



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**LIOFILIZACIÓN Y REACTIVACIÓN POR
BIOAUMENTACIÓN DE UN CONSORCIO
BACTERIANO NITRIFICANTE Y
DEGRADADOR DE COMPUESTOS
FENÓLICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

ISELA ZACARÍAS CABELLO

CIUDAD DE MÉXICO 2017





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: Dr. Alfonso Durán Moreno
VOCAL: Dra. Luz María Lazcano Arriola
SECRETARIO: Cand. Dr. Sergio Adrián García González
1er. SUPLENTE: Cand. Dra. Alejandra Mendoza Campos
2º SUPLENTE: Dra. Claudia Inés Rivera Cárdenas

Lugar donde se realizó la tesis

Unidad de Proyectos y de Investigación en Ingeniería Ambiental (UPIIA).

Laboratorio 301 y 303, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM,
Ciudad de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Alfonso Durán Moreno

SUSTENTANTE

Isela Zacarías Cabello

Tabla de unidades

d	días
g	gramos
h	horas
L	Litros
mg/L	miligramos sobre Litro
V	volumen

Tabla de abreviaturas

COT	Carbono orgánico total
Consortio PO	Consortio preservado original
Consortio PR	Consortio preservado reactivado
Consortio Planta de tratamiento de aguas residuales Cerro de Estrella	Consortio PTAR CE
E	Efluente
FT	Fenoles totales
I	Inhibidor
In	Influente
NMX	Norma Mexicana
N-NH ₄ ⁺	Nitrógeno amoniacal
N-NO ₂ ⁻	Nitrógeno de nitritos
N-NO ₃ ⁻	Nitrógeno de nitratos
PEMEX	Petróleos Mexicanos
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RBM	Reactor Biológico de Membrana
RBM DCE	Reactor Biológico de Membrana Donador del Consortio a estudiar.
RL	Reactor por Lote
S	Sustrato
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos volátiles
TRH	Tiempo de residencia hidráulica
UV-VIS	Ultravioleta-Visible

ÍNDICE GENERAL

Tabla de unidades	
Tabla de abreviaturas	
RESUMEN	
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 2. PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN	2
2.1 Problemática	2
2.2 Justificación	2
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS E HIPÒTESIS.....	3
3.1 Objetivos.....	3
3.1.1 Objetivo general:.....	3
3.1.2 Objetivos específicos:	3
3.2 Hipòtesis:	4
CAPÍTULO 4. MARCO TEÓRICO	4
4.1 Industria petroquímica: Contaminación por nitrógeno amoniacal y compuestos fenólicos.....	4
4.2 Nitrógeno amoniacal.....	7
4.2.1 Problemas ambientales debido a la presencia de nitrógeno amoniacal en aguas residuales.	7
4.2.2 Eliminación del nitrógeno amoniacal contenido en aguas residuales.....	7
4.2.3 Técnicas fisicoquímicas para la eliminación del nitrógeno amoniacal en aguas residuales.	8
4.2.3.1 Arrastre de amoniaco (Stripping).	8
4.2.3.2 Resinas de intercambio iónico.	8

4.2.4 Técnicas biológicas para la eliminación del nitrógeno amoniacal en aguas residuales.	9
4.2.5 Ciclo del nitrógeno.....	9
4.2.6 Proceso de nitrificación	10
4.2.7 Bacterias nitrificantes.....	11
4.2.8 Inhibición de la nitrificación.....	13
4.3.1 Problemas ambientales debido a la presencia de compuestos fenólicos en aguas residuales.	13
4.3.2 Eliminación de compuestos fenólicos contenidos en aguas residuales	13
4.3.3 Degradación biológica del fenol	13
4.3.3.1 Degradación biológica del fenol aerobia:	15
4.3.3.1.1 Ruta orto.	16
4.3.3.1.2 Ruta meta	17
4.4 Reactor biológico de membrana	19
4.4.1 Funcionamiento del reactor biológico de membrana.....	19
4.5 Preservación de cepas microbianas.....	20
4.5.1 Técnicas de preservación de microorganismos.....	20
4.5.1.1 Método de elección o de conservación a largo plazo	20
4.5.1.2 Métodos de conservación alternativos	21
4.5.1.3 Métodos de conservación restringidos:.....	21
4.6 Liofilización: Método de preservación a largo plazo	22
4.6.1 Proceso de liofilización.....	22
4.6.1.1 Etapas de la liofilización:.....	23
4.6.1.1.1 Congelación	23
4.6.1.1.2 Secado por sublimación del hielo	24

Primera etapa de secado.....	24
Segunda etapa de secado.....	25
4) 4.6.1.1.3 Almacenamiento del producto en condiciones controladas	25
5) 4.6.2 Equipo de liofilización.	26
4.6.2.1 Cámara seca o cámara de liofilización:	26
4.6.2.2 Condensador con circuito de refrigeración:.....	26
4.6.2.3 Sistema de vacío	27
4.7 Bioaugmentación	27
4.8 Cinéticas de reacción:	28
4.8.1 Velocidad de reacción (v)	28
4.8.2 Ley de velocidad.....	28
4.8.3 Ecuación de velocidad de reacción.....	28
4.8.4 Constante de velocidad de reacción.....	29
4.8.5 Orden de la reacción	29
4.9 Crecimiento microbiano.....	30
4.9.1 Fase latencia o de adaptación (lag).....	31
4.9.2 Fase exponencial o logarítmica:.....	31
4.9.3 Fase estacionaria:.....	32
4.9.4 Fase muerte	33
4.10 Ecuación de Monod.	33
CAPÍTULO 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	37
5.1 ETAPA I: Preservación por liofilización del consorcio nitrificante y degradador de compuestos fenólicos.....	37

5.2 ETAPA II: Reactivación por bioaumentación del consorcio nitrificante y degradador de compuestos fenólicos en dos tipos de reactores RBM en continuo y un sistema por lote.	40
5.2.1 Construcción de los reactores biológicos.....	40
De membrana	40
Por lote	40
La tabla 6 muestra un diseño de experimentos para la etapa II, sobre el monitoreo analítico de los dos tipos de reactores.....	40
5.4 ETAPA III. Cinéticas de degradación del consorcio reactivado, funcional nitrificante y degradador de compuestos fenólicos proveniente del RBM en continuo. Cinéticas de bioaumentación de los tres consorcios PTAR CE, preservado original, preservado reactivado	48
5.4.1 Cinéticas de degradación para el consorcio reactivado, nitrificante y degradador de compuestos fenólicos.....	48
5.4.2Cinéticas de bioaumentación	49
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
ETAPA I: Preservación por liofilización del consorcio nitrificante y degradador de compuestos fenólicos.....	53
5.2 ETAPA II: Reactivación por bioaumentación del consorcio nitrificante y degradador de compuestos fenólicos en dos tipos de reactores RBM en continuo y un sistema por lote.	54
5.2.1 Reactor biológico de membrana (RBM) en continuo	54
5.2.2 Reactor por lote.....	61
5.3 ETAPA III. Cinéticas de degradación del consorcio reactivado, funcional nitrificante y degradador de compuestos fenólicos proveniente del RBM en continuo. Cinéticas de bioaumentación de los tres consorcios PTAR CE, preservado original, preservado reactivado.....	67

5.3.1 Cinéticas de degradación para el consorcio microbiano funcional de RBM en continuo sometido a reactivación	67
5.3.2 Cinéticas de bioaumentación comparación entre los tres consorcios.....	71
5.3.2.1 Constantes de velocidad para la degradación de fenoles totales y nitrógeno amoniacal.....	83
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....	85
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA.....	87
CAPÍTULO 9. ANEXOS.....	93
Anexo 9.1.....	93
Anexo 9.2 Método Potenciométrico usado para las determinaciones de potencial de hidrógeno. NMX-AA-008-SCFI-2001.....	94
Anexo 9.3 Técnica espectrofotométrica usada para las determinaciones de fenoles totales. NMX-AA-050-SCFI-2001.....	94
Anexo 9.4 Técnica espectrofotométrica usada para las determinaciones de nitratos. NMX-AA-082-1986.....	95
Anexo 9.5 Técnica espectrofotométrica usada para las determinaciones de nitritos. NMX-AA-154-SCFI-2011.....	95
Anexo 9.6 Método titulométrico para las determinaciones de nitrógeno amoniacal NMX-AA-026-SCFI-2010.....	96
Anexo 9.7 Técnica gravimétrica (peso seco) usada para las determinaciones de sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV) NMX-AA-034-SCFI-2001.....	97
Anexo 9.8 Cinéticas de degradación.....	98
Anexo 9.9 Cinéticas de bioaumentación experimentos 1 y 2.....	99
9.10 Análisis estadístico.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Determinación de compuestos fenólicos en agua de lagunas de estabilización....	15
Tabla 2. Parámetros para cinética de primer orden	29
Tabla 3. Parámetros de la ecuación de Monod.....	36
Tabla 4. Condiciones físicas para la operación del reactor biológico de membrana donador del consorcio funcional.....	38
Tabla 5. Características de la membrana utilizada en el reactor biológico donador del consorcio para reactivación.	38
Tabla 6. Diseño de experimentos que comprende la etapa II.....	41
Tabla 7. Técnicas analíticas.....	42
Tabla 8. Condiciones físicas para la operación del reactor biológico de membrana (RBM), durante la reactivación del consorcio microbiano funcional.	45
Tabla 9. Condiciones físicas para la operación del reactor biológico por lote, durante la reactivación del consorcio microbiano funcional.	46
Tabla 10. Etapas de duración del proceso por lote	46
Tabla 11. Composición de la disolución sintética con los nutrientes y el sustrato principal de amonio	52
Tabla 12. Velocidades específicas μ , para los consorcios bacterianos.....	75
Tabla 13. Porcentaje de eficiencia de fenoles totales y N-NH_4^+ en los tres consorcios.....	81
Tabla 14. Parámetros cinéticos μ_{max} y K_s para SSV, en la degradación de la mezcla de fenoles totales y nitrógeno amoniacal.	81
Tabla 15. Cinéticas de bioaumentación experimento 1	101
Tabla 16. Cinéticas de bioaumentación experimento 2.....	102
Tabla 17. Prueba de Hipótesis para la concentración (mg/L).....	103
Tabla 18. Prueba de Hipótesis para Concentración (mg/L).....	104

Tabla 19. ANOVA.....	105
Tabla 20. Pruebas de Múltiple Rangos.....	106
Tabla 21. Diferencia significativa	106
Tabla 22. ANOVA.....	107
Tabla 23. Pruebas de Múltiple Rangos.....	108
Tabla 24. Diferencia significativa	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contaminantes en las descargas de aguas residuales.....	6
Figura 2. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.....	10
Figura 3. Proceso de nitrificación inhibido en presencia de compuestos fenólicos.....	11
Figura 4. Características de las bacterias amonio oxidante y nitrito oxidante.....	12
Figura 5. Mezcla de compuestos fenólicos estudiados en este trabajo.....	14
Figura 6. Hidroxilación del fenol a catecol.....	16
Figura 7. Degradación biológica aerobia del fenol, ruta orto.....	17
Figura 8. Degradación biológica aerobia del fenol, ruta meta.....	19
Figura 9. Equipo de liofilización marca LABCONCO.....	26
Figura 10. Gráfica que ilustra la cinética para una reacción de primer orden.....	30
Figura 11. Crecimiento microbiano.....	31
Figura 12. Ecuación de Monod.....	33
Figura 13. Método de linealización de la ecuación de Monod por la ecuación Lineweaver-Burk.....	35
Figura 14. Sólido de biomasa formado durante el proceso de liofilización. I) Sólido después de 18 horas de liofilización; II) Consorcio fraccionado para acelerar el proceso de liofilización; III) Consorcio liofilizado después de 10 días.....	40
Figura 15. Cargas bacterianas para la reactivación del consorcio microbiano funcional en reactor biológico de membrana y por lote.....	44

