular con capacidad de 31 L, a este reactor se le agregaron 5 g de fenol durante el tiempo de julio a noviembre del 2009 por día, teniendo una concentración inicial 160 mg/L de fenol. Desde febrero a abril del 2010 se le agregaron 10 g de fenol cada día, obteniendo una concentración inicial de 320 mg/L de fenol.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en la parte experimental de este trabajo de tesis. Se analizaron los resultados conseguidos de remoción de fenol, disminución de DQO y COD y los SSV desprendidos del reactor biológico de lecho fijo y del reactor por lotes, así como la cinética de degradación de fenol.

4.1. Selección del soporte

- **Soporte: Esponja para lavar trastes**

Este soporte seleccionado tenía dos superficies, por un lado una esponja y por el otro lado una fibra de cocina para lavar trastes, el soporte se introdujo en el reactor por lotes durante 1 semana, pero se notó que no existía adherencia por parte de los microorganismos y se dejó sumergido una semana más, después de este tiempo se retiró el material y nuevamente no se observó una buena adherencia por parte de los microorganismos al soporte, al sacar del reactor prácticamente la esponja estaba limpia, mientras que por la parte de la fibra se notaba una leve adherencia, uno de los inconvenientes encontrados al usar este tipo de material es que la esponja flotaba y por lo mismo la parte de la fibra, no se encontraba sumergida del todo en el reactor.

- **Soporte: Rodillo para pintar fabricado de nylon y poliéster**

El rodillo estuvo sumergido por un periodo de una semana dentro del reactor por lotes, inmediatamente se observó que los microorganismos se adherían al rodillo pero se percató que aunque disminuía la concentración de fenol, no estaban removiendo totalmente el fenol como en días anteriores, el reactor por lotes se desestabilizó.

En el gráfico 4.1 se observa el periodo de desestabilización. A este reactor se le agregaban 5 g de fenol por día teniendo una concentración inicial de 160 mg/L

de fenol y durante los primeros 21 días degradó casi todo el fenol, mientras que en la cuarta semana las concentraciones de fenol fueron mayores a 10 mg/L .

Después de retirar el repuesto el rodillo, se disminuyó la cantidad de fenol agregada por día a 2.5 g para que el sistema nuevamente volviera a degradar.

El que no se tuviera una mayor remoción de fenol al utilizar el rodillo para pintar como soporte, se puede atribuir a diferentes factores uno de ellos puede ser que la mayoría de los microorganismos se fijaron en el interior del rodillo, el espesor de este rodillo era de aproximadamente de 3 cm y esto evitó que el oxígeno pudiera llegar a todos ellos, teniendo una baja remoción de fenol por la ausencia de oxígeno. Otro factor es que pudo haber aumentado la temperatura ambiente provocando un incremento en la actividad metabólica de los microorganismos, aunque por otro lado también causa la disminución en la solubilidad del oxígeno en el agua lo cual afecta a la remoción del contaminante.

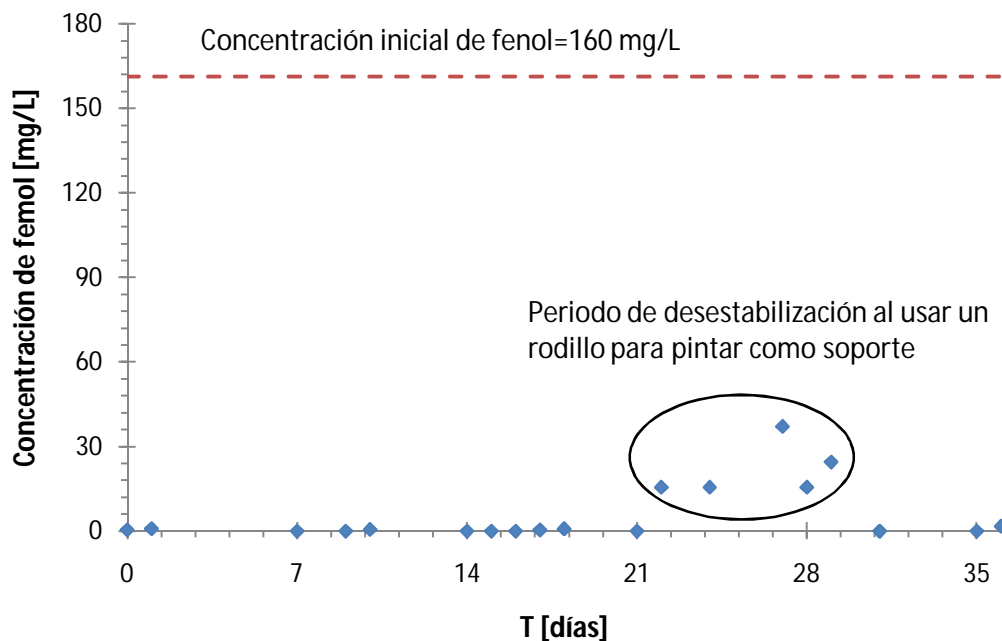


Gráfico 4.1 Desestabilización del reactor por lotes al probar un repuesto de rodillo para pintar como soporte.

- **Soporte: Paño de cocina para secar fabricado de rayón y poliestireno**

El paño de cocina utilizado de rayón y poliestireno (según leyenda en la envoltura), se cortó una tira de este material y se introdujo dentro del reactor por lotes por un periodo de 4 días; al retirar el paño después de este tiempo se percato que éste tenía una buena adherencia de los microorganismos por lo que se decidió trabajar con este soporte para montar el reactor biológico de lecho fijo.

4.2. Pruebas en el reactor biológico de lecho fijo (RBLF)

Para utilizar el paño de cocina como soporte en el RBLF se procedió a cortar en varios rectángulos de 36 cm de largo por 1.9 cm de ancho para posteriormente colocarlos dentro del reactor. Una vez montado el reactor de lecho fijo, se inoculó con los lodos del reactor por lotes por un periodo de dos días.

4.2.1. Operación del reactor biológico de lecho fijo a diferentes flujos

Una vez inoculado el reactor se procedió a realizar pruebas a dos diferentes flujos de caudal de alimentación, el primer flujo fue de 0.64 mL/min y el segundo de 1.5 mL/min, con una concentración de 100 mg/L de fenol.

El tiempo de retención hidráulico θ_{RH} , la DQO promedio en la entrada del reactor, la carga orgánica volumétrica, la turbidez y los SSV obtenidos en cada prueba se muestran en la tabla 4.1. Es importante mencionar que los SSV fueron medidos solo una vez en cada experimento y estos corresponden a los sólidos desprendidos del soporte.

Se observa en la gráfica 4.2 que para el primer flujo, a través de las 2 semanas de operación la cantidad de COD en el efluente disminuye, llegando a notar que se estabiliza en la segunda semana de operación. Al cambiar las condiciones y aumentar el flujo (flujo 2), el COD en el fluente aumenta, debido a que la carga orgánica volumétrica (COV) se incremento de 9 a 21 gDQO/m³h.

Tabla 4.1 Condiciones de operación del reactor de lecho fijo.

Parámetro	Flujo 1	Flujo 2
$C_{\text{Influyente de FENOL}}$ [mg/L]	100	100
$\text{Flujo}_{\text{influyente}}$ [ml/min]	0.64	1.51
θ_{RH} [h]	23.3	9.9
COV [gDQO/m ³ h]	9.05	21.35
$\text{DQO}_{\text{Influyente PROMEDIO}}$ [mgDQO/L]	212.18	212.18
Turbidez _{Efluente} [NTU]	Menor a 3	Menor a 3
SSV [mgSSV/L]	86.67	93.37

En este periodo de tiempo se obtuvo una casi completa degradación del fenol al utilizar ambos flujos de agua sintética, lo anterior se puede observar en la gráfica 4.2.

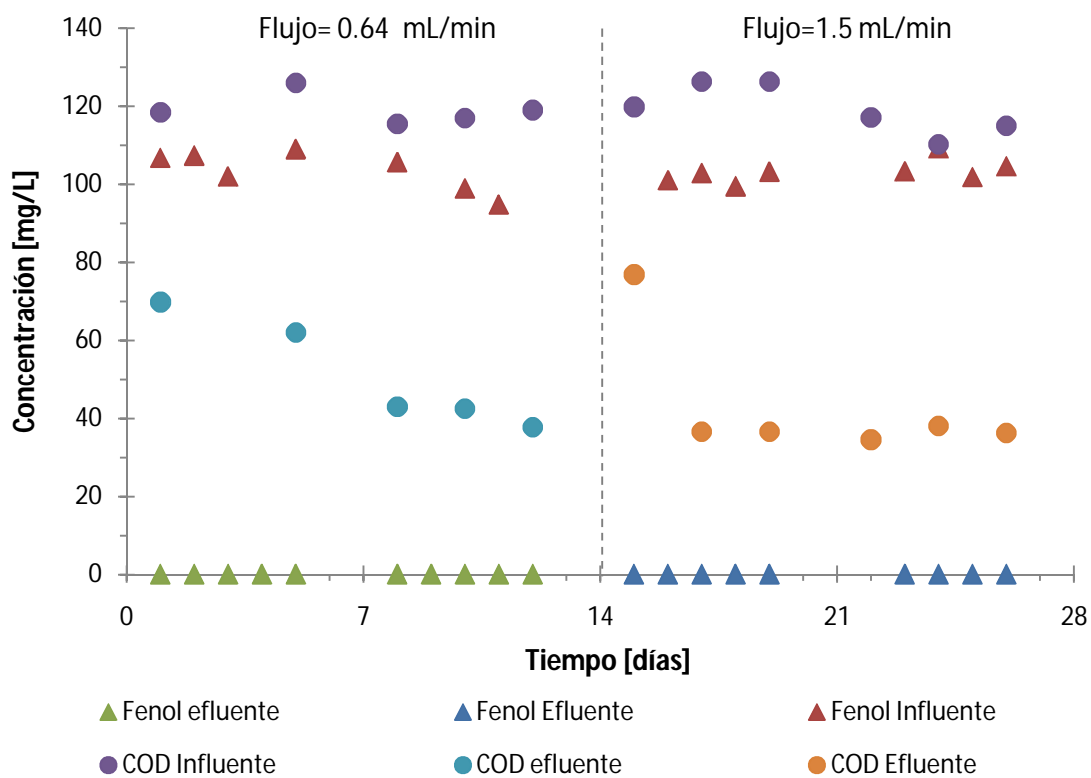


Gráfico 4. 2 Disminución de COD y fenol a ambos flujos de operación.

En cuanto a la remoción de DQO, en el gráfico 4.3 se observa que para el primer flujo se lograron remociones superiores al 73% pero al incrementar el flujo (segunda condición) la carga orgánica volumétrica aumenta por lo que la remoción de DQO disminuyó siendo mayor a un 40%.

Las disminuciones en la DQO fueron obtenidas en base a los resultados obtenidos, estos se encuentran en el anexo 6.1 así como el cálculo de las disminuciones de DQO.

La turbidez obtenida a la salida del reactor fue muy baja, siendo esta menor a 3 NTU y el pH osciló de 6.8 a 7.5 durante el tiempo que se realizaron las pruebas.

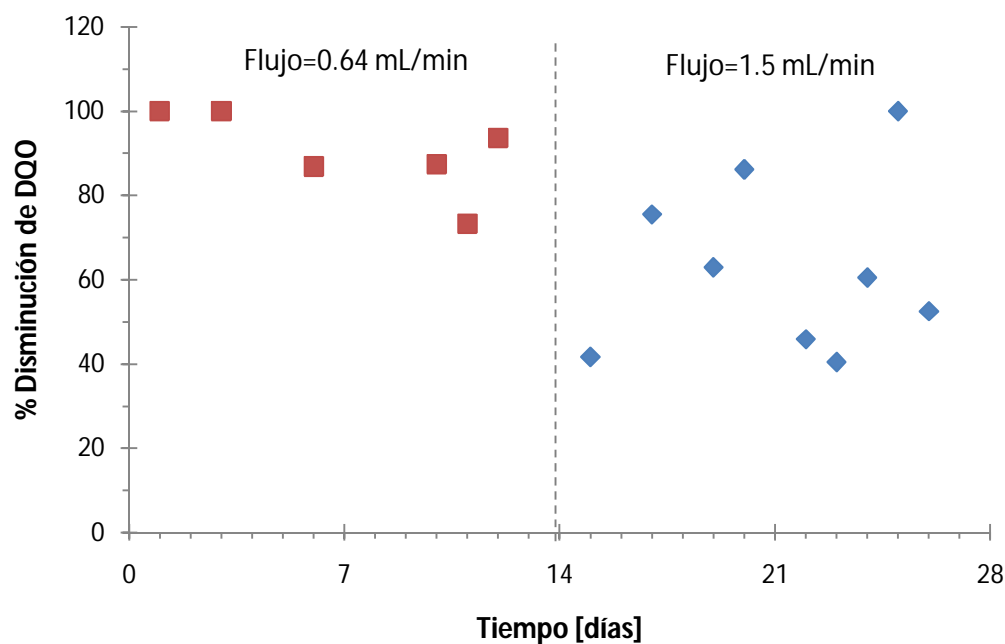


Gráfico 4.3 Disminución de DQO a ambos flujos de operación

4.2.2. Diseño de experimentos

La bomba utilizada para suministrar el aire al reactor, maneja tres flujos de aire, con base a la densidad y composición del aire, se calculó el flujo molar de oxígeno, estos datos se encuentran en la tabla 4.2.

Tabla 4. 2 Flujo de aire suministrado por la bomba.

Flujo Mínimo	Flujo Medio	Flujo Máximo	Unidades
0.57	0.78	0.99	[L/min]
5.20	7.10	9.00	[mmolO ₂ /min]

Una molécula que se oxida es aquella que dona electrones, pero necesita de otras moléculas que acepten electrones, es decir que se reduzcan, para obtener la energía necesaria en el desarrollo celular. Durante la degradación del fenol, las bacterias con respiración aerobia utilizan el O₂ como aceptor de electrones.

Durante esta oxidación del fenol, el modelo estequiométrico teórico, que muestra como a medida que se va degradando el fenol se consume el O₂ y se produce CO₂ es:



Estas moléculas de oxígeno utilizadas como aceptor de electrones en la oxidación del fenol, también son utilizadas en la activación de las dioxigenasas que rompen metabólicamente este compuesto.

La capacidad de remoción de un contaminante está íntimamente ligada con la concentración de oxígeno disuelto.

A mayor temperatura, menor es la concentración del oxígeno disuelto, sin embargo es mayor la cantidad de actividad biológica, y por tanto, existe una mayor demanda de oxígeno, lo que acrecienta el problema que provoca un contaminante; otro factor que influye es la agitación, ya que aumenta la transferencia y disolución del oxígeno y las posibilidades de mantener el agua a saturación. El oxígeno disuelto también disminuye al aumentar la salinidad, la altitud con respecto al nivel del mar (disminuye un 7% cada 60m). En la Ciudad de México se tiene como concentración de saturación del oxígeno 7.2 mg/L de a 20 °C, a nivel del mar es de 9 mg/L. Estos valores son fijos si no hay un cambio en la temperatura o

presión del sistema, por lo que aunque se le suministre mas oxígeno al reactor, una vez alcanzada la saturación del agua por el oxígeno, no se podrá disolver más oxígeno en el agua, el oxígeno que no se disuelve sale del reactor.

Esta concentración de oxígeno disuelto disminuye a medida que la materia es descompuesta por las bacterias, si la rapidez con la cual se reduce el oxígeno es mayor a la tasa de disolución del oxígeno, la concentración de éste baja, pudiendo alcanzar condiciones anaerobias, y debido a que tenemos bacterias aerobias esto afectaría la remoción del fenol, por lo cual es importante tener una aireación constante en el reactor para asegurar que siempre exista oxígeno disuelto en el agua disponible para los microorganismos.

Los resultados obtenidos para los 16 experimentos se muestran en la tabla 4.3. Para todos los experimentos se obtuvo una remoción de fenol de más del 94%, por lo que, el principal objetivo de degradar el fenol se cumple a cualquier condición dentro de este intervalo, ahora el interés se centra en disminuir la cantidad de DQO y COD en el efluente de salida del reactor. La disminución de DQO es muy variable, se tienen disminuciones mayores al 76% para aquellos casos donde la concentración de fenol es de 300 mg/L y 500 mg/L, para la disminución de COD se obtiene un comportamiento similar, se obtiene una mayor disminución, mayores a un 83% para las concentraciones de 300 mg/L y 500 mg/L de fenol.

Para los experimentos donde se manejó una concentración inicial de 100 mg/L, a pesar de que se removió también la mayor parte de fenol, la disminución de DQO varió desde un 34% hasta un máximo de 72% mientras que la disminución de COD fue de un 60% a un 70% aproximadamente. Estos valores de son mucho menores a los obtenidos a concentraciones altas de fenol, esto es según los resultados obtenidos durante la experimentación.

Tabla 4.3 Resultados de remoción obtenidos en el diseño experimental.

# Exp.	C _{Fenol} [mg/L]	DQO %Disminución	COD %Disminución	Fenol %Remoción	SST	SSV
					[mg/L]	[mg/L]
1	100	35.0	56.1	99.994	148	120
2	100	49.8	59.9	99.994	208	198
3	100	43.4	71.6	99.989	267	223
4	100	71.9	63.0	99.989	373	323
5	300	86.3	90.3	99.886	639	567
6	300	87.4	85.8	99.900	1144	1052
7	300	80.5	84.8	99.999	737	648
8	300	77.2	84.8	99.999	737	648
9	300	88.3	83.2	99.998	787	687
10	500	86.5	92.3	94.896	1430	1247
11	500	76.2	92.8	99.999	1077	900
12	500	82.8	91.6	99.999	1359	1223
13	500	84.1	91.4	99.998	1624	1505
14	636	85.8	89.5	99.998	941	886
15	300	85.8	83.7	99.771	964	909
16	0	0	0	99.000	532	487

El comportamiento encontrado para el COD y la DQO es debido a que a concentraciones de 100 mg/L, el tiempo de retención hidráulico del reactor, θ_{RH} es muy grande, los microorganismos están degradando esa cantidad de fenol en un tiempo menor y debido a que el sustrato se termina antes, los microorganismos entran en una fase endógena, por lo tanto los carbohidratos, aminoácidos y otros componentes liberados debido, a la lisis celular son usados como nutrientes para los microorganismos que aún viven, pero llega un momento en que los microorganismos ya no pueden sobrevivir y muchos de ellos mueren. Esta lisis celular contribuye al carbono orgánico disuelto y por ende a la demanda química de oxígeno, por esta razón se decidió realizar la cinética de la degradación del fenol a 100, 300 y 500 mg/L de fenol.

La cantidad de SST y SSV desprendidos en el reactor, aumentaron conforme se incrementó la concentración de fenol y transcurría el tiempo. Esto se debe a que la biopelícula se encuentra en constante renovación, no fue posible

medir el espesor de ésta en el transcurso de los experimentos, pero para un óptimo funcionamiento ésta no debe ser tan gruesa; según Winkler se ha demostrado que la remoción de sustrato por una biopelícula aumenta linealmente con el incremento del espesor de esta biopelícula hasta un nivel máximo donde permanece constante con aumentos adicionales del espesor de ésta, el espesor que proporciona máxima eficiencia ha sido citado como 0.25 mm, si la biopelícula se engruesa demasiado se formará una parte anaerobia que originará su posterior desprendimiento.

Este fenómeno fue muy notorio a 300 mg/L y 500 mg/L ya que al existir más sustrato hay más crecimiento de microorganismos, el espesor de la biopelícula aumenta y llega un momento en que una parte se desprende para conservar un espesor adecuado y puedan penetrar en la biopelícula los nutrientes y el oxígeno y así poder seguir degradando el reactor.

Una vez obtenidos los resultados de todos los experimentos, se empleó el paquete estadístico STATGRAPHICS®PLUS 5.1, para generar las superficies de respuesta y encontrar las mejores condiciones de operación del reactor.

- **Análisis de resultados de la disminución de la DQO**

La ecuación 4.2 se refiere a la remoción de DQO en función de la concentración de fenol, cantidad de nutrientes agregada y flujo de aire, que ajusta los datos a una superficie de respuesta es la siguiente:

$$\begin{aligned} \%R_{DQO} = & 37.6176 + 0.307768C_F + 54.6705C_N - 76.6316F_A - 0.000384573C_F^2 - 0.0248333C_FC_N \\ & + 0.0558319C_FF_A + 7.76415C_N^2 - 68.7849C_NF_A + 52.3726F_A^2 \end{aligned} \dots\dots\dots 4.2$$

Con esta ecuación se evaluaron las condiciones de 0 a 500 mg/L de fenol en intervalos de 50 mg/L, con 1 de nutrientes y 0.1 nutrientes a los tres flujos de aire que maneja la bomba y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4.4 Resultados obtenidos con la ecuación de remoción de DQO.

Flujo de Aire	0.57 [mL/min]		0.78 [mL/min]		0.99 [mL/min]	
C_{FENOL}	Nutrientes x 100		Nutrientes x100		Nutrientes x100	
[mg/L]	1	0.1	1	0.1	1	0.1
	%Disminución de DQO					
0	34	12	18	10	7	12
50	48	28	33	26	23	29
100	61	42	47	41	37	44
150	72	54	58	54	49	58
200	81	65	68	64	59	69
250	88	73	76	73	68	78
300	94	79	81	80	74	86
350	97	83	85	85	78	91
400	98	86	87	88	81	95
450	98	86	87	89	82	97
500	95	85	85	88	80	96

Tal como se puede ver en la tabla 4.4, al flujo más bajo de aire se favorece la disminución de DQO, al agregar la mayor cantidad de nutrientes pero solo se alcanza a obtener un 95% de la disminución de la DQO para la concentración más alta de contaminante. Al aumentar el flujo de aire a concentraciones bajas de contaminante, la disminución de DQO se redujo comparado con el menor flujo de aire, pero se favorece a concentraciones altas de contaminante en el caso del máximo flujo. Para la mayor concentración de fenol, 500 mg/L, es preferible tener un flujo mayor de aire y la cantidad mínima de nutrientes, ya que se mejora la disminución de la DQO hasta en un 16%.

La figura 4.1 muestra la superficie de respuesta obtenida para la disminución de DQO con el mayor flujo de aire, 0.99 mL/min. En esta figura se puede observar que la remoción más alta de DQO corresponde para este flujo, a la concentración más alta de fenol, 500 mg/L y con la mínima adición de nutrientes.

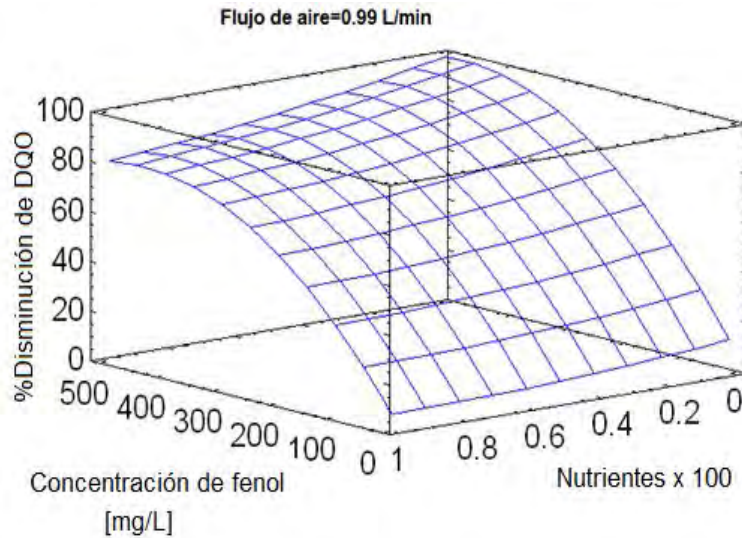


Figura 4.1 Superficie de respuesta para la disminución de DQO.

En la figura 4.2 se muestra los contornos de la superficie de respuesta para un flujo de 0.99 mL/min de aire, en la cual, cada línea del contorno representa combinaciones de cantidad de nutrientes y concentración de fenol que dan un valor seleccionado del % de disminución de la DQO, es decir para obtener una disminución en la DQO del 90% la concentración de fenol deberá oscilar entre 300 y 500 mg/L y entre 0 y 0.4 de nutrientes, si se agregan más nutrientes la remoción disminuirá.

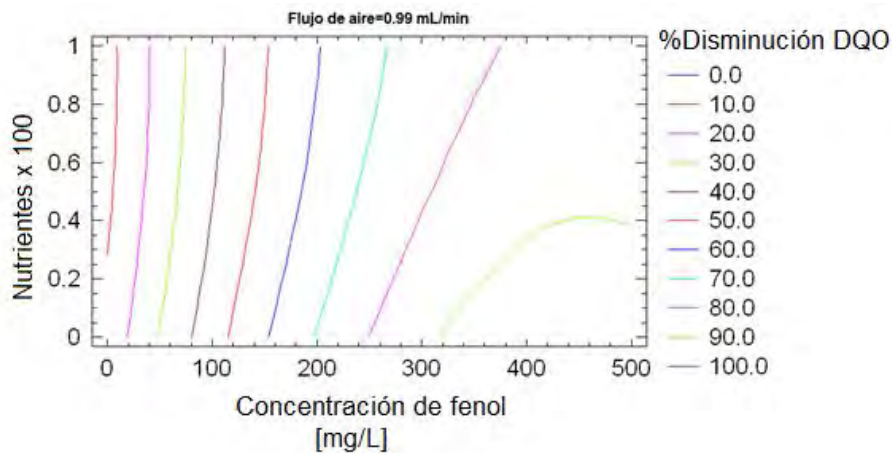


Figura 4. 2 Gráfico de contorno de las superficies de respuesta estimada para el % de disminución de la DQO.

- **Análisis de resultados de disminución de COD**

La ecuación 4.3 muestra la remoción de COD en función de la concentración de fenol, cantidad de nutrientes agregada y flujo de aire, que ajusta los datos a una superficie de respuesta es la siguiente:

$$\%R_{COD} = 85.8923 + 0.241659C_F - 40.8049C_N - 109.62F_A - 0.000323471C_F^2 + 0.0201556C_FC_N + 0.0570337C_FF_A + 24.719C_N^2 + 6.76008C_NF_A + 53.3314F_A^2$$

.....4.3

Con la ecuación 4.3, al igual que con el DQO se evaluaron diferentes concentraciones de fenol, con los tres flujos de aire que maneja la bomba y con la máxima cantidad de nutrientes, 1, y una mínima cantidad 0.1 de nutrientes, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.5.

Tabla 4.5 Resultados obtenidos con la ecuación de remoción de COD.

Flujo de Aire	0.57 [mL/min]		0.78 [mL/min]		0.99 [mL/min]	
C _{FENOL} [mg/L]	Nutrientes x 100		Nutrientes x 100		Nutrientes x 100	
	1	0.1	1	0.1	1	0.1
	%Disminución de COD					
0	28	37	22	29	20	26
50	42	50	36	43	35	41
100	54	61	49	55	49	53
150	65	71	61	65	61	64
200	74	79	70	74	71	74
250	82	86	78	81	80	81
300	88	91	85	87	87	87
350	92	94	90	91	92	92
400	94	96	93	93	96	95
450	95	96	94	94	98	96
500	95	94	94	93	99	96

Se puede notar a concentraciones altas de fenol se tienen disminuciones de COD mayores a un 93%. Para una concentración de 500 mg/L de fenol, es preferible manejar el mayor flujo de aire y agregar nutrientes, obteniéndose una disminución en el COD de hasta 99%

La superficie de respuesta de la disminución del COD con el mayor flujo de aire, 0.99 mL/min se muestra en la figura 4.3.