Figura 16. Reactor biológico de membrana usado en este experimento.....	47
Figura 17. Reactor por lote usado en este experimento.....	47
Figura 18. Experimento cinéticas de degradación.....	49
Figura 19. Experimento cinéticas de bioaumentación.....	52
Figuras 20 y 21 RBM en continuo (a) y sistema por lote (b).....	53
Figura 22 Determinación de pH en RBM.....	55
Figura 23. Determinación de degradación de la mezcla de fenoles totales en RBM.....	56
Figura 24. Determinación del porcentaje de eficiencia promedio de degradación de la mezcla de fenoles en RBM.....	56
Figura 25. Nitrificación en presencia de compuestos fenólicos RBM.....	57
Figura 26. Continuación de nitrificación en presencia de compuestos fenólicos RBM.....	58
Figura 27. Determinación del porcentaje de eficiencia promedio de degradación de la especie N-NH ₄ ⁺ en RBM.....	59
Figura 28. Determinación de carbono orgánico total (COT) en RBM.....	60
Figura 29. Determinación de sólidos suspendidos totales y volátiles en RBM.....	61
Figura 30. Determinación de pH en reactor Lote.....	62
Figura 31. Determinación de degradación de la mezcla de fenoles en reactor Lote.....	63
Figura 32. Determinación del % de Eficiencia de la mezcla de fenoles totales en reactor Lote	64
Figura 33. Nitrificación en presencia de compuestos fenólicos en reactor Lote.....	65
Figura 34. Continuación de nitrificación en presencia de compuestos fenólicos en reactor Lote.....	66
Figura 35. Determinación del porcentaje de eficiencia de degradación de la mezcla de N-NH ₄ ⁺ en reactor Lote.....	66
Figura 36. Determinación de sólidos suspendidos totales y volátiles en reactor Lote.....	67
Figura 37. Determinación de pH en perfil cinético de degradación RBM.....	69
Figura 38. Determinación de degradación de fenoles totales en perfil cinético de degradación RBM.....	69
Figura 39. Perfil cinético de degradación de N-NH ₄ ⁺ en RBM.....	70
Figura 40. Oxidación de N-NH ₄ ⁺ a N-NO ₂ ⁻ a NO ₃ ⁻ en perfil cinético RBM.....	70

Figura 41. Determinación de sólidos suspendidos totales y volátiles en perfil cinético RBM.....	71
Figura 42. Determinación de pH en perfil cinético de bioaumentación.....	73
Figura 43. Determinación de sólidos suspendidos volátiles en perfil cinético de bioaumentación.....	75
Figura 44. Determinación de degradación de fenoles totales en perfil cinético de bioaumentación.....	76
Figura 45. Determinación de la degradación de $N-NH_4^+$ en perfil cinético de bioaumentación.....	77
Figura 46. Nitrificación en presencia de compuestos fenólicos perfil cinético de bioaumentación.....	78
Figura 47. Nitrificación en presencia de compuestos fenólicos, perfil cinético de bioaumentación.....	78
Figura 48. Ecuación de Lineweaver-Burk (SSV) para la mezcla de fenoles totales, en consorcios preservado original y preservado reactivado.....	79
Figura 49. Ecuación de Lineweaver- Burk (SSV), para $N-NH_4^+$ en consorcios preservado original y preservado reactivado.....	80
Figura 50. Cinéticas de degradación Consorcio PTAR CE, PO y PR. Nitrógeno amoniacal.....	83
Figura 51. Cinéticas de degradación Consorcios PTAR CE, PO y PR. Mezcla de fenoles totales.....	84

RESUMEN

En la actualidad la industria petrolera juega un papel muy importante, ya que es la encargada de proveer productos de interés básico para todos los mexicanos. Las aguas residuales provenientes de los procesos de craqueo catalítico e hidrotreatmento, se destacan por presentar una alta cantidad de contaminantes tóxicos (Coelho *et al*, 2006) como (fenoles, nitrógeno amoniacal, grasas y aceites, cianuros, sulfuros e hidrocarburos aromáticos), de no ser tratados provocan gran impacto ambiental.

El presente trabajo, es desarrollado con la finalidad que se lleve a cabo la preservación de un consorcio microbiano funcional nitrificante y degradador de compuestos fenólicos, utilizando la liofilización como método de conservación.

Para monitorear la reactivación del consorcio liofilizado, se inocularon dos biorreactores; uno biológico de membrana y un sistema por lote. Los reactores fueron alimentados con disolución sintética, simulando aguas desfleadas provenientes de la refinación del petróleo.

A cada uno se les determinaron los parámetros analíticos sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), oxidación de nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+), producción de nitritos y nitratos (NO_2^- y NO_3^-), oxidación de fenoles totales (FT), carbono orgánico total (COT) y pH.

El consorcio se reactivó en ambos reactores y se logró la oxidación de una mezcla de fenoles totales (fenol; o-cresol; p-cresol; 3,4-dimetilfenol; 3,5-dimetilfenol) de concentración 60mg/L y 300 mg/L de nitrógeno amoniacal (N-NH_4^+), al final de la operación.

Después de la reactivación se realizaron cinéticas de degradación y cinéticas de bioaumentación en sistemas por lote, para comprobar si con la bioaumentación surgen ventajas, en comparación con el sistema de tratamiento biológico convencional, el experimento se realizó en las mismas condiciones de temperatura, pH y volumen.

Se emplearon tres consorcios microbianos, uno de ellos especializado en el proceso de nitrificación y degradación de compuestos fenólicos a 60mg/L de la mezcla de fenoles totales y 300 mg/L de nitrógeno amoniacal, este se utiliza en su forma liofilizada (polvo), el

segundo consorcio es el resultado de la reactivación del consorcio preservado (pasta) y el último de ellos procedente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Cerro de la Estrella (PTARCE).

Las eficiencias mostradas al finalizar la experimentación son las siguientes: 91%, 91% y 87% respectivamente, para la oxidación de la mezcla de fenoles totales. En el caso de la oxidación del nitrógeno amoniacal los consorcios muestran las siguientes eficiencias: 69%, 69% y 1% respectivamente, en las cinéticas de bioaumentación.



CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Durante la refinación del petróleo se generan aguas residuales amargas, se les da este nombre por el alto contenido de azufre y otros contaminantes.

El agua desflemada se genera después que el agua amarga es alimentada a una torre de desorción, a medida que la torre desciende, el amoníaco y el ácido sulfhídrico, son desorbidos por el vapor que entra en el fondo de la torre, el agua colectada es procesada por un intercambiador de calor para ser enfriada, este efluente es conocido como agua desflemada.

Cabe mencionar que este tipo de aguas posee altas concentraciones de nitrógeno amoniacal $N-NH_4^+$ [211 mg/L], compuestos fenólicos [80 mg/L] y materia orgánica (Nava *et al*, 2013).

Los compuestos fenólicos, son de los contaminantes más frecuentes en este tipo de aguas, se consideran así porque poseen un anillo aromático en su estructura molecular, esto los hace compuestos muy estables y son muy resistentes a la biodegradación (Nava, 2014).

Entre los compuestos aromáticos más presentes en las aguas desflemadas se encuentran el fenol, *o*-cresol, *p*-cresol, *m*-cresol, 2,3-dimetilfenol, 2,4-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol y 3,5-dimetilfenol (Diya`uddeen *et al*. 2011; Al-Khalid y El-Naas, 2012).

Actualmente, las actividades realizadas por la industria petroquímica, ocasionan gran impacto ambiental con la introducción de contaminantes al ambiente, principalmente en ecosistemas acuáticos.

Las innovaciones en el campo del tratamiento para aguas residuales, son una de las estrategias más importantes para la conservación del ambiente (Lozano *et al*, 2006). Existe un gran interés por el desarrollo de nuevas tecnologías para la remoción de contaminantes como nitrógeno amoniacal ($N-NH_4^+$) y compuestos fenólicos en aguas residuales, generadas durante la refinación del petróleo.



Un proceso biológico convencional de remoción de nitrógeno consiste en oxidar amonio a nitrato gracias a un grupo de bacterias nitrificantes, en un proceso de dos pasos, conocido como nitrificación, desafortunadamente éste proceso se ve inhibido en presencia de compuestos fenólicos.

CAPITULO 2. PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Problemática

No existen microorganismos viables para oxidar nitrógeno amoniacal y una mezcla de fenoles (fenol, *o*-cresol, *p*-cresol, 3,4-dimetilfenol y 3,5-dimetilfenol) que hayan sido conservados y reactivados para observar nuevamente su funcionalidad, fuera de su medio de adaptación habitual.

Las bacterias nitrificantes son muy sensibles a condiciones ambientales y de lento crecimiento, por esta razón su posibilidad de ser reactivadas disminuye. Tomando en cuenta estos criterios se plantea la siguiente pregunta.

¿Será posible reactivar microorganismos provenientes de un consorcio funcional, oxidantes de nitrógeno amoniacal y una mezcla de fenoles, luego de haber sido preservados?

2.2 Justificación

Cómo respuesta a la pregunta anterior, surge este trabajo el cual consta de tres etapas, a continuación, mencionadas:

*Etapa I: Preservación

*Etapa II: Reactivación por bioaugmentación del consorcio bacteriano funcional

*Etapa III: Cinéticas de degradación del sistema reactivado y cinéticas de bioaugmentación de tres consorcios distintos.



En el proceso de refinación del petróleo se produce agua amarga, se llama así porque contiene contaminantes como ácido sulfhídrico, amoniaco, fenoles, hidrocarburos y compuestos de azufre de bajo peso molecular.

La literatura menciona que los principales contaminantes en el agua amarga proveniente de la industria petroquímica es el nitrógeno amoniacal, su aparición en sistemas acuáticos genera problemas ambientales muy severos, por otra parte, los compuestos fenólicos producidos en el proceso también son un problema, es común encontrar concentraciones por encima de 60 mg p-cresol /L, más de 20 mg o-cresol/ L, y 710 mg NH_4^+ /L, en los efluentes de una refinería en Tula, México. (Olmos *et al*, 2004).

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS E HIPÒTESIS

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo general:

Lograr la preservación y reactivación de microorganismos viables para la oxidación de N-NH_4^+ y la degradación de compuestos fenólicos.

3.1.2 Objetivos específicos:

- Conservar por el método de liofilización microorganismos, provenientes de un consorcio funcional.
- Reactivar un consorcio funcional utilizando un sistema RBM en continuo.
- Reactivar un consorcio funcional utilizando un reactor por lote.
- Comprobar la bioaumentación mediante la cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y carbono orgánico total (COT)
- Comprobar la reactivación del consorcio funcional en presencia de los sustratos: nitrógeno amoniacal (300mg/L) y dos concentraciones de la mezcla de fenoles (36 y



60 mg fenoles totales /L); mediante la cuantificación de N-NH_4^+ , una mezcla de fenoles totales y la producción de nitratos (NO_3^-).

- Observar los perfiles de degradación de 300 mg N-NH_4^+ /L y 60 mg/L de la mezcla de fenoles totales, esto para el reactor operado en continuo. Así mismo que se lleve a cabo la bioaumentación de tres tipos de consorcios microbianos en reactores por lote.

3.2 Hipótesis:

Si se lleva a cabo la conservación por liofilización de un consorcio microbiano funcional para nitrificación y se reactiva en un reactor RBM continuo, se podrán tener eficiencias de nitrificación comparables con el mismo consorcio sin haber sido sometido al proceso de liofilización ni reactivación a niveles que permitan la oxidación de N-NH_4^+ y la degradación de compuestos fenólicos.

CAPÍTULO 4. MARCO TEÓRICO

4.1 Industria petroquímica: Contaminación por nitrógeno amoniacal y compuestos fenólicos.

Actualmente la demanda de la sociedad para la descontaminación de aguas, ha impulsado al desarrollo de nuevas tecnologías de purificación, de modo que existe un gran interés por estimular la remoción de mezclas complejas de compuestos orgánicos e inorgánicos en aguas residuales generadas en la industria química, petroquímica y en la industria del carbono (Figuerola y Erijman, 2010).