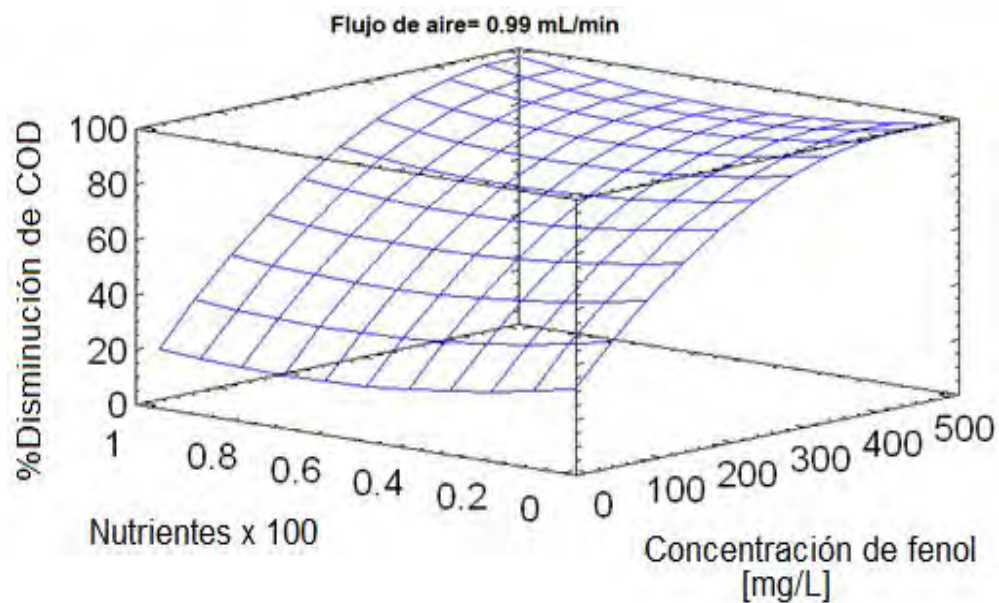


Figura 4.3 Superficie de respuesta para la disminución de COD.

En la superficie de respuesta, se nota que se obtiene la máxima disminución del COD para la concentración más alta de fenol con la mayor cantidad de nutrientes.

La figura 4.4 muestra los contornos de la superficie de respuesta de la disminución de COD para un flujo de aire de 0.99 mL/min, se puede ver que para tener disminuciones mayores a un 90% se debe trabajar con concentraciones de fenol mayores a 400 mg/L.

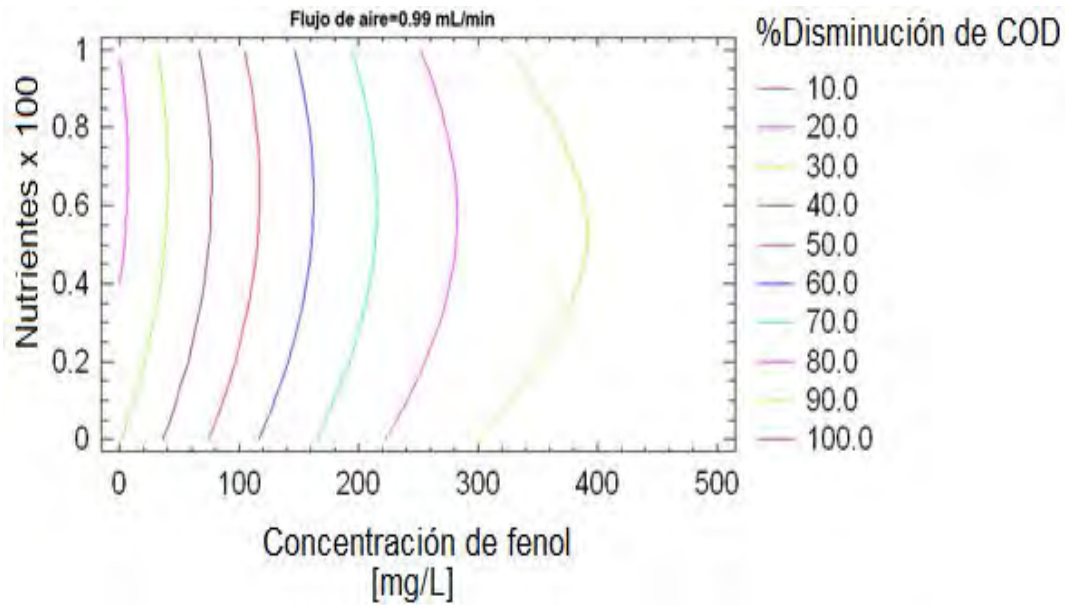


Figura 4. 4 Gráfico de contorno de las superficies de respuesta estimada para la remoción de COD.

- **Análisis de resultados de SSV**

La ecuación 4.4 modela los SSV desprendidos en función de la concentración de fenol, cantidad de nutrientes agregada y flujo de aire, que ajusta los datos a una superficie de respuesta es la siguiente:

$$SSV = 416.095 + 3.85658C_F + 273.385C_N + 1374.62F_A - 0.00110541C_F^2 - 0.837722C_FC_N - 1.18662C_FF_A + 34.9647C_N^2 - 320.374C_NF_A + 1156.24F_A^2 \dots\dots\dots 4.4$$

Con esta ecuación, al igual que con el DQO y COD se evaluaron diferentes concentraciones de fenol, con los tres flujos de aire que maneja la bomba y con la máxima cantidad de nutrientes, 1, y una mínima cantidad 0.1 de nutrientes, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.6.

Tabla 4.6 Resultados obtenidos con la ecuación de SSV.

Flujo de Aire	0.57 [mL/min]		0.78 [mL/min]		0.99 [mL/min]	
C_{FENOL}	Nutrientes		Nutrientes		% Nutrientes	
[mg/L]	1	0.1	1	0.1	1	0.1
	SSV [mg/L]					
0	134	20	110	56	184	189
50	248	172	211	195	273	316
100	357	318	307	329	357	438
150	460	458	397	457	435	554
200	557	594	482	580	508	664
250	649	723	562	697	575	769
300	735	847	635	808	637	868
350	816	966	704	914	693	962
400	891	1078	766	1015	744	1051
450	961	1186	824	1109	789	1133
500	1025	1288	875	1199	828	1211

Se puede ver que al disminuir los nutrientes aumenta la cantidad de sólidos desprendidos en el reactor, debido a que estos nutrientes son necesarios para los microorganismos. Al aumentar la concentración de fenol es mayor la producción de microorganismos y por ende aumentan la cantidad de estos que se desprenden. Pero comparando los resultados de los tres flujos de aire que maneja la bomba, a concentraciones altas de fenol y al máximo flujo de aire es menor la cantidad de SSV desprendidos que al mínimo flujo de aire, y tomando en cuenta que las remociones de DQO y COD se favorecen con el mayor flujo de aire, la superficie de respuesta modelada por la ecuación de los SSV con el máximo flujo de aire, 0.99 mL/min se representa en la figura 4.5.

Como es de esperarse la cantidad de SST es mayor a la cantidad de SSV. La ecuación 4.5 modela el comportamiento de los SST en función de la concentración de fenol, nutrientes y flujo de aire.

$$SST = 596.947 + 4.00575C_F + 298.374C_N - 1757.64F_A - 0.0013915C_F^2 - 0.726306C_FC_N - 0.989402C_FF_A + 16.6931C_N^2 - 333.61C_NF_A + 1353.28F_A^2$$

..... 4.5

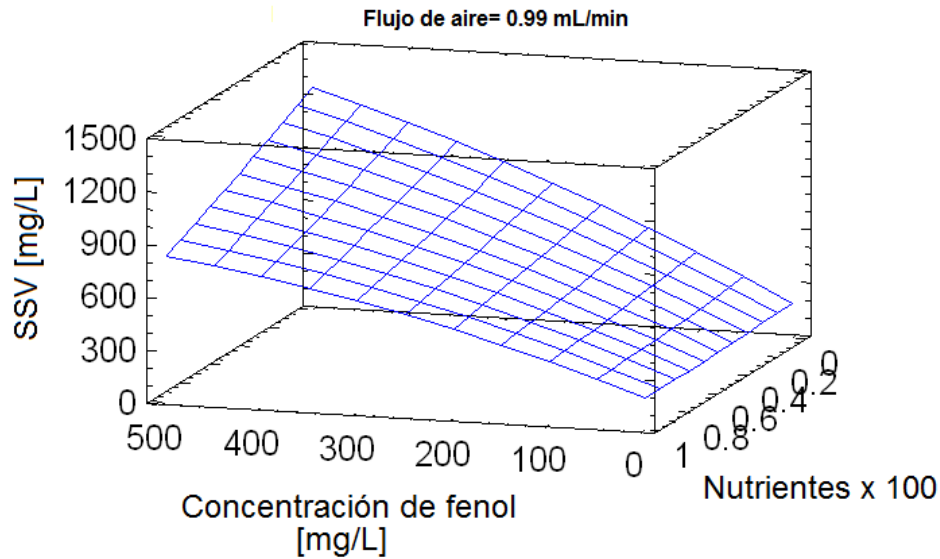


Figura 4.5 Superficie de de respuesta para los SSV desprendidos en el reactor.

4.2.3. Cuantificación de la biomasa adherida al soporte

El área de soporte a la que se cuantificó la biomasa adherida fue de 18.9 cm², la cantidad de sólidos obtenidos en esta área de soporte es de 1.95 mg SST/cm² y 1.79 mg SSV/cm².

Debido a que en el reactor se encuentran 11 tiras de soporte con dimensiones de 36 cm por 1.9 cm de ancho y tomando en cuenta las dos caras del soporte, el reactor cuenta con un área de soporte de 1504.8 cm². Teniendo un total de 2943 mg de SST y una biomasa de 2694 mg de SSV.

4.3. Cinética de degradación del fenol

En la cinética de degradación del fenol, los microorganismos utilizan el fenol como fuente de carbono y energía para poder crecer y reproducirse. En el gráfico 4.4 se muestra la disminución de la concentración de fenol, y en el gráfico 4.5 el aumento de la biomasa, mientras se llevaba a cabo la degradación del contaminante.

Se encontró que para una concentración de 100 mg/L el fenol se degradó completamente en 2 horas, para 300 mg/L se llevó a cabo en 4 horas, y para 500 mg/L en 10 horas.

Los resultados obtenidos de la medición de SSV se muestran en el gráfico 4.5. Para cuantificar el crecimiento microbiano se determinan los SSV, con base a esto se pueden ver las cuatro fases de las curva de crecimiento microbiano, siendo la fase *lag* o de adaptación muy pequeña, debido a que los microorganismos ya estaban adaptados al fenol. La transición entre la fase estacionaria y la fase endógena se lleva a cabo en cuestión de una hora.

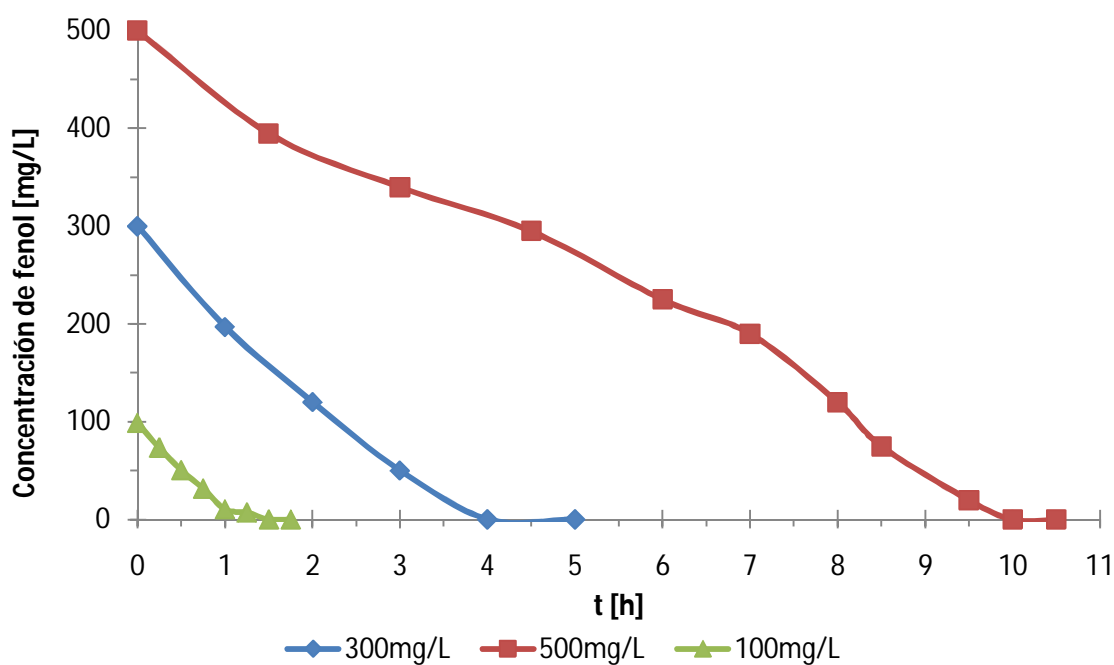


Gráfico 4.4 Disminución de la concentración del fenol.

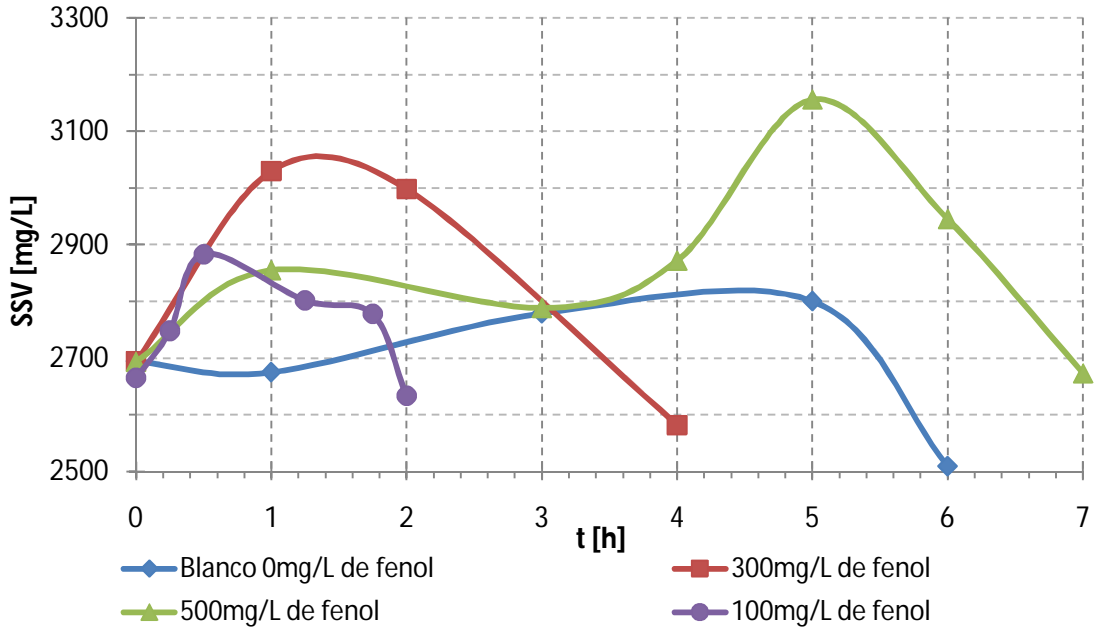


Gráfico 4.5 Resultados de SSV.

Con los resultados obtenidos del gráfico 4.6, se pudo determinar la cantidad máxima de células formadas al consumirse el sustrato, x_{Max} y con la ecuación 2.36 se obtuvo el valor del coeficiente de crecimiento celular Y , siendo este de 0.6821 mgSSV/mg fenol (gráfico 4.6).

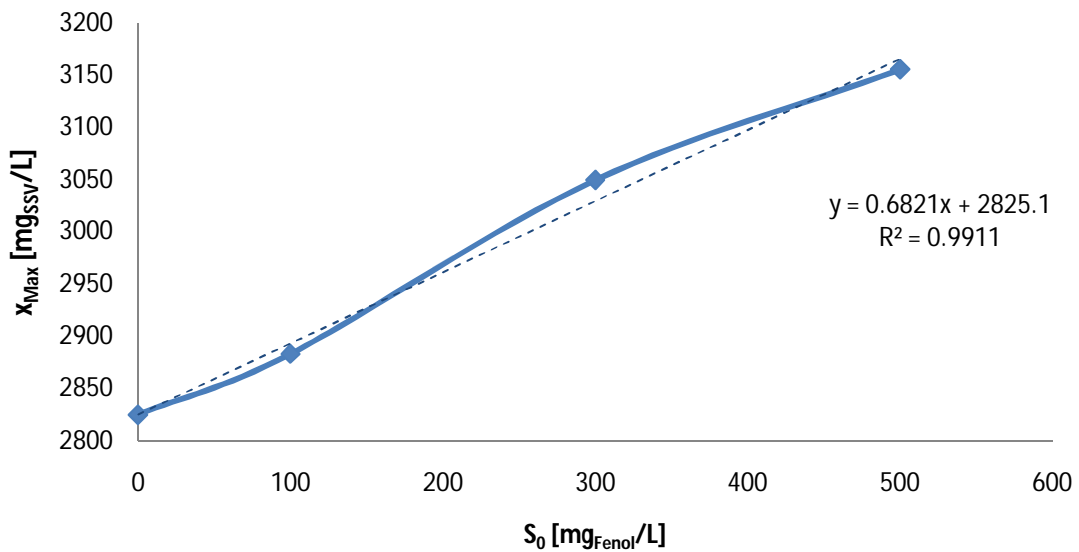


Gráfico 4.6 Coeficiente de crecimiento celular.

Con el valor de Y y la ecuación 2.40 se lograron calcular los valores de la rapidez específica de crecimiento μ . Posteriormente se utilizó la ecuación 2.41 para poder graficar los datos experimentales y obtener los coeficientes cinéticos, esto se muestra en el gráfico 4.7.

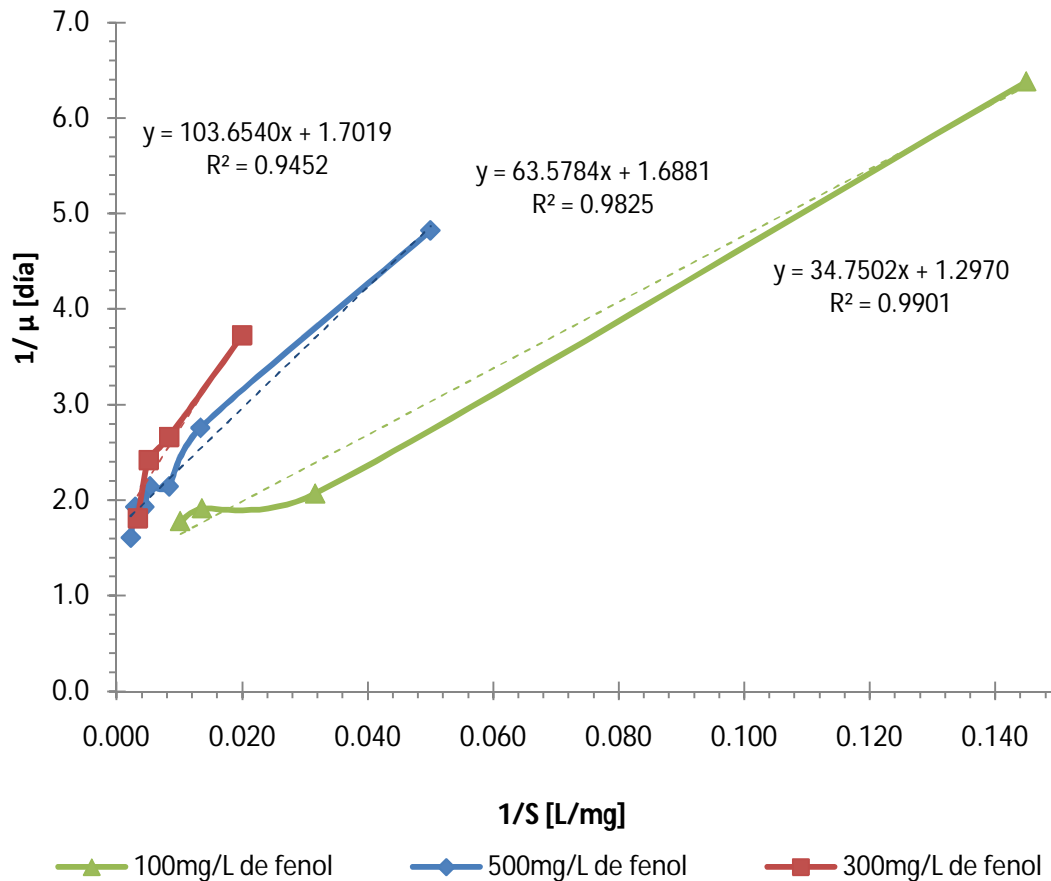


Gráfico 4.7 Obtención de los coeficientes cinéticos de la ecuación de Monod.

En el gráfico 4.8 se muestra el comportamiento de la cinética de crecimiento de microorganismos que crecen aislados para 100 mg/L, 300 mg/L y 500 mg/L de fenol, sin linealizar la ecuación de Monod.

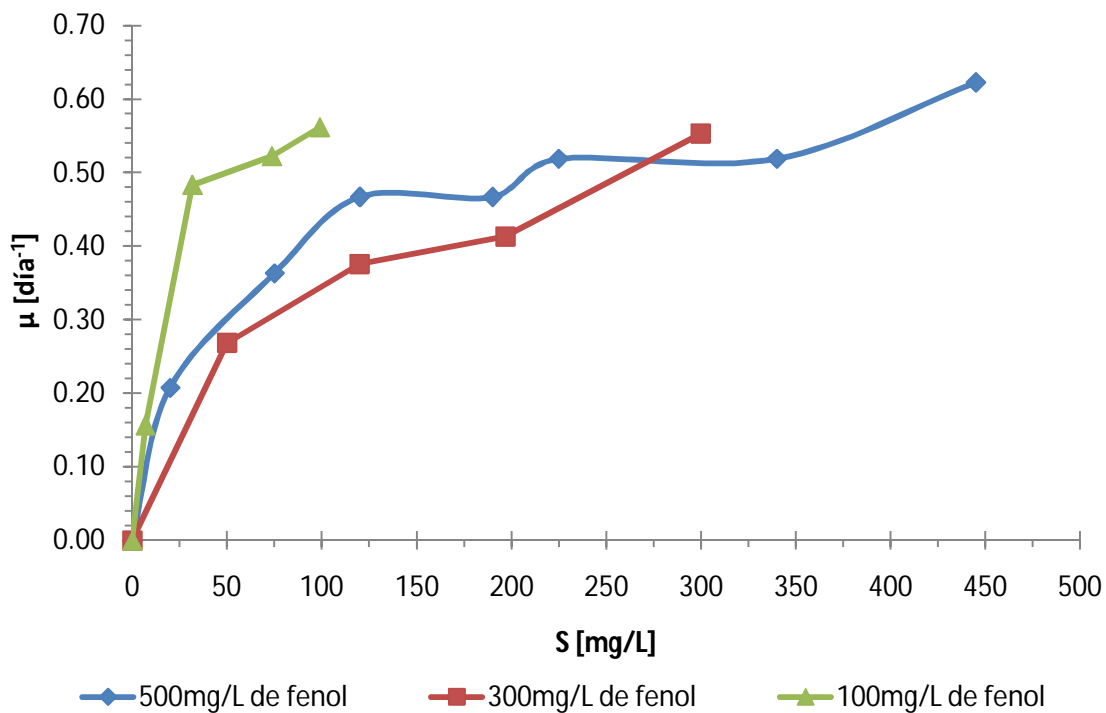


Gráfico 4. 8 Comportamiento de la cinética de crecimiento, utilizando la ecuación de Monod.

Con la finalidad de obtener los respectivos coeficientes cinéticos, se obtuvo el inverso de la ordenada al origen de la ecuación de la línea, para conseguir el valor de la rapidez máxima específica de crecimiento, μ_{Max} y con este resultado y el valor de la pendiente, se obtiene el valor del coeficiente de saturación k_s . Se muestran en la tabla 4.7 los coeficientes cinéticos para 100, 300 y 500mg/L.

Tabla 4.7 Coeficientes cinéticos.

S [mg/L]	k_s [mg/L]	μ_{Max} [día ⁻¹]
100	26.79	0.77
300	60.90	0.58
500	37.66	0.59

Para poder degradar el fenol mediante microorganismos son necesarias ciertas enzimas que ellos mismos sintetizan, por lo que el comportamiento

encontrado en el gráfico 4.7 así como las diferencias en los valores de k_S y μ_{Max} puede ser debido a que otras especies químicas, no solo el sustrato, se pueden combinar con las enzimas para alterar o modular la actividad catalítica.

Según Bailey & Ollis, (1986) y Voet (2006) la variación existente en los valores de k_S y μ_{Max} es debido a que se sufre una inhibición mixta a 300 y 500 mg/L de fenol, y los valores obtenidos son los valores aparentes de la rapidez máxima específica de crecimiento y del coeficiente de saturación para estas concentraciones. Mientras que a 100 mg/L no se experimenta un tipo de inhibición.

Los datos experimentales se ajustan a la ecuación 2.32 para una inhibición mixta, por lo que el efecto en los parámetros de μ_{Max} , k_S , α y α' citado por Voet (2006) se encuentran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8 Efecto de los inhibidores sobre los parámetros cinéticos.

Fenol	μ_{Max} Aparente			k_S Aparente		
100 mg/L	μ_{Max}	0.77	$[h^{-1}]$	k_S	26.79	mg/L
300 mg/L	μ_{Max} Aparente	0.59	$[h^{-1}]$	k_S Aparente	60.91	mg/L
	α'	1.31		α	2.98	
500 mg/L	μ_{Max} Aparente	0.59	$[h^{-1}]$	k_S Aparente	37.66	mg/L
	α'	1.30		α	1.83	

El comportamiento que experimentan los datos es similar a la figura 2.11 para una inhibición mixta, el gráfico 4.9 muestra esta similitud y el aumento de α y α' .