Durante la refinación del petróleo se generan “aguas residuales amargas”, éstas provienen del craqueo catalítico e hidrotatamiento (Gasperín, 2013) reciben el nombre, por el alto contenido de ácido sulfhídrico, amoníaco, fenoles, entre otros compuestos, como restos de hidrocarburos.



El impacto ambiental de aguas provenientes de la refinación del petróleo, es indigno, esto se debe a la liberación de contaminantes tóxicos como fenol, minerales disueltos y restos de hidrocarburos (Ishak *et al*, 2012).

La industria petroquímica es una de las actividades más importantes para nuestro país. De los petroquímicos básicos se desprenden numerosas aplicaciones que van desde la agricultura hasta la producción de artículos de belleza (PEMEX, 2015).

La industria petroquímica, utiliza el petróleo y gas natural como materias primas con las cuales se pueden fabricar productos de uso común, por ejemplo, fertilizantes, medicinas, plásticos, disolventes, pinturas, colorantes y cosméticos. Sin embargo, es importante mencionar que consecuencia de la aportación de estos bienes, se genera en el ambiente un alto grado de contaminación, esto da origen a un grave impacto ambiental.

Pemex Gas cuenta con sistemas para tratamiento de aguas residuales, lo que le permite cumplir al 100% con los límites permisibles establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996, para los contaminantes básicos regulados, como grasas y aceites, sólidos suspendidos totales, nitrógeno total y fósforo (PEMEX, 2015).

A continuación, se muestra la Figura 1, que describe la concentración de contaminantes provenientes de la industria petroquímica en aguas residuales ASIPA, 2012 (PEMEX, Gas y petroquímica).

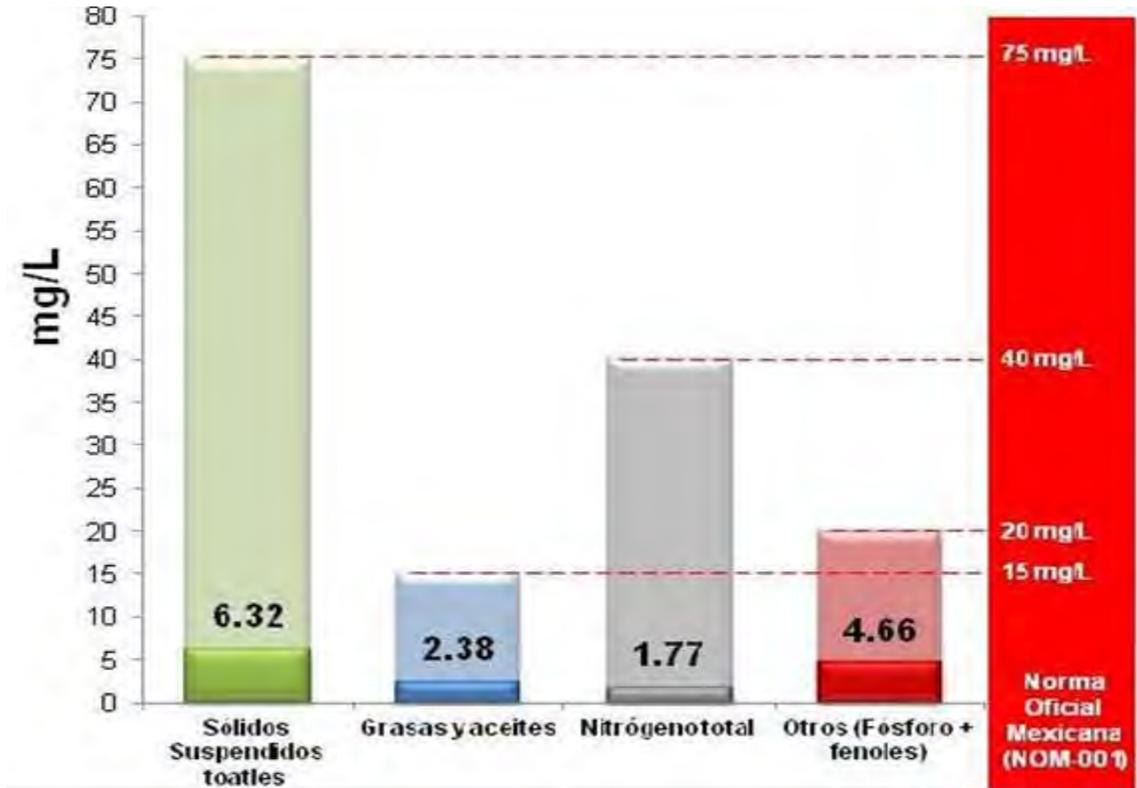


Figura 1. Contaminantes en las descargas de aguas residuales

Atendiendo el problema ambiental, debido a la presencia de contaminantes como nitrógeno amoniacal y derivados fenólicos, se han realizado diferentes investigaciones sobre cómo atacar este tipo de contaminantes y reducir el nivel de contaminación. Para remover los contaminantes como nitrógeno amoniacal y fenoles provenientes de este tipo de aguas se han desarrollado y perfeccionado tratamientos biológicos y procesos fisicoquímicos, como la adsorción, electrocoagulación, oxidación química y fotocátalisis, por mencionar algunos (Ishak *et al*, 2012)



4.2 Nitrógeno amoniacal

4.2.1 Problemas ambientales debido a la presencia de nitrógeno amoniacal en aguas residuales.

La presencia de nitrógeno en exceso en el ambiente ha provocado serias distorsiones en los compartimentos suelo, agua y aire. El nitrógeno amoniacal es soluble en agua, lo que significa que puede contaminar aguas subterráneas por mecanismos de lixiviación/infiltración (Halbinger *et al*, 2002). Existen diversas formas en que podemos encontrar al nitrógeno en sistemas acuáticos, las más comunes son el catión amonio (NH_4^+), y los iones nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) (Camargo y Alonso, 2007).

Dentro de los principales problemas que enfrenta el ambiente, debido a la contaminación por nitrógeno inorgánico son:

- 1-. La acidificación de ríos y lagos, con baja o reducida alcalinidad.
- 2-. La eutrofización de aguas dulces con la aparición de algas.
- 3-. Toxicidad directa de compuestos nitrogenados para los animales acuáticos.
- 4-. En los ecosistemas acuáticos la concentración de NO_2^- suele ser mucho mayor que la concentración de HNO_2 , los iones nitrito son considerados los principales responsables de la toxicidad para los animales.
- 5-. Como último caso, la contaminación por nitrógeno puede producir efectos secundarios en la salud humana.

Se considera que niveles máximos de nitrógeno inorgánico disuelto está dentro del rango 0.5 – 1.0 mg NID/L, estos niveles pueden ser adecuados para prevenir los procesos de acidificación y eutrofización en ecosistemas acuáticos. (Camargo y Alonso, 2007).

4.2.2 Eliminación del nitrógeno amoniacal contenido en aguas residuales

Es importante mencionar que para eliminar este contaminante se conocen diversos métodos ya sean procesos fisicoquímicos o biológicos.



El tratamiento biológico por nitrificación y des nitrificación se considera como la mejor alternativa económica y biológica para eliminar el nitrógeno amoniacal en sistemas acuáticos.

4.2.3 Técnicas fisicoquímicas para la eliminación del nitrógeno amoniacal en aguas residuales.

4.2.3.1 Arrastre de amoniaco (Stripping).

El método de stripping es un método físico, que se usa para la remoción de $N-NH_4^+$, donde éste es transferido de una fase líquida a una fase gaseosa, por medio de una columna empacada (Quan *et al*, 2009). El proceso consiste en alcalinizar el agua hasta lograr un pH entre 10.5 y 11.5 a manera que el equilibrio $NH_4^+ + 2e^- \rightleftharpoons NH_3 + H_2$ esté desplazado hacia la formación de amoniaco y éste sea eliminado mediante una corriente de aire (EPA, 1987). Por otra parte, es necesario considerar la eficiencia del método, por lo tanto es necesario trabajar a una temperatura mayor a $60^\circ C$, y al término del proceso, el amoniaco producido deberá ser absorbido por una corriente de agua, a fin de que el gas no sea emitido directamente a la atmósfera y se obtenga agua amoniacal o una sal de amonio. Cabe mencionar que el proceso es eficaz en aguas residuales con concentraciones entre 10-100 mg/L, para este trabajo se utilizan concentraciones de 150 y 300 mg/L de $N-NH_4^+$, razón por la cual se le considera al método deficiente.

4.2.3.2 Resinas de intercambio iónico.

Este método es costoso si se realiza con resinas comerciales. Para reducir costos, las resinas, pueden ser sustituidas por zeolitas naturales (Halbinger *et al*, 2002). Por ejemplo, la zeolita llamada clinoptilolita, tiene una gran afinidad hacia cationes como el amonio debido a que posee una estructura con carga negativa.

El método no es conveniente porque cuando el intercambiador de iones se satura, tiene que renovarse habitualmente, y cabe mencionar que una zeolita de este tipo pierde notablemente su capacidad de intercambio iónico en su tercera regeneración (Turan *et al*, 2005).



4.2.4 Técnicas biológicas para la eliminación del nitrógeno amoniacal en aguas residuales.

El tratamiento convencional de eliminación biológica del amonio consta de dos procesos microbianos. Se define como el acoplamiento de los procesos nitrificante y desnitrificante para transformar amonio a nitrógeno molecular. Este sistema de tratamiento, se divide en dos etapas, una aerobia (nitrificación) donde el amonio es oxidado a nitrato, seguido del proceso de (Desnitrificación) que es una etapa anóxica, en la cual el nitrato producido en la nitrificación; es reducido a nitrógeno molecular (Silva, 2011).

4.2.5 Ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno es un proceso biológico cerrado, que tiene como principio suministrar este elemento a todos los seres vivos.

Dentro del ciclo del nitrógeno se encuentran procesos reductivos y sólo un oxidativo, este último es el más importante en este estudio.

Dentro de los procesos reductivos que integran el ciclo del nitrógeno, se encuentran:

- Fijación del nitrógeno
- Amonificación
- Reducción desasimilatoria del nitrato a amoníaco (RDNA),
- Oxidación anaerobia del ión amonio (ANAMMOX) por sus siglas en inglés.
- Desnitrificación

El único proceso oxidativo dentro del ciclo del nitrógeno es la nitrificación, cuya ruta se puede apreciar consecutivamente en la figura 2 (Silva, 2011).

El proceso de oxidación de amonio da inicio por la acción de la enzima amonio oxigenasa (AMO), ésta oxida el amonio a hidroxilamina (NH_2OH) mediante el consumo de oxígeno molecular y dos electrones. El intermediario hidroxilamina es oxidado a nitrito por la enzima hidroxilamina oxido reductasa (HAO), finalmente el anión nitrito (NO_2^-) es oxidado a nitrato (NO_3^-) a este proceso se le conoce como nitrificación.

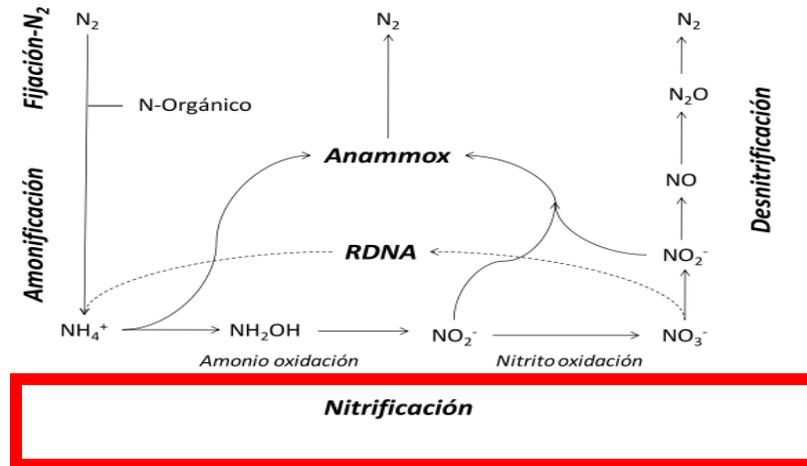
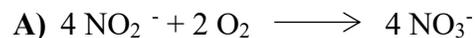
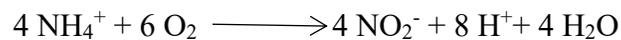


Figura 2. Ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Retomado de (Silva, 2011) por consultar en (Figura 1: Ciclo biogeoquímico del nitrógeno modificado de Beristáin et al, 2009)

Los compuestos de nitrógeno pueden ser eliminados tanto por procesos físicos y químicos, o por procesos biológicos.