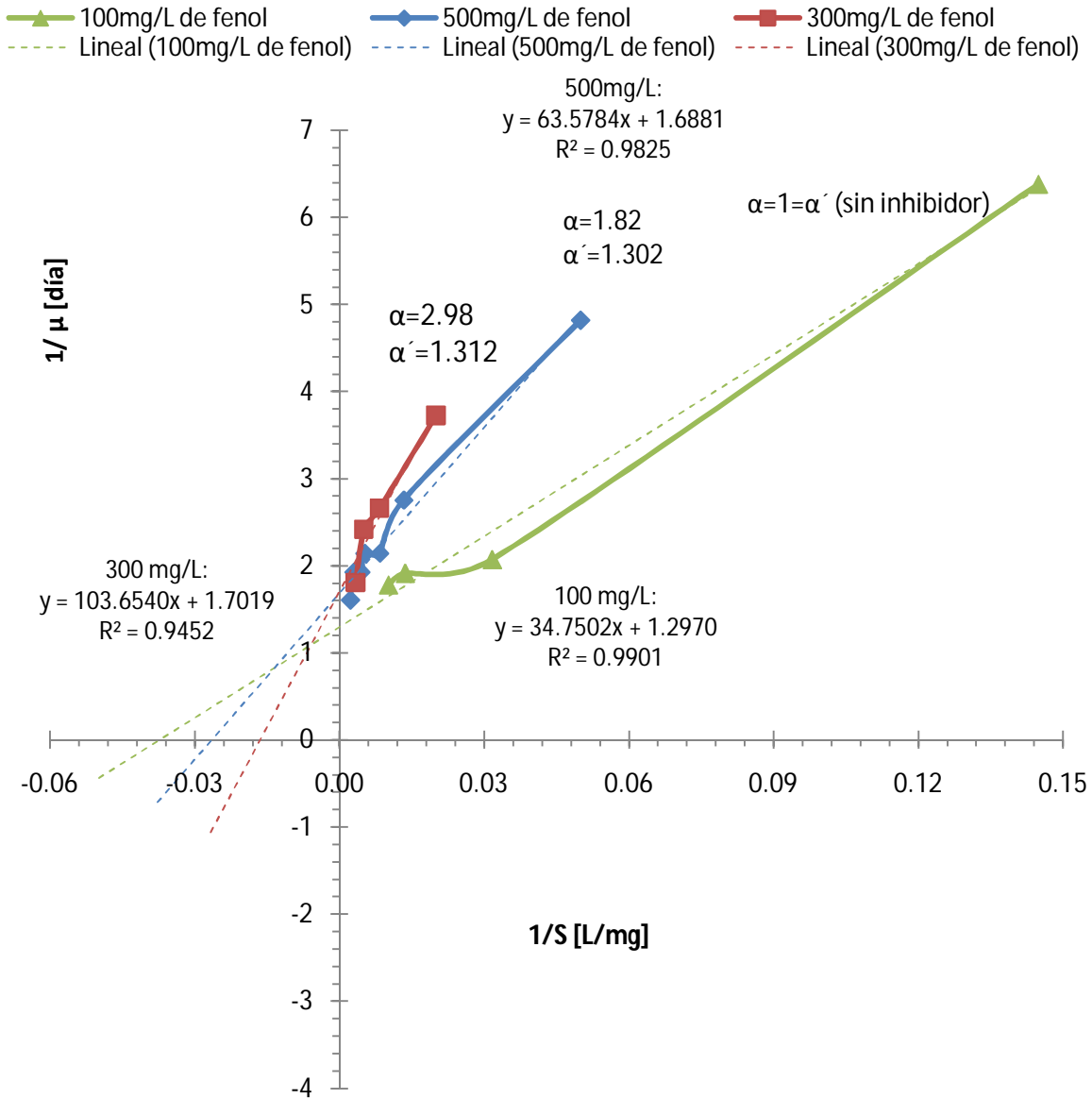


Gráfico 4. 9 Inhibición mixta a 300 y 500 mg/L de fenol.

La disminución del COD a lo largo de esta experimentación se muestra en el gráfico 4.10, al igual que la disminución de la DQO en el gráfico 4.11.

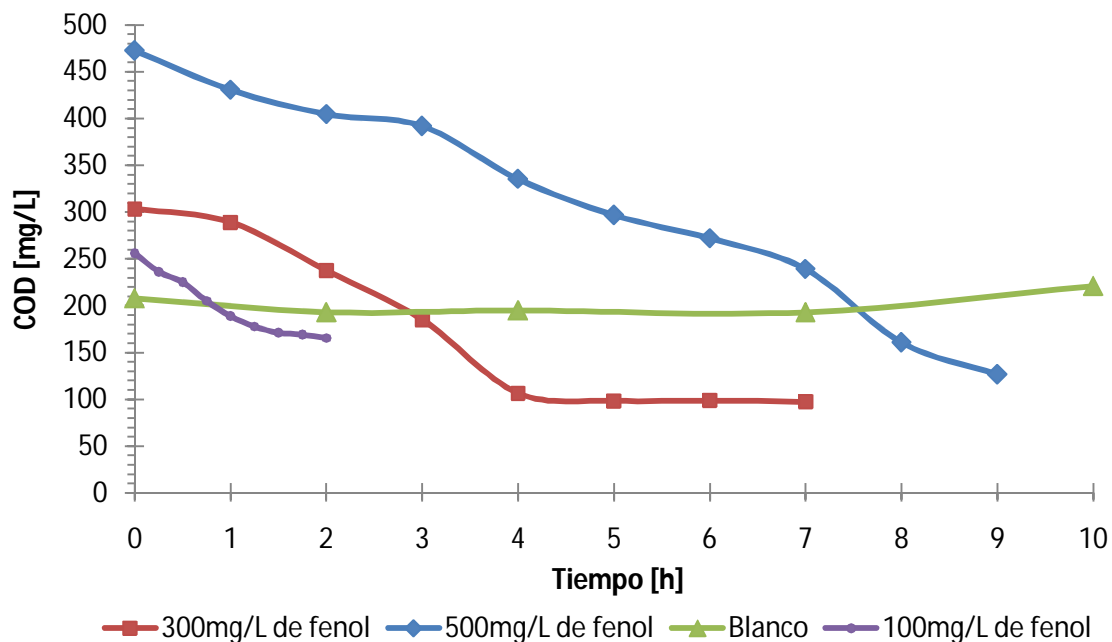


Gráfico 4. 10 Disminución de COD.

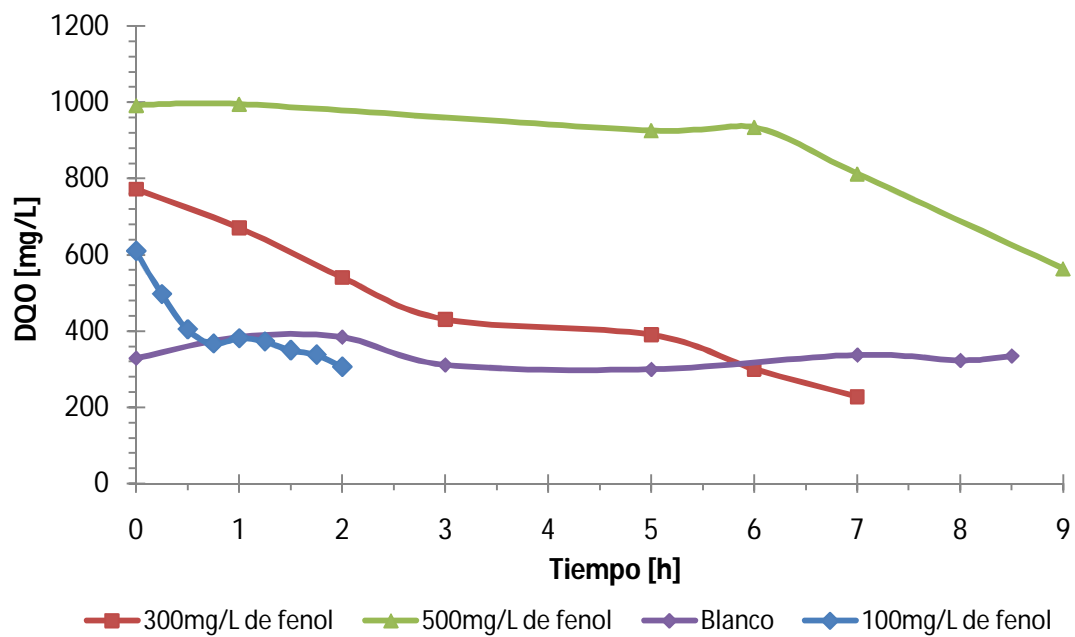


Gráfico 4. 11 Disminución de DQO

Los resultados obtenidos, al analizar las muestras en el espectrofotómetro en la región UV-visible, se muestran en las figuras 4.6 a 4.10, y al igual que Mkandawire et. al. (2009) se encontró la disminución en el pico del fenol al transcurrir el tiempo a 269 nm.

En el caso de la figura 4.6 para 100mg/L de fenol, se puede ver la disminución del pico de fenol en 2 horas.

En la figura 4.7, para 300 mg/L de fenol, se muestra como va disminuyendo el pico de fenol, hasta que desaparece, y se observa la aparición de un nuevo pico a 254 nm que se atribuye a la formación de algún intermediario de la reacción de biodegradación del fenol. Este intermediario tiene una tendencia variante, al transcurrir el tiempo se produce y a la vez se va consumiendo, hasta que desaparece a partir de la hora 14, tal como se ve en la figura 4.8.

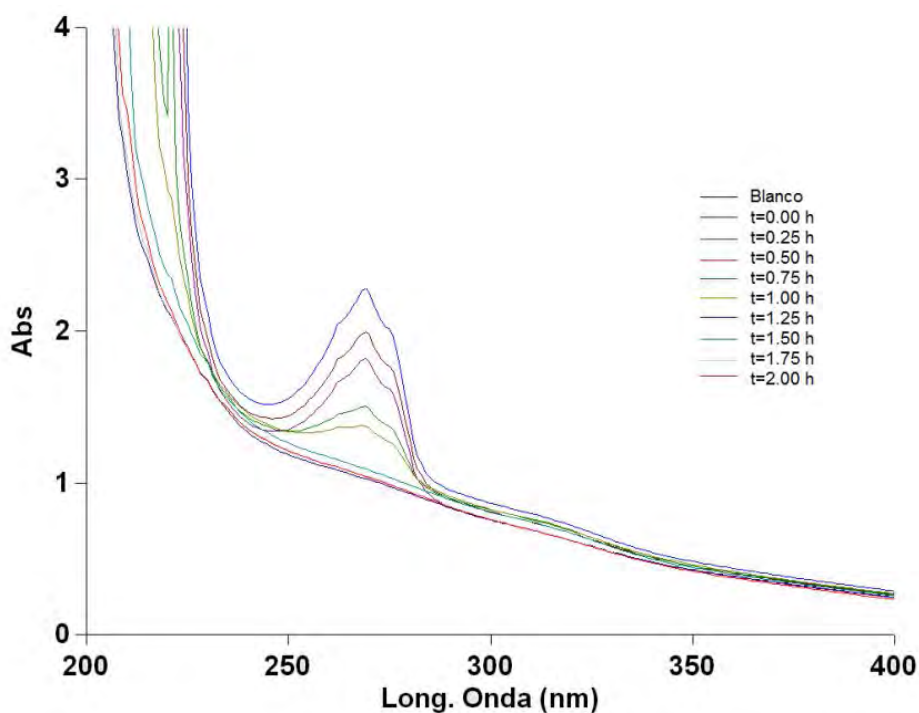


Figura 4.6 Método de Mkandawire et. al.(2009) para 100 mg/L de fenol de 0 a 2 horas.

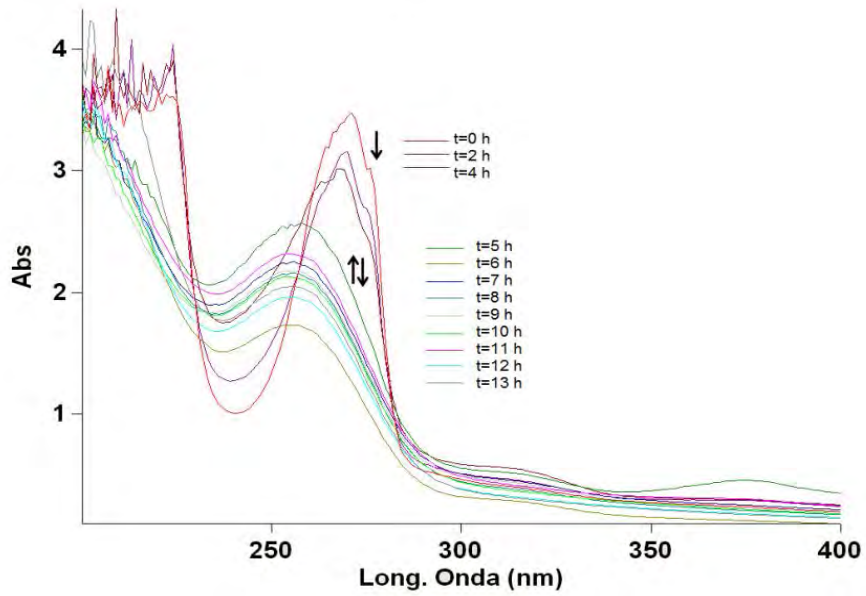


Figura 4.7 Método de Mkandawire et. al. (2009) para 300 mg/L de fenol de 0 a 13 horas.

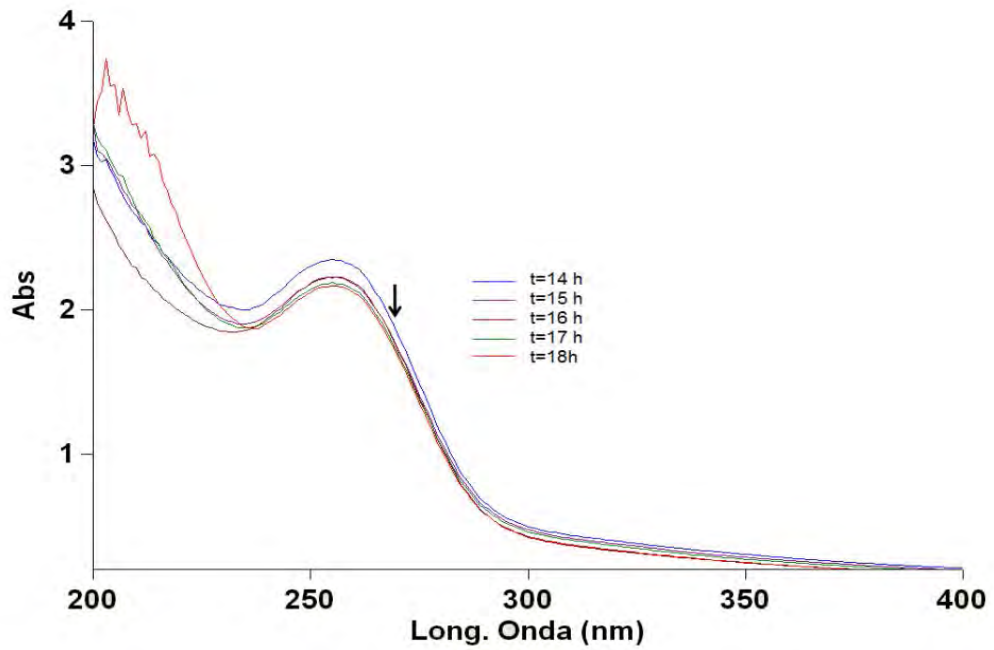


Figura 4.8 Método de Mkandawire et. al. (2009) para 300 mg/L de fenol de 14 h a 18horas.