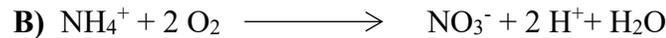
4.2.6 Proceso de nitrificación

La nitrificación es un proceso aerobio biológico convencional, de remoción de nitrógeno, el cual consiste en oxidar amonio a nitrato. Se lleva a cabo en dos etapas (A y B) debido a dos grupos de microorganismos gram negativos litotróficos, filogenéticamente no relacionados, estos pueden ser esféricos, bacilares o espirales (Mackenzie, 2005).



La primera reacción se lleva a cabo a través de bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*, este tipo de bacterias se conocen como bacterias amonio oxidantes (BAO), la segunda reacción se ve dirigida por las bacterias del género *Nitrobacter*, también conocidas como nitrito oxidante (BNO). Es importante señalar que, en ambas etapas, las respectivas bacterias nitrificantes utilizan amonio o nitrito como fuente de energía, oxígeno molecular como aceptor final de electrones y CO_2 como fuente de carbono (Silva, 2011).

La reacción general entre estos dos pasos es (C): (Mackenzie, 2005).



Desafortunadamente la reacción (C) se ve inhibida con la presencia de compuestos fenólicos (Figura 3), algunos generados por la industria petrolera. (Texier y Gómez, 2011)

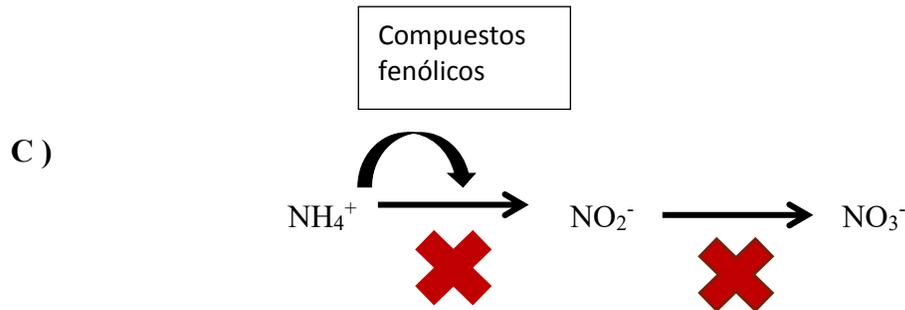
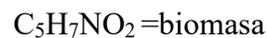


Figura 3. Proceso de nitrificación inhibido en presencia de compuestos fenólicos. Elaboración propia.

4.2.7 Bacterias nitrificantes

Las bacterias nitrificantes son denominados organismos quimiolitótrofos aerobios, esto quiere decir que obtienen energía de reacciones químicas, consumiendo un sustrato inorgánico dador de electrones, por ejemplo, HCO_3^- o CO_2 como fuente de carbono, obteniendo la energía necesaria para su crecimiento, también producen su propia masa celular y materia orgánica. Para que este tipo de microorganismos subsista es necesario que se desarrollen en un medio rico en oxígeno diatómico. La ecuación 1 muestra representativamente la reacción global del proceso biológico conocido como nitrificación, el cual es estudiado en este trabajo.



En la figura 4, se presentan algunas características de las bacterias Amonio Oxidantes y las bacterias Nitrito Oxidantes.

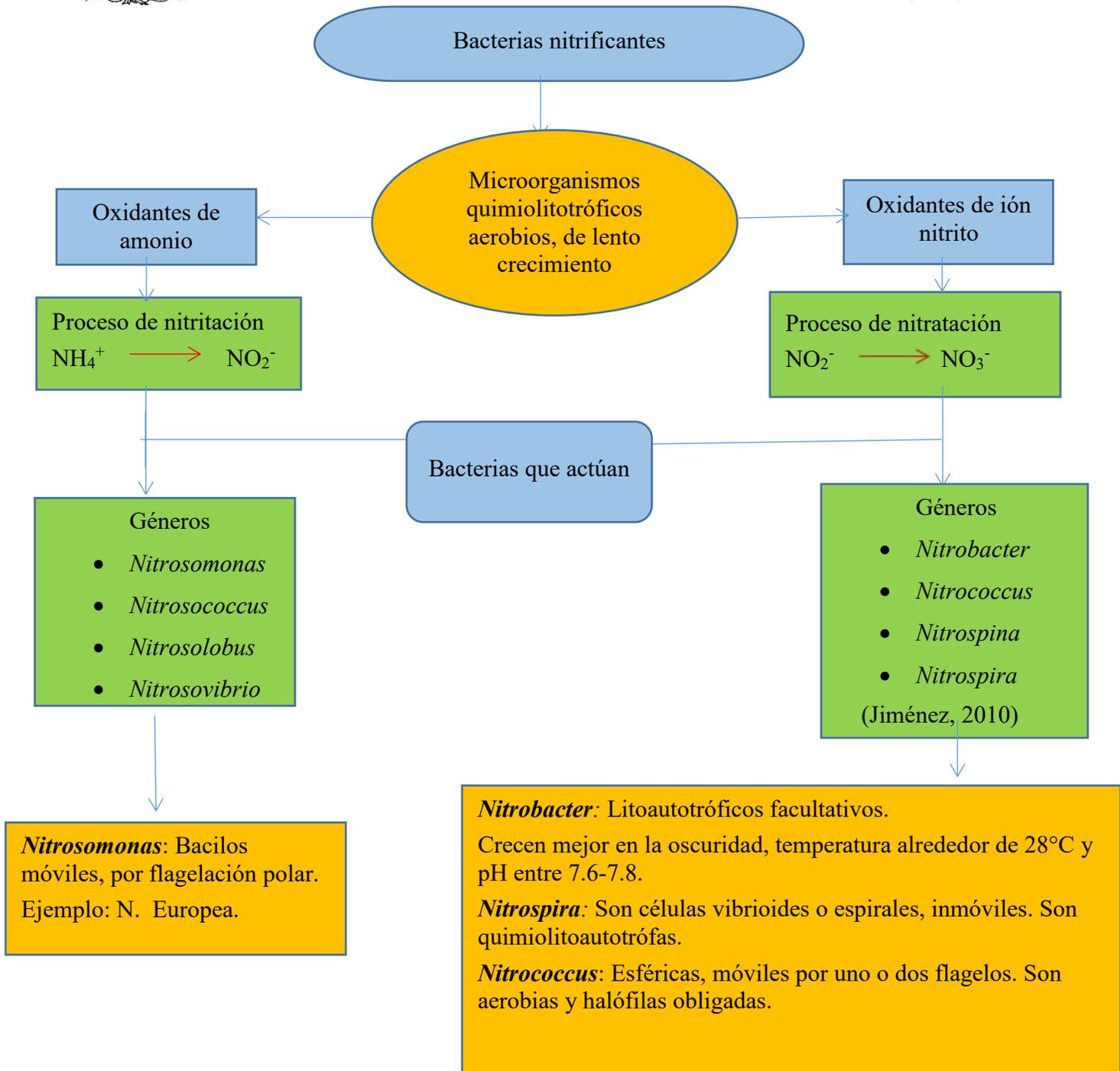


Figura 4. Características de las bacterias amonio oxidante y nitrito oxidante. (Jiménez, 2010; Silva, 2011). Elaboración propia.



4.2.8 Inhibición de la nitrificación

4.3.1 Problemas ambientales debido a la presencia de compuestos fenólicos en aguas residuales.

- 1-. Los peces sufren pérdida total en la actividad motora y en muchas ocasiones la muerte (Barrios *et al*, 2006).
- 2-. De ser ingerido por el organismo humano, puede causar descompensaciones como la anorexia, daño hepático y presión arterial (Barrios *et al*, 2006).
- 3-. Son fácilmente absorbidos por los animales y el hombre a través de la piel y las membranas mucosas, afecta a gran parte de los tejidos, órganos, sistemas de órganos e incluso a los cromosomas (Camacho, s.f).

4.3.2 Eliminación de compuestos fenólicos contenidos en aguas residuales

El fenol y sus derivados se utilizan ampliamente como materias primas en la industria petroquímica y en el aceite de refinerías, por ejemplo, en el lavado y acondicionamiento de productos alcalinos o ácidos (Barrios *et al*, 2006)

El fenol puede ser oxidado de manera biológica, química o electroquímica, cuando se utilizan estas técnicas se tiende al método destructivo, que se usa cuando las concentraciones de fenol son bajas.

La mezcla de compuestos fenólicos para este estudio es la siguiente: (fenol; o-cresol; p-cresol; 3,4-dimetilfenol; 3,5-dimetilfenol).

4.3.3 Degradación biológica del fenol

Se dice que, para contrarrestar el problema ambiental por contaminantes orgánicos, no es conveniente su degradación por procesos biológicos, porque las técnicas resultan muy costosas, una opción puede ser la oxidación parcial de los compuestos fenólicos. Industrialmente se usan métodos como la extracción, para fenoles sustituidos, y de



concentración alta, sin embargo, las pérdidas de disolventes pueden ser significativas y se crea un problema adicional por el uso de estos compuestos. Se procedió a realizar la degradación biológica de los compuestos fenólicos porque es un método capaz de mineralizar por completo las moléculas orgánicas a CO₂ y agua en condiciones aerobias.

Las industrias petroquímicas y de transformación del carbón descargan fenol, metil fenoles y en general alquil fenoles (ATSDR, 2008). Por ejemplo, los siguientes compuestos fenólicos, cuya mezcla es objeto de estudio en este trabajo (Figura 5).

Cabe mencionar que para conocer la presencia de la mezcla de fenoles totales en la disolución sintética se toma en cuenta la NMX-AA-050-SCFI-2001, se lleva a cabo por el método espectrofotométrico UV- visible, así mismo para detectar la ausencia de la mezcla en la misma disolución ver anexo 9.3.

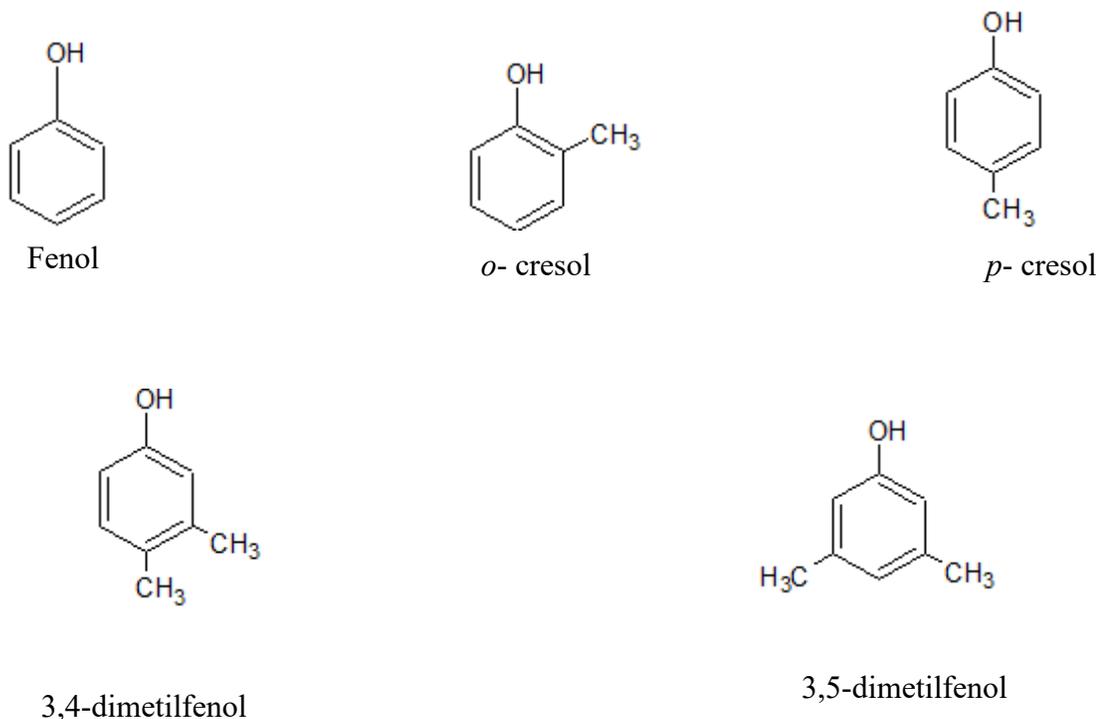


Figura 5. Mezcla de compuestos fenólicos estudiados en este trabajo. Estructuras realizadas con el programa 3D Viewer. Elaboración propia. 