Un comportamiento similar se encuentra para 500 mg/L de fenol, con la diferencia que el pico del fenol tarda en desaparecer cerca de 10 horas, en la hora siguiente aparece el supuesto intermediario con la misma tendencia encontrada para 300 mg/L de fenol, esto se puede ver en las figuras 4.9 y 4.10 respectivamente.

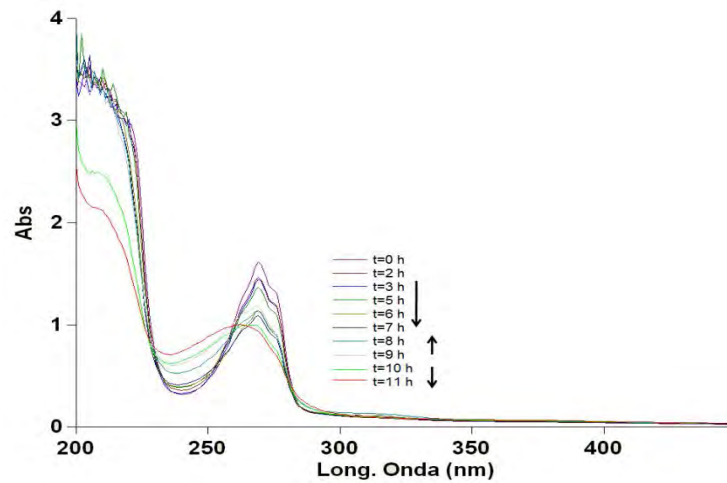


Figura 4.9 Método de Mkandawire et. al. (2009) para 500 mg/L de fenol de 0 a 11 horas.

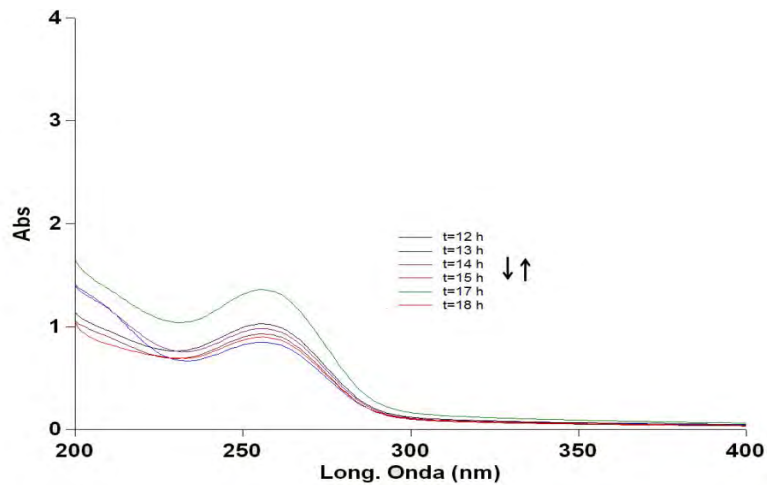


Figura 4.10 Método de Mkandawire et. al. (2009) para 500 mg/L de fenol de 11 a 18 horas.

4.4. Mantenimiento del reactor biológico por lotes

- **Primer periodo julio a noviembre del 2009**

Al reactor por lotes del periodo de julio a noviembre se le agregaron 5 g de fenol cada día, teniendo una concentración inicial de 160 mg/L, después de 20 horas se realizaba una medición de fenoles totales, DQO y COD. Los resultados obtenidos para fenoles totales se muestran en el gráfico 4.12.

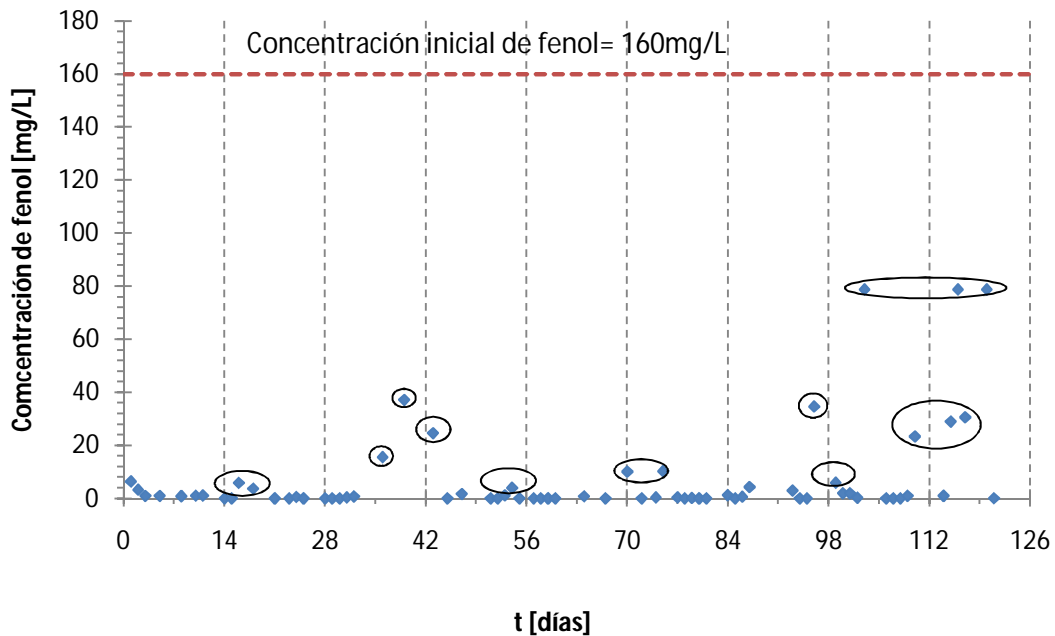


Gráfico 4.12 Seguimiento puntual del consumo de fenol en un periodo de 4 meses.

Se puede ver en el gráfico 4.12 que cada 15 días el reactor no degradaba completamente el fenol, existía un aumento en la concentración del fenol después de 20 horas de operación del reactor, es por esto que se decidió agregar nutrientes a este reactor, teniendo después de este tiempo una casi completa degradación del fenol por los siguientes 15 días aproximadamente.

Los resultados de la medición de DQO y de COD para el último mes del periodo (noviembre) se muestran en los gráficos 4.13 y 4.14.

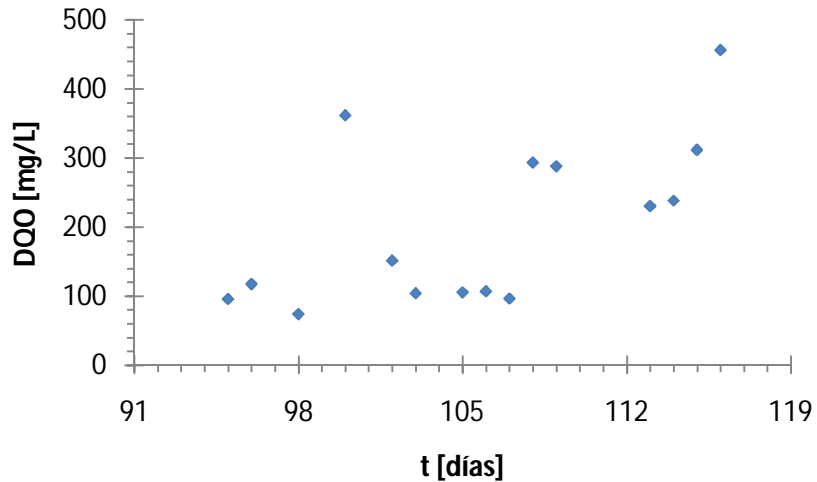


Gráfico 4.13 Concentración de DQO del reactor por lotes durante el primer periodo.

Se puede observar que prácticamente en 20 h de operación del reactor en batch, los microorganismos fueron capaces de degradar casi completamente el fenol, sin embargo, el degradar casi todo el fenol, no implica que se disminuya toda la DQO o el COD.

En los gráficos 4.13 y 4.14 se puede observar que los valores de DQO son mucho mayores que los de COD, esto es porque la prueba de DQO, nos da una idea del contenido orgánico total de un residuo, sea o no biodegradable, en esta técnica se emplea un agente químico fuertemente oxidante (dicromato de potasio) en medio ácido, por lo tanto, la DQO, medirá tanto la materia orgánica biodegradable por los microorganismos, como la materia orgánica no biodegradable y la materia inorgánica, oxidable por ese agente químico. Aunque este método pretende medir principalmente la concentración de materia orgánica, sufre interferencias por la presencia de sustancias inorgánicas susceptibles de ser oxidadas (sulfuros, sulfitos, yoduros, cloruros, etc.), que también se reflejan en la medida.

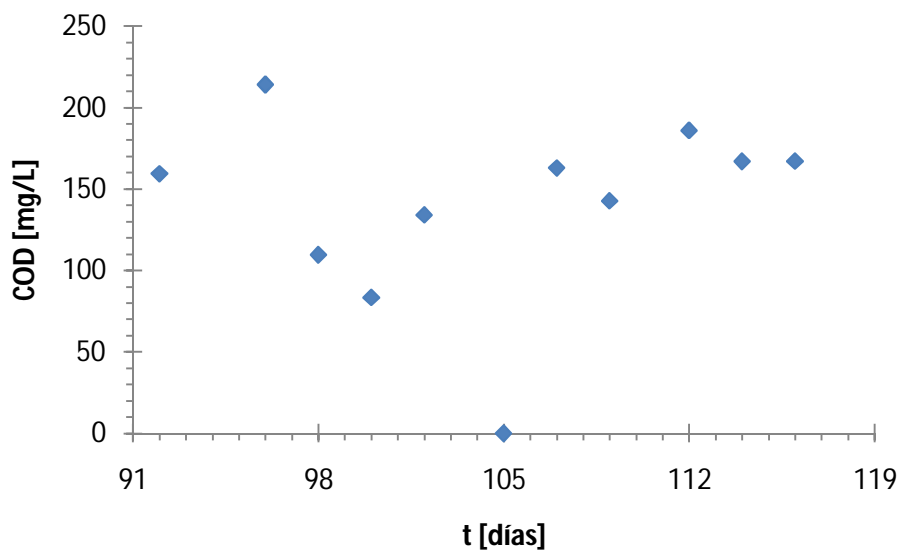


Gráfico 4.14 Concentración de COD del reactor por lotes durante el primer periodo.

El COD es una medida directa del carbono orgánico en las aguas, se mide por la cantidad de dióxido de carbono que se genera al oxidar la materia orgánica en condiciones especiales, el COD no mide el carbono inorgánico que pueden ser carbonatos, bicarbonatos, y dióxido de carbono disuelto ya que esta cantidad correspondiente al carbono inorgánico, al acidificar la muestra se elimina y se sustrae previamente del resultado total.

La turbidez fue en aumento en este periodo de tiempo, tabla 4.9 muestra los resultados obtenidos al medir la turbidez.

Tabla 4.9 Turbidez en el reactor en batch del periodo de julio a noviembre 2009.

t [días]	Turbidez [NTU]	t [días]	Turbidez [NTU]	t [días]	Turbidez [NTU]
0	298	31	347	44	624
7	277	33	742	45	552
12	297	36	609	46	881
17	290	37	417	47	720
22	300	39	432	51	845
28	323	40	380	54	971

- **Segundo periodo febrero a abril del 2010**

Durante el segundo periodo, con la misma concentración inicial de fenol, el reactor por lotes siguió degradando casi todo el fenol, los días en los que no se obtuvo una degradación se agregaban nutrientes y nuevamente el reactor empezaba a degradar, los resultados obtenidos de fenoles totales, COD, DQO y los SST y SSV se muestran en el gráfico 4.15, 4.16, 4.17 y 4.18.

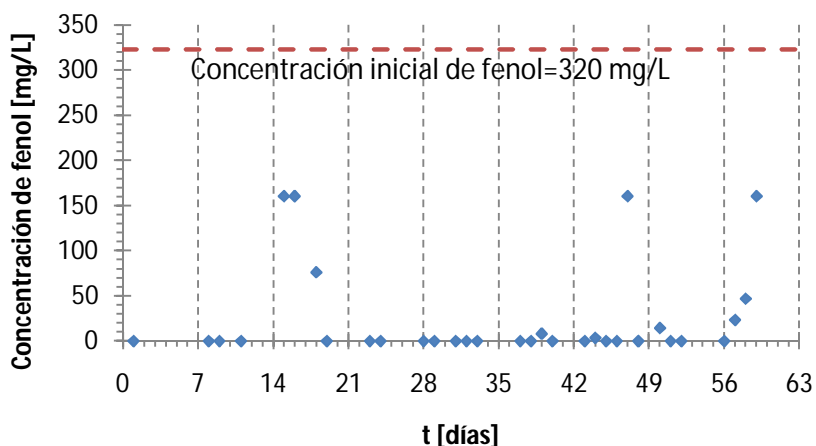


Gráfico 4.15 Seguimiento puntual del consumo de fenol en un periodo de 2 meses.