En el año 2010 Lazcano, realizó un estudio de cromatografía de gases (CG) para determinar la concentración de cada uno de los fenoles incluidos en esta mezcla y presentes en el agua de lagunas de estabilización, en la tabla 1 es posible apreciar esta información.

Tabla 1. Determinación de compuestos fenólicos en agua de lagunas de estabilización (Lazcano, 2010)

Compuesto	Concentración [mg/L]
Fenol	201.3
<i>o</i> -cresol	64.6
<i>p</i> -cresol	2.8
3,4-dimetilfenol	4.8
3,5-dimetilfenol	13.7

Es importante mencionar que en este trabajo la degradación del fenol se llevará a cabo por medio de un consorcio funcional nitrificante y degradador de compuestos fenólicos, este es un sistema aerobio y se realiza vía catecol.

4.3.3.1 Degradación biológica del fenol aerobia:

- 1) El primer paso de la degradación del fenol es catalizado por una enzima llamada mono-oxigenasa, la cual incorpora uno de los dos átomos de oxígeno molecular al anillo bencénico del fenol, en forma de grupo hidroxilo, en consecuencia, el otro átomo se reduce al agua. Obteniendo como producto de la reacción, el compuesto catecol (Schlegel, 1997), este proceso se observa en la figura 6.

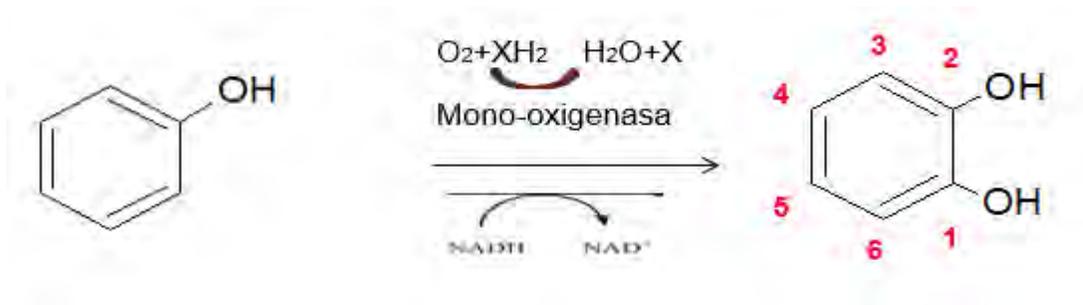


Figura 6. Hidroxilación del fenol a catecol

- 2) El anillo del catecol formado, puede ser oxidado por vía orto para obtener ácido mucónico o vía meta donde se obtiene semialdehído 2-hidroximuconato. Las especies de *Pseudomonas* mineralizan el fenol a través de la vía meta-oxidación (Barrios *et al*, 2006)

4.3.3.1.1 Ruta orto.

La figura 7 describe la ruptura del anillo que ocurre al interior del enlace diol, posición 1-2 del catecol, generando como producto de la reacción, ácido mucónico, los microorganismos que codifican las enzimas de la ruta orto se encuentran situados en el DNA, algunos de ellos son *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra*.

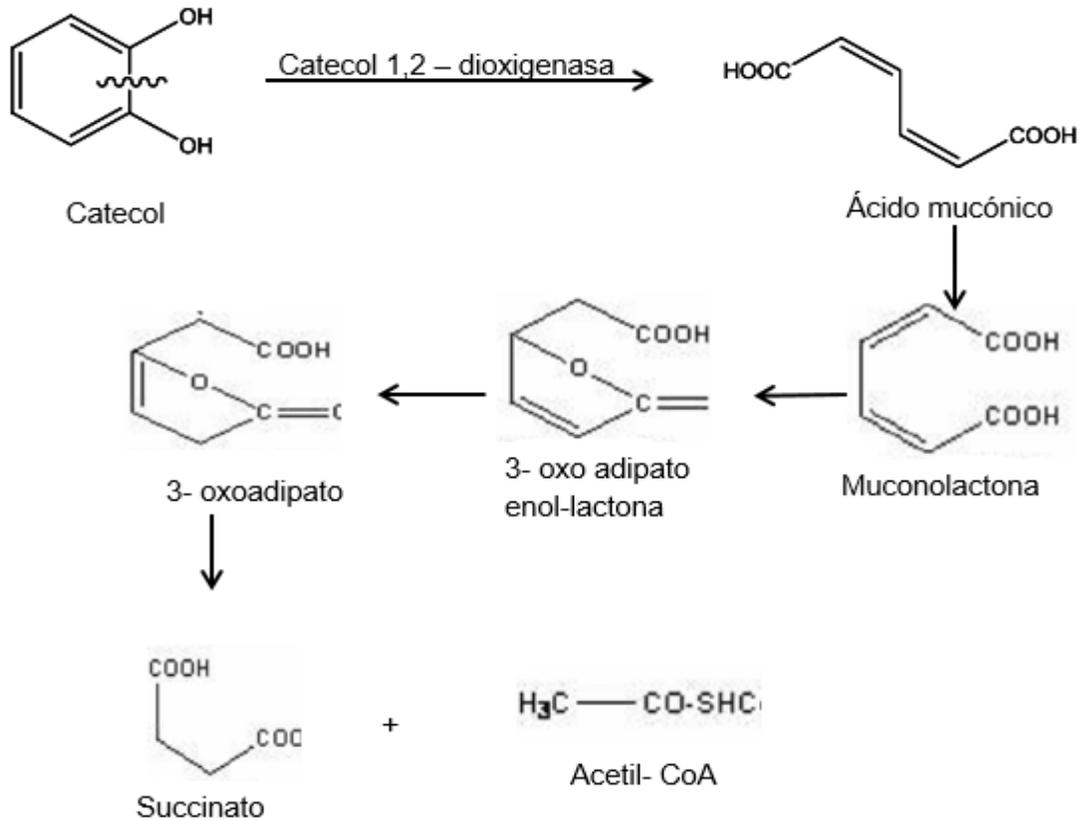


Figura 7. Degradación biológica aerobia del fenol, ruta orto. Elaboración propia. Adaptado de (García, 2007; Valera, 2006)

4.3.3.1.2 Ruta meta

En la ruta meta la ruptura de la especie catecol, se lleva a cabo entre los carbonos 2-3 de anillo bencénico, originando como producto de la reacción el compuesto semialdehído 2-hidroximucónico, esta ruta es muy común en el metabolismo de bacterias, micro algas y hongos, los microorganismos que participan en este proceso son, por mencionar algunos *Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha* y *Ochromonas dánica*. El producto semialdehído 2-hidroximucónico (2-hmas) puede ser degradado de dos maneras diferentes.

Forma A:



- a) El semialdehído 2- hidroximucónico (2-hmas) es oxidado por una enzima deshidrogenasa, para dar lugar a la especie química ácido 2- hidroximucónico.
- b) El ácido 2- hidroximucónico es descarboxilado por la acción sinérgica de dos enzimas (Isomerasa y descarboxilada), para producir el Ácido 2- oxo-penta-4-enóico.
- c) Este último es degradado por hidratación a ácido-4-hidroxi-2-oxopentanóico, debido a la acción de una hidrolasa;
- d) La degradación continúa hasta las especies acetaldehído y ácido pirúvico, por acción de una aldolasa, estas últimas especies pueden ingresar al ciclo de Krebs (García, 2007)

Forma B

La segunda forma para degradar la especie 2-hmas es que este puede ser fraccionado por hidrólisis y producir los ácidos fórmicos y 2- oxopenta-4-enoico, con ayuda de una hidrolasa, la degradación continúa, como se describe en los incisos c y d de la forma A.

A continuación, se muestra la figura 8, la cual describe claramente el proceso descrito.

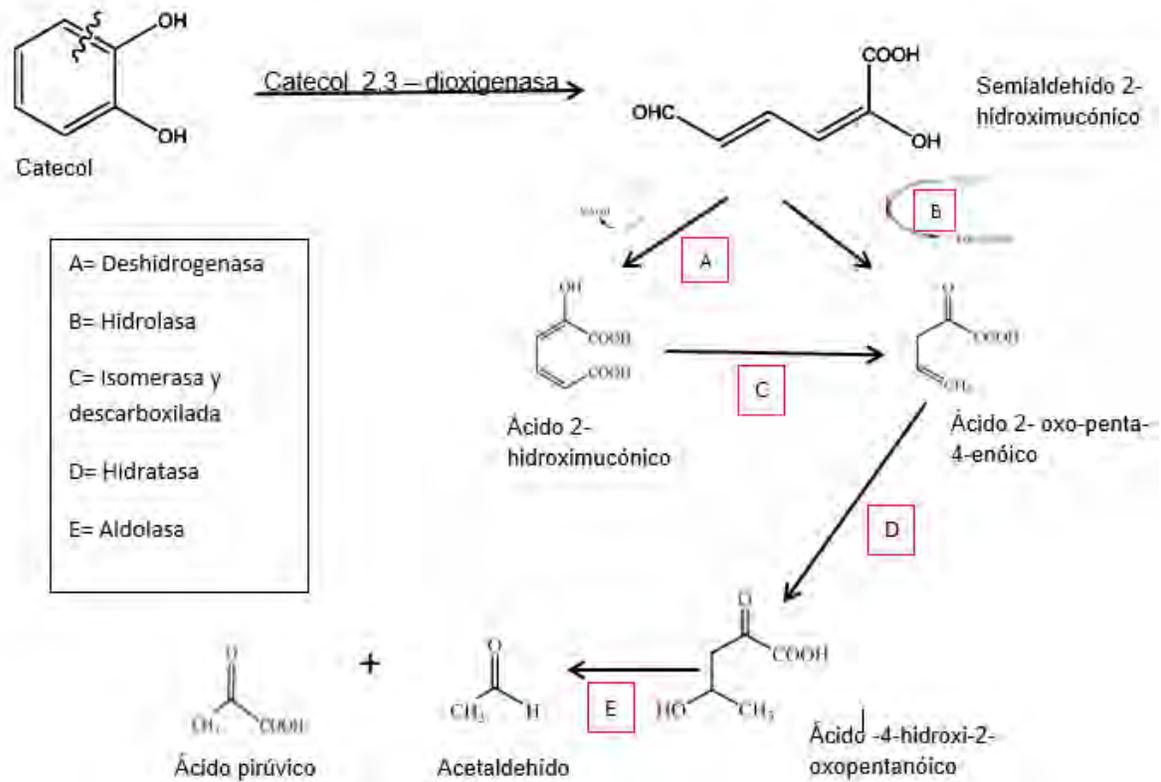


Figura 8. Degradación biológica aerobia del fenol, ruta meta. Elaboración propia, adaptado de (García, 2007)

4.4 Reactor biológico de membrana

El sistema reactor biológico de membrana (RBM) combina dos procesos uno de depuración biológica y la filtración por membrana.

Está constituido por dos parámetros importantes; 1) la membrana, cuya función es retener los sólidos en suspensión, la biomasa depuradora y otros microorganismos presentes en el agua, logrando un efluente de gran calidad (Vizcaya, 2006). 2) la biomasa, tiene como finalidad llevar a cabo los procesos de degradación biológica.

4.4.1 Funcionamiento del reactor biológico de membrana

El agua del reactor es filtrada pasando a través de las paredes de una membrana, debido a una pequeña depresión producida por una bomba centrífuga. El agua filtrada es extraída del



sistema mientras el fango y los compuestos de tamaño superior al poro de la membrana quedan retenidos y permanecen o retornan al reactor biológico (Lozano, 2006)

Para llevar a cabo la experimentación de este trabajo se utilizó un sistema (RBM), con biomasa suspendida, esto quiere decir que los microorganismos se encuentran libres dentro del tanque (Valera, 2006).

4.5 Preservación de cepas microbianas.

Existen tres objetivos que se deben lograr para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología.

- 1-. El cultivo a conservar debe ser puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación y sin alteraciones en el material genético de la célula.
- 2-. Para que el método utilizado sea óptimo es importante que se obtenga la supervivencia de al menos el 70-80% de las células preservadas.
- 3-. Las células deberán permanecer genéticamente estables (García y Uruburu, 2001).

Según la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC por sus siglas en inglés) es conveniente optar por al menos dos métodos de conservación, para garantizar la seguridad y minimizar la probabilidad de pérdida de cepas (Weng *et al*, 2005)

4.5.1 Técnicas de preservación de microorganismos

Las técnicas de preservación de microorganismos se dividen en 3 categorías, de acuerdo al tiempo en que las células permanecerán viables.

4.5.1.1 Método de elección o de conservación a largo plazo

Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Aun así, no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo (García y Uruburu, 2001)

- Conservación por congelación (-70 °C y -196 °C)



- Conservación por liofilización

Estas dos técnicas minimizan el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más (Weng *et al*, 2005). El problema que presentan estas técnicas es que el precio es muy elevado, razón por la cual se recurre a utilizar métodos alternativos o restringidos.

4.5.1.2 Métodos de conservación alternativos

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección a largo plazo, por carecer de los equipos necesarios, o porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos (García y Uruburu, 2001). Conservación por transferencia periódica

- Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril

4.5.1.3 Métodos de conservación restringidos:

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos *Spirillum*, *Rhodospirillum*, etc. (García y Uruburu, 2011).

- Desecación en papel de filtro
- Desecación en suelos, arena, silica gel
- Desecación en bolitas de alginato
- Desecación en sal gorda para halo bacteria

Estos cuatro métodos se basan en la paralización del crecimiento por eliminación del agua disponible para las células.



4.6 Liofilización: Método de preservación a largo plazo

Está considerado como el método más adecuado para la preservación de microorganismos (Hernández y Loaiza, 2014). Se basa en el congelamiento de un cultivo en fase estacionaria, donde las células son más resistentes, posteriormente son re-suspendidas con un medio crio protector (regularmente inositol o leche descremada) (García y Uruburu, 2001) con el fin obtener una alta densidad celular; seguido por un secado bajo vacío, razón por la cual se lleva a cabo el proceso de sublimación del agua contenida en la suspensión celular, este cambio de estado va desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el líquido, preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

Este método de preservación es apropiado para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram positivas sobreviven mejor que las Gram-negativas. Cuando un material es liofilizado correctamente, éste puede ser almacenado por periodos muy prolongados de tiempo, incluso es confiable la conservación de sus características físicas, químicas, organolépticas y biológicas.

4.6.1 Proceso de liofilización

El proceso de liofilización se divide en tres etapas.

- 1) Congelación**
- 2) Secado por sublimación del hielo**
 - Primera etapa de secado
 - Segunda etapa de secado
- 3) Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas.**



4.6.1.1 Etapas de la liofilización:

4.6.1.1.1 Congelación

De esta etapa depende la mayor parte del proceso de liofilización, resalta los principios físicos bajo los cuales ocurre la solidificación del agua, el número y el tamaño de los cristales dependerán de la velocidad de congelación

El producto debe congelarse de manera que garantice que sufrirá pocas alteraciones en el proceso posterior a la sublimación, es necesario que se conozcan las siguientes características:

- a) Temperatura a la que ocurre la máxima solidificación.
- b) La velocidad optima de enfriamiento
- c) La temperatura mínima de fusión incipiente

Se busca que el producto ya congelado tenga una estructura sólida sin huecos en los que haya líquido concentrado para propiciar que todo el secado ocurra por sublimación.

En caso de que la mezcla contenga cristales de hielo o vítreos amorfos, quizá se puede deber a que estas últimas son propiciadas por la presencia de azúcares, alcoholes, cetonas, aldehídos y ácidos, o por las altas concentraciones de sólidos en el producto inicial.

Es importante considerar que el agua en aspecto vítreo sigue estando en forma líquida, la presión de vapor del agua en el vidrio, según la ley de Raoult, tenderá a ser menor que la del hielo a la misma temperatura. Como resultado de la baja velocidad de evaporación del agua el sistema vítreo puede fundirse cuando la temperatura aumenta.

Porosidad del producto

La difusión de vapor aumenta proporcionalmente con la porosidad, razón por la cual la lenta velocidad de congelación del producto provoca rápida velocidad de secado, ya que los cristales formados son voluminosos y se transforman en poros después de la sublimación. Los cristales formados durante la congelación son más pequeños en cuanto mayor es el extracto inicial. Por lo tanto, la velocidad inicial disminuye cuando aumenta el extracto seco del producto.



4.6.1.1.2 Secado por sublimación del hielo

En la etapa anterior (congelación), ya se ha solidificado la mayor cantidad de agua; posteriormente inicia la etapa de secado o deshidratación por sublimación que constituye el objetivo principal de la liofilización.

Primera etapa de secado

El proceso de secado como tal puede ocurrir o no a bajas presiones, pero en tales condiciones es mucho más eficiente el proceso difusivo.

El paso de hielo a vapor requiere gran cantidad de energía que suministrada en alto vacío la interface de secado se mueve hacia el interior de la muestra y el calor tiene que atravesar capas congeladas.

Considerable riesgo de fusión del material intersticial o quemar la superficie del producto que ya está seco.

En la sublimación se distinguen tres etapas, la fase conductiva, la primera fase difusiva y la segunda fase difusiva.

I. Fase Conductiva

Inicia por el calentamiento de la muestra, la velocidad de sublimación aumenta y llega a un máximo. Esta fase dura poco tiempo, sin embargo es donde se lleva a cabo la deshidratación de la muestra hasta un 90%.

II. Primera fase difusiva

Se observa la aparición de una capa porosa de material seco en la superficie de la muestra, la cual opone resistencia al flujo de calor y al vapor cuando avanza el secado, a esta barrera se le llama frente de sublimación, mismo que se desplaza hacia el interior de la muestra, causando que el contenido del agua disminuya paulatinamente; por esta razón ocurre un importante descenso en la velocidad de sublimación, con acercamiento a cero, esto se debe a que el calor necesario para deshidratar la muestra es más alto que el calor de sublimación.

III. Segunda fase difusiva



La velocidad de sublimación sigue descendiendo, porque la cantidad de agua es menor, esto se debe a que el calor necesario para deshidratar la muestra es más alto que el calor de sublimación.

Segunda etapa de secado

Después del proceso de secado primario, la humedad remanente en el producto se adsorbe por la superficie del mismo.

4) 4.6.1.1.3 Almacenamiento del producto en condiciones controladas

Los productos liofilizados, deben ser almacenados en ambientes frescos y oscuros por largos periodos de tiempo para que preserven las propiedades físicas, químicas, biológicas y organolépticas.



5) 4.6.2 Equipo de liofilización.

El equipo de liofilización (Figura 9) consta de tres partes principales, la cámara de secado, el condensador y el sistema de vacío.



Figura 9. Equipo de liofilización marca LABCONCO

4.6.2.1 Cámara seca o cámara de liofilización: Corresponde al lugar donde se coloca la sustancia a liofilizar, debe tener condiciones esterilizadas y su material debe soportar los valores de presión y temperatura requeridos. En esta parte del equipo es donde se realiza la sublimación, pasando el agua de sólido a vapor. El cierre es hermético y se trabaja a bajo vacío.

4.6.2.2 Condensador con circuito de refrigeración: Conecta con la cámara seca, en esta parte se condensa el vapor que se produce en el proceso de sublimación. El sistema de condensación enlaza también con un refrigerante, éste lo mantiene a una temperatura más baja que la cámara seca (-50 °C), esta condición de temperatura es óptima para controlar el secado primario y secundario.



4.6.2.3 Sistema de vacío: El vacío se produce con una bomba de aceite que trabaja sobre 0.018 mbar conectada a una trampa para que no pasen vapores del disolvente a su interior. El sistema de vacío elimina primero el aire de la cámara seca al iniciar el proceso de liofilización, y luego induce la sublimación.

Al emplear la liofilización como método de conservación se comprobó que se mantienen inalteradas las características propias de las especies microbianas estudiadas, con un alto grado de pureza (Burguet *et al*, 2012)

4.7 Bioaumentación

La información sobre la bioaumentación a gran escala de microorganismos especializados es escasa, debido a los experimentos fallidos sobre este ámbito (Park *et al*, 2008). Sin embargo, el uso de bacterias es muy rentable, sobre todo en el mejoramiento del proceso de nitrificación, en plantas de tratamiento, o sitios donde el principal problema es el nitrógeno amoniacal.

El aumento en la biomasa, también llamado bioaumentación, considera dos aspectos importantes el primero es incrementar la densidad de población bacteriana con sus respectivas enzimas, y el segundo es llevar a cabo el objetivo específico de degradación, como mitigar el mal olor y disminuir la producción de lodos (García, 2012), es una alternativa eficiente para la mejora en el tratamiento de aguas residuales municipales que presentan una alta concentración de amonio. Para el caso de la remoción de compuestos orgánicos el proceso de bioaumentación es considerado eficiente, debido a que se usan bacterias específicas que presentan ventajas sobre los tratamientos biológicos convencionales, pues estos microorganismos pueden degradar y oxidar completamente los compuestos orgánicos tóxicos a compuestos inocuos, estos procesos son de bajo costo.



4.8 Cinéticas de reacción:

El estudio de la velocidad a la cual se efectúan las diferentes reacciones químicas, se llama cinética química o cinética de reacción, este estudio involucra la variable tiempo y monitorea la trayectoria que siguen los reactivos para convertirse en productos.

4.8.1 Velocidad de reacción (v)

Describe la rapidez de formación o desaparición de un compuesto al transcurrir el tiempo de reacción.

4.8.2 Ley de velocidad

En la cinética de reacción, la producción de un compuesto se representa con un signo positivo (+r), inversamente se aplica un signo negativo (-r) a la desaparición del mismo.



Donde

a,b,c = coeficientes de proporcionalidad para los reactivos A,B,C.

$$-\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = +\frac{1}{c} \frac{d[C]}{dt} = -k[A]^{\alpha} [B]^{\beta} \quad \text{Ecuación. 1.2}$$

4.8.3 Ecuación de velocidad de reacción

$$v = k [A]^{\alpha} [B]^{\beta} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Donde

α, β y k Son constantes determinadas empíricamente



4.8.4 Constante de velocidad de reacción

Se representa con la letra k , es un término de proporcionalidad que depende de la temperatura y la presión del medio.

4.8.5 Orden de la reacción

El orden total de la reacción, es la suma de los exponentes a los cuales están elevadas las concentraciones referidas en la ley de rapidez de reacción y se determina experimentalmente.

En la ecuación 1.3 el exponente α es el orden de reacción con respecto al reactivo A y β con respecto al reactivo B, de tal modo que el orden global de la reacción es orden global $=\alpha + \beta$

La degradación de contaminantes se lleva a cabo con la reacción de primer orden. En la figura 10 se representa la curva de rapidez de reacción, la cual comprende una reacción de primer orden, así mismo la tabla 2 comprende los parámetros requeridos para estimar la cinética de primer orden.