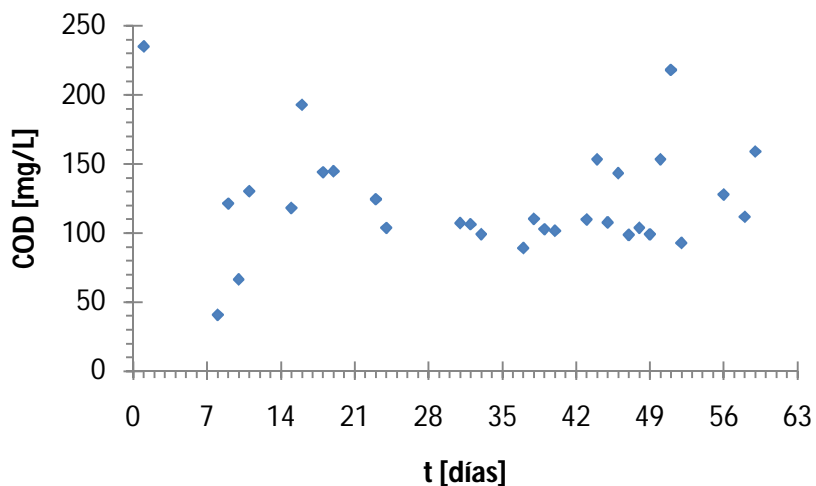


Gráfico 4.16 Concentración de COD del reactor por lotes durante el segundo periodo.

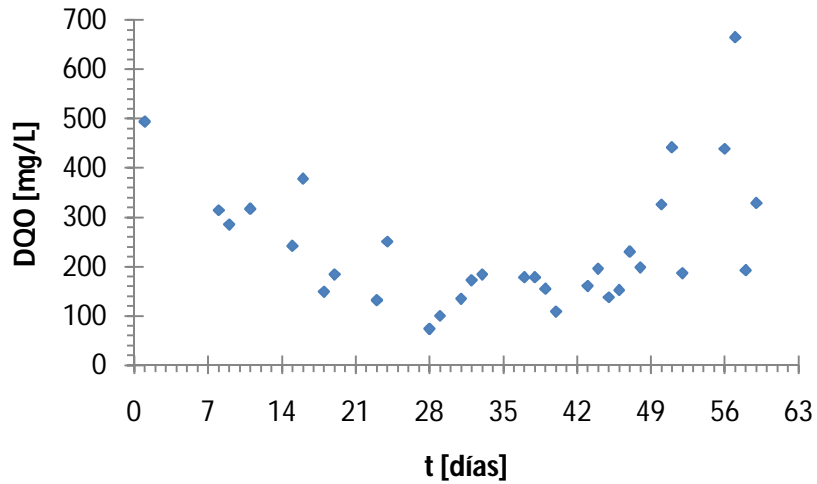


Gráfico 4.17 Concentración de DQO del reactor por lotes durante el segundo periodo.

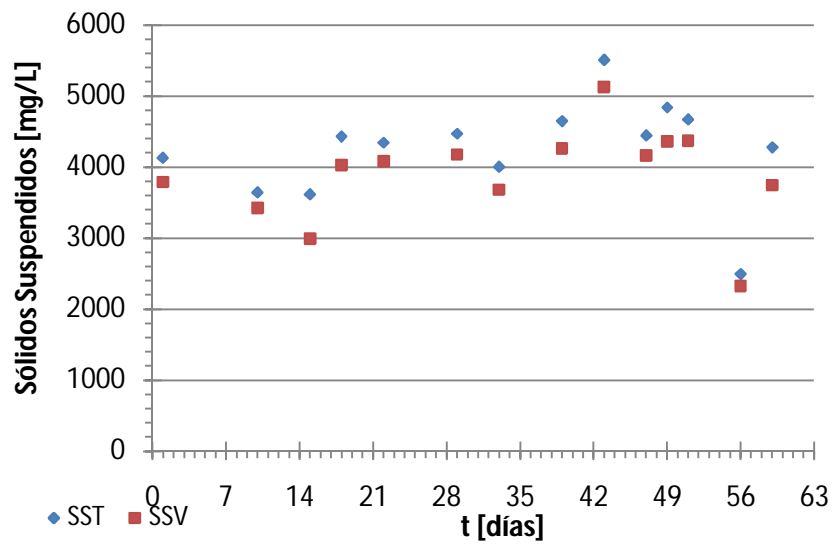


Gráfico 4.18 SST y SSV del reactor por lotes durante el segundo periodo.

A lo largo de este periodo experimental, el reactor por lotes degradó casi totalmente el fenol, y la cantidad de sólidos osciló entre 3000 y 5500 mgSST/L.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

- **Elección de soporte**

Se determinó que el soporte que presentó una mejor adherencia de microorganismos fue el paño de cocino fabricado de rayón-poliestireno debido a que la inoculación de este soporte fue en un corto tiempo y se notaba a simple vista los lodos en el soporte.

- **Pruebas en el reactor biológico de Lecho fijo**

El reactor biológico de lecho fijo soportó dos cargas orgánicas de 9 y 21 gDQO/m³h teniendo remociones de COD de hasta 60% para las dos cargas orgánicas y de DQO mayores a un 70% para el primer flujo y al aumentar la carga orgánica, mayores a un 40%.

Se determinó que a un tiempo de retención hidráulico de 23 h, variando concentraciones desde 100 mg/L a 500 mg/L de fenol, se obtuvieron remociones de este contaminante mayores a un 94%. La remoción de COD y DQO es favorecida a concentraciones mayores de 300 mg/L de fenol siendo estas superiores a un 76% de DQO y un 80% de COD.

La cantidad de SST y SSV desprendidos en el reactor, aumentan al incrementar la concentración de fenol, debido a que la biopelícula se encuentra en constante renovación. La cantidad de biomasa medida como SSV en el reactor al finalizar la experimentación fue de 2694 mg/L, comparado con el reactor por lotes esta cantidad de biomasa es menor, esto es benéfico ya que la cantidad de lodos a tratar y estabilizar será menor que en un reactor convencional de lodos activados.

Las mejores condiciones de operación de operación del reactor biológico de lecho fijo fueron:

- Flujo de aire: 0.99 mL/min.
- Concentración de fenol: 500 mg/L.
- Cantidad de nutrientes: 0.1 (mínima).

- **Cinética de la degradación del fenol.**

La degradación del fenol para 100 mg/L se llevó a cabo en 2 horas, para 300 mg/L tardó 5 horas mientras que para 500 mg/L se alcanzó en 11 horas.

El coeficiente de crecimiento celular es de 0.6821 mg de SSV por cada gramo de fenol consumido.

Se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos, k_s y μ_{Max} y la diferencia de éstos es que a concentraciones de 300 mg/L y 500 mg/L se sufre una inhibición mixta, alterando los valores de la rapidez específica de crecimiento y el valor de la constante comparada con los valores obtenidos para 100 mg/L.

Se obtuvieron disminuciones de DQO para 500 mg/L de un 40%, de 75% para 300 mg/L y de 50% para 100 mg/L. La disminución del COD fue de 75% para 500 mg/L, 60% para 300 mg/L y 40% para 100 mg/L en 2 horas.

Para 300 mg/L y 500 mg/L de fenol, se encontró al realizar el método Mkandawire et. al. (2009) que existe la formación de un intermediario de la reacción de degradación del fenol, que absorbe a 254nm el cual no fue posible identificar debido a que no es objetivo de este trabajo.

- **Mantenimiento del reactor por lotes**

El reactor por lotes, logró remover hasta 320 mg/L de fenol, este reactor requiere de nutrientes aproximadamente cada 15 días para obtener altas remociones de fenol, la cantidad de biomasa en este reactor osciló entre 3000 y 5500 mg SSV/L.

6. ANEXOS

6.1. Cálculos realizados

- Tiempo de retención hidráulico

Θ_{RH} : es el tiempo que tarda el agua a tratar dentro del reactor biológico y durante el cual puede ser tratada.

$$\theta_{RH} = \frac{V}{Q}$$

V : Volumen del reactor

Q : Flujo del agua a tratar

Para el primer flujo:

$$Q_1 = 0.64 \frac{mL}{min} = 0.0384 \frac{L}{h}$$

$$\theta_{RH} = \frac{0.9L}{0.0384 \frac{L}{h}} = 23.4h$$

Para el segundo flujo:

$$Q_2 = 1.51 \frac{mL}{min} = 0.0906 \frac{L}{h}$$

$$\theta_{RH} = \frac{0.9L}{0.0906 \frac{L}{h}} = 9.9h$$

-
-
- Carga orgánica volumétrica

C.O.V.: Es la cantidad de sustrato proporcionado a los microorganismos por hora por metro cúbico de tanque de aireación.

$$C.O.V. = \frac{QS_0}{V}$$

Q : Flujo de agua a tratar

S_0 : Concentración de sustrato

V : Volumen del reactor

Para el primer flujo:

$$C.O.V. = \frac{QS_0}{V} = \frac{\left(0.0384 \frac{L}{h}\right) \left(212.18 \frac{mgDQO}{L}\right)}{0.9L \left(\frac{1m^3}{1000L}\right)} = 9.05 \frac{gDQO}{m^3h}$$

Para el segundo flujo:

$$C.O.V. = \frac{QS_0}{V} = \frac{\left(0.0906 \frac{L}{h}\right) \left(212.18 \frac{mgDQO}{L}\right)}{0.9L \left(\frac{1m^3}{1000L}\right)} = 21.35 \frac{gDQO}{m^3h}$$

- Cantidad de oxígeno en la corriente de aire.

$$\rho_{23^{\circ}C} = 1.2462 \frac{kg}{m^3}$$

$$P.M._{AIRE} = y_{N_2} P.M._{N_2} + y_{O_2} P.M._{O_2} + y_{Ar} P.M._{Ar}$$

$$P.M._{AIRE} = (0.2094)(31.9988) + (0.7808)(28.0134) + (0.0093)(39.948)$$

$$P.M._{AIRE} = 28.94 \frac{g}{mol}$$

$$\text{Flujo máximo de aire} : 0.9992 \frac{L_{Aire}}{\text{min}}$$

$$0.9992 \frac{L}{\text{min}} \left(\frac{1m^3}{1000L} \right) \left(\frac{1.2462kg}{m^3} \right) \left(\frac{1000g}{1kg} \right) \left(\frac{1mol_{Aire}}{28.945g} \right) \left(\frac{0.2094molO_2}{1mol_{Aire}} \right) \left(\frac{1000mmol}{1mol} \right)$$

$$\text{Flujo máximo de oxígeno} = 9.008 \frac{mmolO_2}{\text{min}}$$

$$\text{Flujo medio de oxígeno} = 7.104 \frac{mmolO_2}{\text{min}}$$

$$\text{Flujo mínimo de oxígeno} = 5.201 \frac{mmolO_2}{\text{min}}$$

- Resultados obtenidos de DQO en el RBLF a diferentes flujos

Flujo	tiempo [días]	DQO _{Influyente} [mg/L]	DQO _{Efluente} [mg/L]
1	1	217	0.01
	3	198	0.01
	6	223	29.22
	10	202	25.27
	11	223	59.48
	12	191	12.12
	15	202	117.38
2	17	222	54.22
	19	267	98.96
	20	222	30.54
	22	281	151.59
	23	211	125.27
	24	291	114.75
	25	223	0.01
	26	225	106.85

$$\% \text{Disminución} = \frac{(DQO_{\text{Influyente}} - DQO_{\text{Efluente}})}{DQO_{\text{Influyente}}} \times 100$$

6.2. Técnica de determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método directo espectrofotométrico. NMX-AA-050-SCFI-2001

Este método cubre intervalos de concentración de 0.001 mg/L a 0.5 mg/L.

➤ Reactivos

- **Disolución patrón de fenol (1g/L):** Se preparan 500 mL de la disolución patrón de fenol. Pesar con precisión 0.5 g de fenol y disolver en 500 mL de agua.
- **Disolución de 4-aminoantipirina (2% P/V):** Pesar aproximadamente y con precisión 2.0 g de 4-aminoantipirina y disolver en 100 mL de agua.
- **Disolución de ferrocianuro de potasio (8 % P/V):** Pesar aproximadamente y con precisión 8.0 g de ferrocianuro de potasio y disolver en 100 mL de agua. Filtrar si es necesario. Almacenar en un frasco de vidrio ámbar.
- **Disolución de amoníaco 0,5 N:** Diluir 35 mL de amoníaco concentrado en 1 L de agua.

Para las muestras con concentraciones de fenoles mayores a 5 mg/L, se debe tomar una alícuota adecuada que no contenga más de 0.5 mg de fenol y diluir a 100 mL.

➤ Procedimiento

Preparación de los estándares de fenol:

- Matraz 1 (0 mg/L de fenol, blanco): Adiciona 100mL de agua únicamente.
- Matraz 2 (1 mg/L de fenol): Tomar 100 μ L de la solución patrón de fenol (1 g/L) y aforar en un matraz de 100 mL.
- Matraz 3 (2 mg/L de fenol): Tomar 200 μ L de la solución patrón de fenol (1 g/L) y aforar en un matraz de 100 mL.

- Matraz 4 (3 mg/L de fenol): Tomar 300 μ L de la solución patrón de fenol (1 g/L) y aforar en un matraz de 100 mL.
- Matraz 5 (4 mg/L de fenol): Tomar 400 μ L de la solución patrón de fenol (1 g/L) y aforar en un matraz de 100 mL.
- Matraz 6 (5 mg/L de fenol): Tomar 500 μ L de la solución patrón de fenol (1 g/L) y aforar en un matraz de 100 mL.

Tratar las muestras, blanco de reactivos y estándares como sigue: Añadir 2.5 mL de la disolución de amoníaco 0.5 N. Adicionar 1 mL de la disolución de 4-aminoantipirina, mezclar bien y añadir 1.0 mL de la disolución de ferricianuro de potasio y mezclar. Después de 15 min. Transferir a la celda y leer la absorbancia de las muestras estándares y blanco a 510 nm, y realizar la curva de calibración.

Hacer una curva con los valores de calibración y calcular la concentración de la muestra por medio de la ecuación obtenida de la curva de calibración y que es representada por la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = 0.12304\text{Concentración} + 0.31689$$

La curva de calibración utilizada durante este trabajo de tesis se representa en la figura 6.1.