Tabla 2. Parámetros para cinética de primer orden

Reacción de primer orden	
Ecuación de velocidad de orden cero	$\vartheta_a = -k[A]$ (tiempo ⁻¹)
Velocidad de reacción de orden cero en su forma diferencial.	$d[A]/dt = -k[A]$
Velocidad de reacción de primer orden en su forma integrada	$\ln[A]/[A]_0 = -kt$
Forma de la gráfica	Lineal: $\ln[A]$ vs t ; $m = -k$; $b = \ln[A]_0$



Cinéticas de reacción

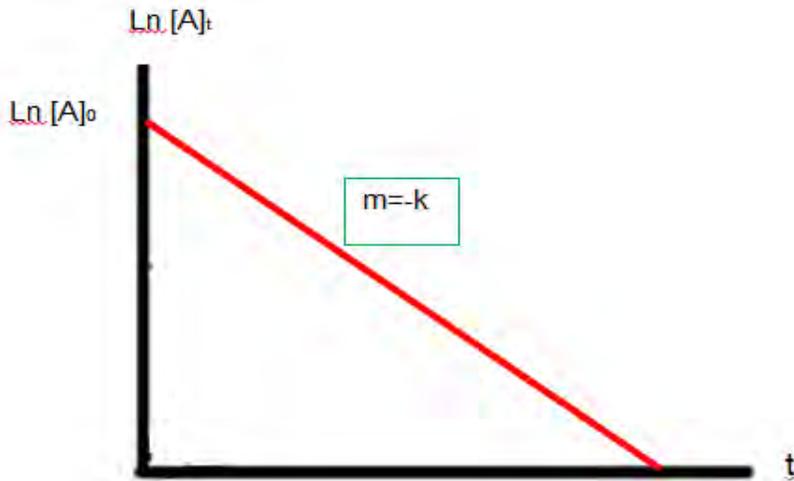


Figura 10. Gráfica que ilustra la cinética para una reacción de primer orden

$$\text{Ln}[A]_t = -k t + \text{Ln}[A]_0 \quad \text{Ecuación 1.4}$$

Dónde:

$[A]_0$ = concentración al tiempo cero	$[A]_t$ = concentración final
t = tiempo de experimentación	k =constante cinética

4.9 Crecimiento microbiano

Cuando se trabaja con reactores biológicos es necesario comprender la forma en la que el crecimiento microbiano se lleva a cabo dentro del sistema. En un cultivo de bacterias en medio líquido se presentan cuatro fases, latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

La figura 11 representa la curva de crecimiento microbiano, la cual muestra las fases a continuación descritas.



Figura 11. Crecimiento microbiano. Modificado de (Ghasem, 2007)

Este tipo de curva se usa para representar el comportamiento del crecimiento de microorganismos a través del tiempo, la curva ayuda para identificar el momento en que se producirá la mayor cantidad de biomasa (Trinidad, 2014).

4.9.1 Fase latencia o de adaptación (lag).

En esta etapa, los microorganismos inoculados se adaptan paulatinamente a las condiciones nutricionales y ambientales del nuevo medio, en esta fase el crecimiento microbiano puede no ser representativo, aunque hay metabolismo microbiano activo. Lo breve o prolongada que pueda ser esta fase va a depender de la procedencia del cultivo y las condiciones ambientales que se suministren al consorcio microbiano.

4.9.2 Fase exponencial o logarítmica:

En esta etapa los microorganismos son alimentados con el sustrato correspondiente y ocurre duplicación celular, las células participantes se multiplican a la máxima velocidad, manteniendo un crecimiento exponencial constante.

- 1) Velocidad máxima de crecimiento:



- Depende de condiciones ambientales como temperatura, pH, composición del medio, concentración de oxígeno disuelto y también las características genéticas del microorganismo.
- Permanece constante durante la etapa exponencial y es independiente de la concentración del sustrato, sólo si éste último se encuentra en exceso.

2) Tiempo de duplicación:

Es el tiempo en que una célula se duplica, también se le conoce como tiempo de regeneración, que en el caso de las bacterias va desde los 15 minutos hasta las 20 horas (Trinidad, 2014; Ortiz, 2013)

$$t = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

μ = velocidad específica de crecimiento (t^{-1})

t = tiempo de crecimiento (t)

Finalmente, la fase exponencial concluye si los nutrientes se agotan, las condiciones ambientales fundamentales se modifican y cuando la misma célula produce metabolitos tóxicos que inhiben su reproducción (Trinidad, 2014).

4.9.3 Fase estacionaria:

En esta etapa el crecimiento de la comunidad microbiana depende de la concentración del sustrato, de tal manera que, si la concentración de sustrato aumenta, también lo hará la tasa de crecimiento microbiano, y por ende, si disminuye la cantidad de sustrato, se reducirá la concentración del consorcio microbiano. Es en esta fase donde la velocidad de división celular ha menguado, por eso las células nuevas se producen al mismo tiempo que las viejas mueren y el número de células es constante, razón por la cual se aprecia un equilibrio celular.



4.9.4 Fase muerte

Esta es la última etapa del crecimiento microbiano, también se le conoce como fase declive o fase endógena, inicia cuando el alimento del medio de cultivo ya no es suficiente, por lo tanto, no hay reproducción y prevalece la muerte celular, en consecuencia, la tasa microbiana disminuye paulatinamente de manera exponencial.

4.10 Ecuación de Monod.

A continuación se enuncia la ecuación de Monod la cual describe el crecimiento celular para la biomasa y decrecimiento del sustrato durante el cultivo en un reactor por lote (Figura 12), en aquellos sistemas donde la mayor parte de la concentración del sustrato es transformado en biomasa.

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{s}{s+K_s} \right) \quad \text{Ecuación 1.6}$$

Para conocer el valor de la constante específica de crecimiento microbiano (μ), es posible graficar los valores de $\ln X$ vs t (Logaritmo natural de la concentración de biomasa, con respecto al tiempo), esto no es otra cosa que la linealización de la ecuación de Monod.

$$\ln X = \mu * t + cte \quad \text{Ecuación 1.6 a}$$

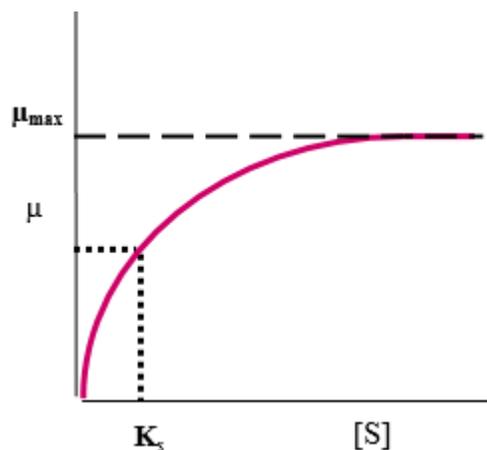


Figura 12. Ecuación de Monod



En la ecuación de Monod se enuncia que, a una concentración baja de sustrato, la velocidad de crecimiento llega a ser función de la concentración del sustrato.

Para este trabajo se desea evaluar experimentalmente los parámetros cinéticos K_s y μ_{max} para los consorcios “preservado original” y “preservado reactivado” a partir del comienzo de la bioaumentación.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} \cdot (X) \cdot (S)}{K_s + S} \quad \text{Ecuación 1.7}$$

La ecuación 1.7 indica que la velocidad de crecimiento de la biomasa es proporcional a la cantidad de biomasa existente.

$$-Y \frac{dS}{dt} = \frac{dX}{dt} \quad \text{Ecuación 1.8}$$

La ecuación 1.8 hace referencia a la velocidad del consumo de sustrato, afirmando que es inversamente proporcional a la cantidad de biomasa existente.

Despejando el parámetro Y de la ecuación 1.8

$$Y = -\left(\frac{dX}{dt} \cdot \frac{dt}{dS}\right) \quad Y = \frac{dX}{dS} \quad \text{Ecuación 1.9}$$

Sustituyendo la ecuación 1.7 en la ecuación 1.8:

$$-Y \frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{max} \cdot (X) \cdot (S)}{K_s + S} \quad \text{Ecuación 1.10}$$

Despejando el parámetro $\frac{dS}{dt}$ de la ecuación 1.10 se obtiene:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{max} \cdot (X) \cdot (S)}{Y(K_s + S)} \quad \text{Ecuación 1.11}$$

Para estimar los parámetros cinéticos K_s y μ_{max} , es necesario conocer el valor de la velocidad específica de crecimiento (μ), para hallar este valor se utiliza la ecuación 1.12

$$\mu = \frac{\left(\frac{\Delta S}{\Delta t}\right) Y}{X_{max}} \quad \text{Ecuación 1.12}$$



$$Y = \left(\frac{X_{max} - X_0}{S_0 - S_{final}} \right) = \frac{[\text{máxima concentración de biomasa}] - [\text{concentración de biomasa inicial}]}{(\text{Concentración de sustrato inicial}) - (\text{Concentración de sustrato inicial})} \text{Ecuación}$$

1.13

$$\frac{\Delta S}{\Delta t} = \frac{[S_f] - S_0}{(T_f) - (T_0)} = \frac{[S_{final}] - [S_{inicial}]}{(\text{Tiempo final}) - (\text{Tiempo inicial})} \text{Ecuación 1. 14}$$

X_{max} = Concentración máxima de biomasa

En la figura 13 se linealiza la ecuación de Monod.

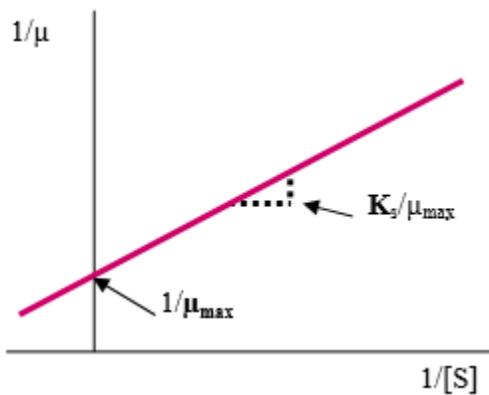


Figura 13. Método de linealización de la ecuación de Monod por la ecuación Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \text{Ecuación 1.15}$$

Dónde:

$$m = \frac{K_s}{\mu_{max}} \qquad b = \frac{1}{\mu_{max}}$$

La tabla 3 contiene los parámetros de la ecuación de Monod y Lineweaver- Burk, útiles para estimar el crecimiento microbiano de los sistemas en continuo y por lote.