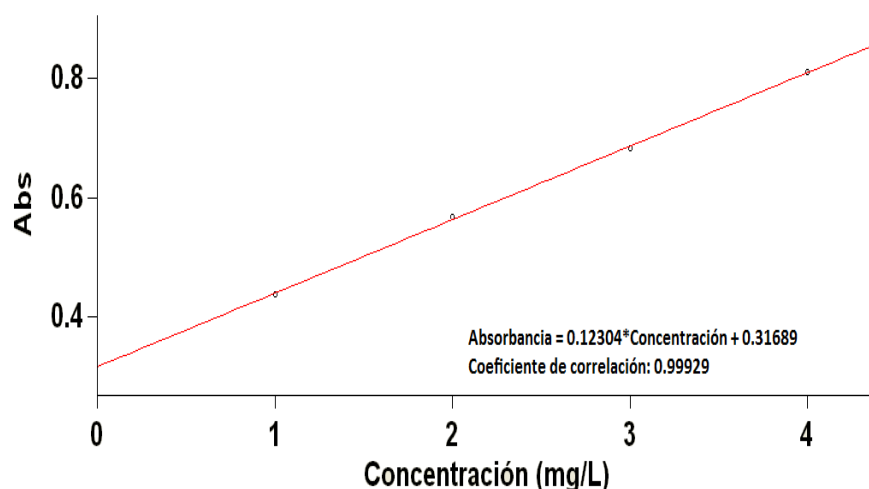


Figura 6. 1 Curva de calibración para la determinación de fenoles totales.

6.3. Técnica de determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método a reflujo cerrado/ método espectrofotométrico. NMX-AA-030-SCFI-2001.

➤ Reactivos

- **Disolución de sulfato de plata en ácido sulfúrico:** Pesar aproximadamente y con precisión 15 g de sulfato de plata y disolver en 1 L de ácido sulfúrico concentrado. El sulfato de plata requiere un tiempo aproximado de dos días para su completa disolución. La disolución formada debe mantenerse en la oscuridad para evitar su descomposición.
- **Disolución de digestión A (alta concentración):** Pesar aproximadamente y con precisión 10.216 g de dicromato de potasio, previamente secado a 103 °C por 2 h, y añadirlos a 500 mL de agua, adicionar 167 mL de ácido sulfúrico concentrado y aproximadamente 33.3 g de sulfato mercurico. Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1 L con agua.
- **Disolución de digestión B (baja concentración):** Pesar aproximadamente y con precisión 1.0216 g de dicromato de potasio, previamente secado a 103 °C por 2 h, y añadirlos a 500 mL de agua, adicionar 167 mL de ácido sulfúrico concentrado y aproximadamente 33.3 g de sulfato mercurico. Disolver y enfriar a temperatura ambiente. Aforar a 1 L con agua.
- **Disolución estándar de biftalato de potasio:** (1 mL=1 mg de DQO). Deshacer los grumos y secar el biftalato de potasio a 120 °C. Pesar aproximadamente y con precisión 0.851 g de biftalato de potasio, disolver y enfriar a temperatura ambiente y aforar a 1 L.

Esta solución es estable hasta por 3 meses cuando se mantiene en refrigeración y si no se observa crecimiento biológico.

➤ Procedimiento

Preparación de los estándares de biftalato de potasio.

Preparar por lo menos cinco disoluciones de biftalato de potasio con DQO equivalentes de 20 mg O₂/L a 900 mg O₂/L, ajustar el volumen con agua destilada. Utilizar los mismos volúmenes de reactivo y procedimiento de digestión que para las muestras. Tratar las muestras y estándares como sigue:

- Precalentar a 150 °C el digestor de DQO, o la estufa donde se llevara a cabo la digestión.
- Colocar en los tubos de reacción 1.5 mL de la disolución de digestión A o B, según sea para una alta concentración o baja concentración
- Tomar cuidadosamente 2.5 mL de muestra previamente homogeneizada dentro de los tubos de reacción. Cerrar inmediatamente para evitar que se escapen los vapores, asegurarse de que están herméticamente cerrados.
- Suavemente invertir los tubos varias veces destapando después de cada inversión para liberar la presión, o agitar los tubos destapados en un vortex. La disolución es fuertemente ácida y el tubo se calienta en este proceso, trabajar con guantes aislantes.
- Añadir cuidadosamente 3.5 mL de la disolución de digestión respectiva.
- Colocar 2.5 mL de agua en un tubo para la determinación del blanco de reactivos.
- Colocar todos los tubos en el digestor previamente calentado a 150 °C y poner a reflujo por 2 h.
- Retirar los tubos del digestor y dejar que los tubos se enfríen a temperatura ambiente, permitiendo que cualquier precipitado se sedimente.
- Medir la absorbancia en el espectrofotómetro, previamente calibrado.

-
-
- Para aguas que contengan una DQO baja (5 mg/L a 75 mg/L), utilizar la disolución de digestión B. Si el valor de la DQO determinado es más alto que 75 mg/L después de usar estos reactivos, reanalizar la muestra, utilizando la disolución A.
 - Debido a que las muestras antes de ser analizadas fueron filtradas y posteriormente tratadas con base a este método, los valores de DQO corresponden a una DQO soluble.

La curva de calibración utilizada durante este trabajo de tesis se representa en el gráfico 6.1.

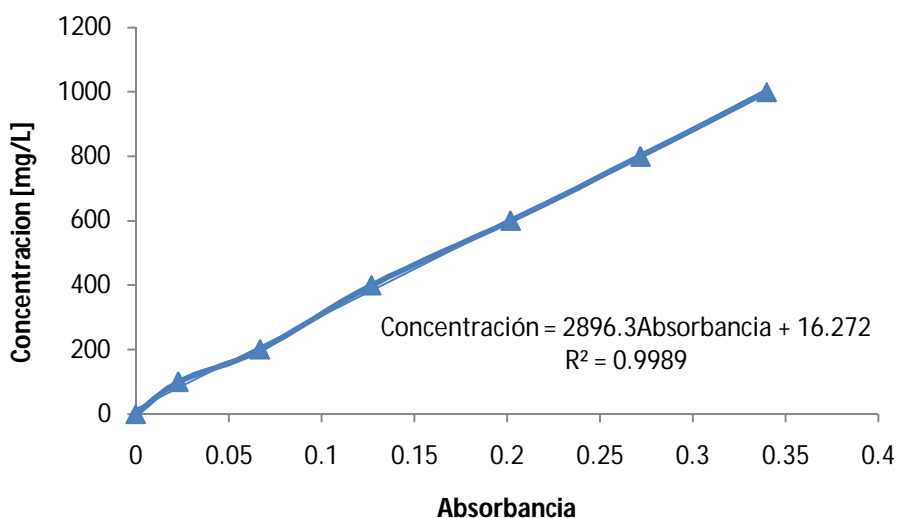


Gráfico 6.1 Curva de calibración de DQO para la segunda parte experimental.

6.4. Técnica para la determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales. NMX-AA-034-SCFI-2001.

➤ Material:

- Filtros de 5 micras.
- 1 Matraz kitasato.
- 1 Equipo de filtración Buchner.
- 1 Pipeta volumétrica de 25 mL.

➤ Procedimiento

- Precalear en una estufa a 105 °C filtros de 5micras durante 1 h y colocar en un desecador de silica una hora hasta que se encuentren a peso constante.
- Pesar los filtros y registrar el valor (P_{F1}).
- Filtrar con el equipo de filtración Buchner un volumen de 10ml de la muestra a analizar y colocar el filtro durante una hora en una estufa a 105 °C.
- Colocar los filtros en un desecador por una hora hasta alcanzar peso constante, posteriormente pesar y registrar los valores (P_{F2}).
- Colocar los filtros en una mufla a 550 °C por 15 minutos.
- Colocar en un desecador por una hora hasta peso constante y después pesar y registrar los valores (P_{F3}).

➤ Cálculos:

$$SST = \frac{P_{F2} - P_{F1}}{V_{Muestra}} \quad SSV = \frac{P_{F2} - P_{F3}}{V_{Muestra}}$$

6.5. Técnica para la determinación de carbono orgánico disuelto

Todos los productos químicos usados en este método deben ser grado reactivo.

➤ Reactivos

- **Agua destilada** con las siguientes propiedades:

a) resistividad: megohm-cm a 25 °C: 0.2 min.

b) conductividad: $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25 °C: 5.0 máx.

c) pH de 5.0 a 8.0.

- **Biftalato de Potasio.**

➤ Equipo

- SHIMADZU modelo TOCV-CSH

➤ Material

- Viales especiales para el equipo de carbono orgánico total

La muestra se debe analizar inmediatamente después de su toma, en caso contrario debe conservarse en refrigeración a 4 °C. El tiempo máximo de almacenamiento previo al análisis es de 28 días.

7. REFERENCIAS

- AHUMADA, M. P., GÓMEZ, R.K., 2009. Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F., 1986. Biochemical engineering fundamentals. Ed.Mc Graw-Hill Interamericana.
- BAJAJ, C., GALLERT, C., WINTER, J., 2008. Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. *Bioresource Technology*. 99, 8376-8381.
- BENTHACK, C., SRINIVASAN, B., BONVIN, D., 2000. An optimal operating strategy for fixed-bed bioreactors used in wastewater treatment. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 72(1), pp. 34-39.
- CASEY, E., GLENNON, B., HAMER, G., 1999. Oxygen Mass Transfer Characteristics in a membrane-Aerated Biofilm Reactor. *Biotechnology & Bioengineering* 62 (2), 183-192.
- CHARACKLIS, W. G., MARSHALL, K.C., 1990. Biofilms; Ed. Wiley-interscience publication John Wiley and sons.
- ESTRADA E., 2006. Remoción de compuestos aromáticos mediante un sistema combinado anaerobio/aerobio de lecho fluidizado. Tesis de maestría, Facultad de Ingeniería, UNAM.
- GARCÍA, G. S. A., 2008. Oxidación química de aminas gastadas provenientes de procesos de endulzamiento de gas en refinerías. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.
- GONZÁLEZ, B. M., LÓPEZ, F. I., 2008. Comportamiento de un reactor de biopelícula para tratamiento de agua residual a diferentes velocidades de flujo. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol.7 Núm.3, pp.183-193.

-
-
- JÍMENEZ, CISNEROS B.E., 2001. La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología aplicada. Limusa, Noriega Editores. Cap. 2.
 - KABALLO H.P., 1997. Shock loading management with the sequencing batch biofilm reactor technology, *Water Sci. Technol.* 35(1), pp 35-40.
 - KWON, K. H., YEOM S. H., 2009. Optimal microbial adaptation routes for the rapid degradation of high concentration of phenol. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 32, 435-442.
 - LAZCANO, L., 2010. Estudio de la oxidación química y de la biodegradabilidad en la depuración del efluente acuoso final de una refinería: Eliminación de fenoles e hidrocarburos. Tesis doctoral, Facultad de Química, UNAM.
 - LEAHY, J. G. & COLWELL, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology, Rev.* 54, 305-315.
 - LEHNINGER, A. L., NELSON, D.L., COX, M.M., 2005. *Lehninger principles of biochemistry.* W.H. Freeman.
 - LIN, Y., HSIEN, T., 2009. Kinetics of biodegradation of phenolic wastewater in a biofilm reactor. *Water Science and Technology*, Vol. 59(9), pp. 1703-1709.
 - MARROT, B., MOULIN, P., BARRIOS, A., ROCHES, N., 2008. Biodegradation of high phenol concentration in a membrane bioreactor. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, Vol. 6, A8.
 - METCALF & EDDY, 2003. *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse.* 4ta edición. Mc. Graw Hill.
 - MKANDAWIRE, M., FÖRSTER, J., FIEDLER, D., BÖTCHER, H., POMPE, W., 2009. Spectrophotometric verification of biodegradation of phenol in a flow dynamics biocers-based bioreactor system. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry.* 89:7, 529-541.

-
-
- PAN LI, MASAYOSHI, T., KANEO C., 2009. Degradation of phenol by the collapse of microbubbles, *Chemosphere*, Vol.75, pp. 1371-1375.
 - PÁRES, F., R., JUAREZ, G., A., 1997. *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverte, Cap. 17, pp. 230.
 - RAZO E. D. I., 2003. *Bioremediación de suelos contaminados con fenol*. Tesis de licenciatura, Escuela de Ciencias, Universidad de Puebla.
 - RIGO, M., ALLEGRE, R. M., 2003. Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from industrial wastewaters and kinetics of biodegradation. *Folia Microbiol.*, Vol.49(1), pp.41-45.
 - SCRAGG A., 2004. *Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. México: Editorial Limusa SA. De CV.
 - SERNA, I., TORRES, J., HOYOS, B., 2003. Recuperación de fenol de aguas residuales industriales por tratamiento con NaCl. *Dyna*, Vol. 70(139), pp. 25-34.
 - SERRA, F.B., 2002. *Desarrollo de electrodos compósitos enzimáticos para la detección y determinación de compuestos fenólicos*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, España.
 - SUAREZ, R.M., 2003. *Degradación de los ácidos 3- y 4- hidroxibenzoico en klebsiella pneumoniae: Purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias biológicas, Universidad Complutense de Madrid, España.
 - TAY, J., JIANG, H., TAY S., 2004. High-rate biodegradation of phenol by aerobically grown microbial granules. *Journal of Environmental Engineering*, Vol.130 pp. 1415-1422.
 - TORRES, Ch. I., 2009. *Depuración de aguas desfleamadas mediante un reactor biológico aerobio de lecho fluidizado*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

-
-
- VOET D. y Voet J. G., 2006. Bioquímica. 3a.ed. Médica Panamericana. México. pp. 1776.
 - WINKLER, M.A.,1986. Tratamiento biológico de aguas de desecho, Universidad de Survey, Limusa,
 - YANG, R. D., HUMPHREY, A. E., 1974. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. Biotechnology and bioengineering, Vol.17, pp.1211-1235.