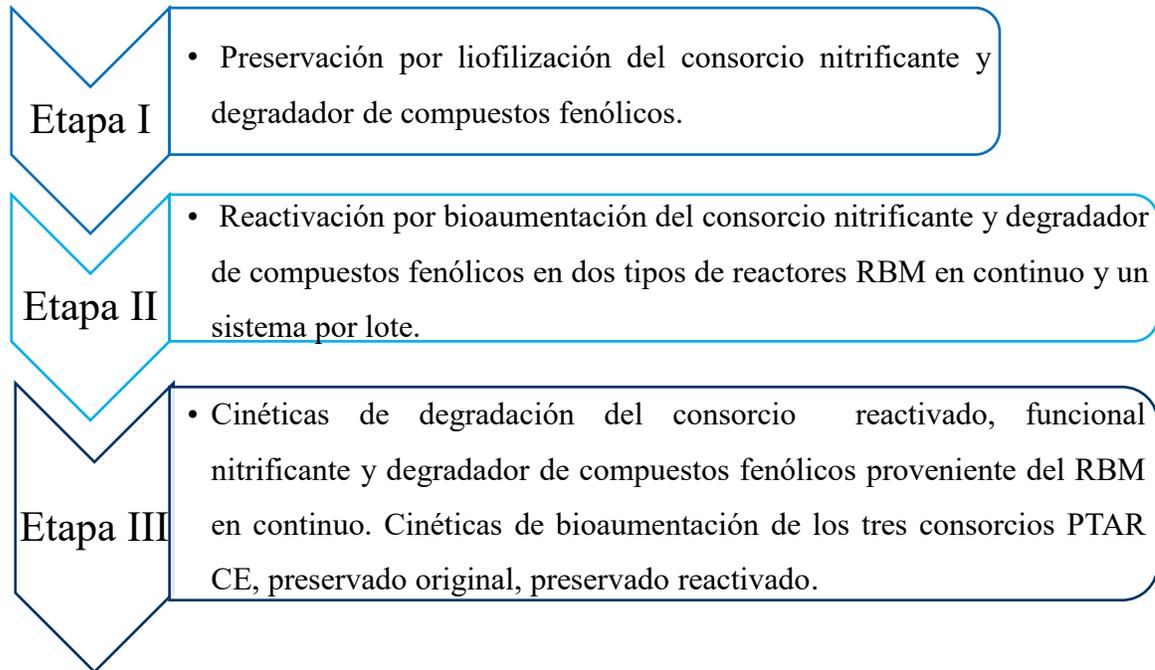
Tabla 3. Parámetros de la ecuación de Monod

Parámetro	Significado	unidades
X	Cantidad de células o biomasa al tiempo (t)	(mg/L)
μ	Es la velocidad específica de crecimiento celular por unidad de tiempo.	(t ⁻¹)
μ_{max}	Es la velocidad específica máxima de crecimiento	(t ⁻¹)
K _s	Es la constante específica de cada sustrato, a la que se producen microorganismos con una velocidad igual a la mitad de la velocidad específica de crecimiento máximo.	(mg/L)
Y	Constante de rendimiento del sustrato en producto.	$\frac{\text{g biomasa producida}}{\text{g sustrato consumido}}$
S	Concentración de sustrato limitante	(mg/L)



CAPÍTULO 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El presente trabajo se dividió en tres etapas de experimentación las cuales se enuncian a continuación y se describen detalladamente en cada apartado.



5.1 ETAPA I: Preservación por liofilización del consorcio nitrificante y degradador de compuestos fenólicos.

En esta etapa, se determinó la concentración de sólidos suspendidos totales dentro del reactor biológico de membrana que donó el consorcio para su posterior reactivación, ubicado en el laboratorio 303 del Conjunto E, Facultad de Química UNAM. Éste se encontraba operando a una concentración de fenoles totales de 60 mg/L y una concentración de nitrógeno amoniacal de 300 mg/L. Se obtuvo un resultado de SST= 7 000 mg/L y se extrajeron 500 mL de lodos activados para su posterior conservación. El reactor donador del consorcio, muestra las características descritas en las tablas 4 y 5.



Tabla 4. Condiciones físicas para la operación del reactor biológico de membrana donador del consorcio funcional.

Parámetro	Condición
Aireación	6 LPM
Figura	Cilíndrica
Flujo de alimentación	4 mL/ min
Oxígeno disuelto	5- mg/L O ₂
pH	8- 8.5 (este intervalo se mantiene con una disolución NaHCO ₃ (40g/L))
Temperatura	25°C
Tiempo de retención hidráulico (TRH)	21 horas

Tabla 5. Características de la membrana utilizada en el reactor biológico donador del consorcio para reactivación.

	Parámetro	Valor
Parámetros técnicos	Adhesivo	Epóxido
	Área de filtración	0.04 m ²
	Diámetro de membrana (interno/externo)	0.7/1.3 mm
	Estructura de poro	Poro esponjoso
	Forma de la membrana	Fibra hueca
	Material de la membrana	PVDF
	Tamaño de poro	0.1 μm
Condiciones de uso	Concentración máxima de cloro	200mg/L
	Contenido de grasa	< 2 mg/L
	Método de filtración	Interna/externa
	Presión	0.01-0.05 MPa
	Rango de pH	2-11
	Temperatura de operación	5-45°C



Después de ser extraídos los 500 mL de biomasa, se procedió a la conservación por liofilización del consorcio microbiano funcional.

En este método de preservación es necesario congelar la muestra, para después someterla a una cámara de vacío, lo que provocará su deshidratación, transfiriendo las moléculas de agua del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido, para esto se utilizan ciclos de congelación sublimación. Cabe mencionar que a pesar del proceso al cual se someten los microorganismos siguen conservando su misma estructura molecular.

Una vez que la muestra fue extraída del reactor, se somete a un equipo liofilizador, FREEZE DRY SYSTEM LYPH.LOCK 6. LABCONCO, el cual funciona con una presión de 0.018 mbar, con una temperatura de - 50°C.

Los 500 mL de lodos activados, fueron sometidos al proceso de liofilización, durante 14 días por un periodo de 4 horas diarias, cabe mencionar que pasaron sólo 18 horas para que la muestra alcanzara la temperatura de solidificación, el aspecto es un hielo grande (Figura 14), por tal motivo se procede a destrozarse el sólido en fracciones más pequeñas y de esta manera agilizar el proceso de liofilización. Al finalizar la operación se obtuvieron aproximadamente 3.5 g del consorcio microbiano funcional.

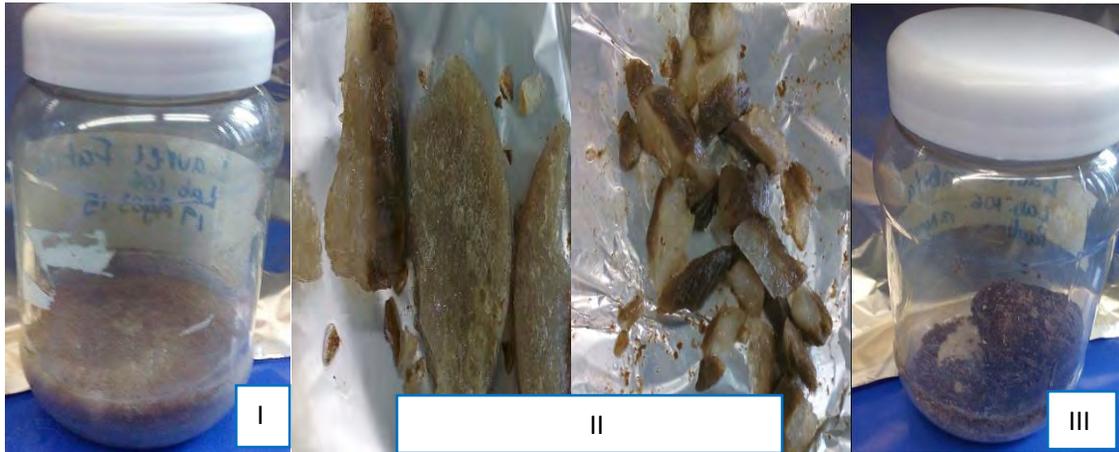


Figura 14. Sólido de biomasa formado durante el proceso de liofilización. I) Sólido después de 18 horas de liofilización; II) Consorcio fraccionado para acelerar el proceso de liofilización; III) Consorcio liofilizado después de 10 días.

Cabe mencionar que al cabo de 56 horas la muestra se deshidrató completamente, se obtuvo el consorcio pulverizado con el que se inocularon los reactores en la siguiente etapa experimental.

5.2 ETAPA II: Reactivación por bioaumentación del consorcio nitrificante y degradador de compuestos fenólicos en dos tipos de reactores RBM en continuo y un sistema por lote.

5.2.1 Construcción de los reactores biológicos

De membrana

Por lote

La tabla 6 muestra un diseño de experimentos para la etapa II, sobre el monitoreo analítico de los dos tipos de reactores.



Tabla 6. Diseño de experimentos que comprende la etapa II

Variables	Niveles		
VARIABLES INDEPENDIENTES: reactor	Reactor por lote	Reactor biológico de membrana en continuo	
VARIABLES INDEPENDIENTES: concentración de fenoles	36 mg/L mezcla de fenoles 150 mg/L de N-NH ₄ ⁺	36mg/L mezcla de fenoles 150 mg/L de N-NH ₄ ⁺	60 mg/L mezcla de fenoles 300 mg/L de N-NH ₄ ⁺
VARIABLES DEPENDIENTES O DE RESPUESTA	a) % Eficiencia de consumo de NH ₄ ⁺ (E _{NH4+}) b) % Eficiencia de producción de NO ₃ ⁻ (E _{NO3-}) c) % Eficiencia de consumo de fenoles (E _{fenoles totales}) d) Crecimiento microbiano medido como sólidos suspendidos volátiles (SSV, mg/L) y carbono orgánico total (COT)		

Se construyeron dos sistemas, uno de ellos con membrana en continuo, mismo que fue operado 196 días consecutivos, el otro fue un sistema por lote sin membrana, el cual se instaló 24 horas después que el anterior y estuvo monitoreado 173 días consecutivos. Así mismo se les dio un seguimiento analítico, atendiendo los siguientes parámetros; pH, sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV), determinación de carbono orgánico total (COT), degradación de una mezcla de fenoles totales (FT), degradación de nitrógeno amoniacal (N-NH₄⁺), determinación de la producción de nitratos (NO₃⁻) y nitritos (NO₂⁻), para esto se utilizan las técnicas analíticas descritas en la tabla 7.



Tabla 7. Técnicas analíticas

Parámetro	Normas Mexicanas	Método empleado	Equipo
pH	NMX-AA-008-SCFI-2000	Potenciométrico	Thermo SCIENTIFIC. ORION 2 STAR.
Nitrógeno amoniacal	NMX-AA-026-SCFI-2010	Titulométrico	Rapid Destilation UNIT LABCONCO
Nitratos	NMX-AA-082-1986	Espectrofotometría UV - Visible	Cary 50 SCAN. UV-Visible Spectrophotometer VARIAN
Nitritos	NMX-AA-154-SCFI-2011		
Fenoles totales	NMX-AA-050 SCFI - 2001		
Crecimiento microbiano			
Sólidos Suspendidos Totales (SST)	NMX-AA-034-SCFI-2001	Gravimetría:	Balanza: OHAUS, máxima capacidad 210 g
Sólidos Suspendidos volátiles (SSV)		Diferencia de peso, secado a 105°C	Probabilidad = 0.0001 g Estufa: Felisa Horno.
		Diferencia de peso, calcinación 550°C	Mufla: Barnstead Thermolyne 48000 Furnace.
Carbono orgánico total (COT)		Oxidación Térmica	SHIMADZU TOC-VCSN. TOTAL ORGANIC CARBON ANALYZER

El reactor en continuo fue inoculado y alimentado con una disolución sintética, que simula agua residual proveniente de la industria petroquímica con concentración de $N-NH_4^+$ igual a 150 mg/L y 36 mg/L de la mezcla de fenoles totales, después de 136 días la concentración de $N-NH_4^+$ correspondió a 300 mg/L y en el día 141 la concentración de la mezcla de fenoles totales se incrementó a 60 mg/L.



El reactor por lote fue operado por “ciclos de degradación”, cuando el sistema por lote iniciaba un ciclo nuevo la concentración de la solución sintética como influente correspondía a la concentración del primer día del ciclo.

Las características de los reactores son las que se muestran en las tablas 8 y 9 respectivamente.

Para la inoculación del reactor biológico de membrana se pesaron 0.1417g, de consorcio microbiano previamente liofilizado, para esta acción se considera la información establecida en el manual de procedimiento de reactivación de consorcios bacterianos comerciales, también se añadieron 1.5101g de fécula de maíz, marca maicena (Siegfried *et al*, 2007; Wang *et al*, 2002; García, 2012)

El reactor por lote fue inoculado con 0.1430g del consorcio microbiano y 1.5098g de fécula de maíz, marca maicena. Se emplea una media de nylon para “bloquear” el soporte que es empleado para empaquetar a las bacterias, logrando que las bacterias se reproduzcan en tiempo y forma por la adición de nutrientes al medio y no porque desde un principio fueron inoculadas en toda el área del reactor, logrando la alteración de la biomasa acumulada (García, 2012).

En ambos casos el consorcio y la fécula de maíz se pesaron independientemente, luego fueron mezclados respectivamente y contenidos en una media de nylon, a modo que se obtienen dos bolsas llamadas “cargas bacterianas”. La representación se aprecia con solidez en la figura 15.



Figura 15. Cargas bacterianas para la reactivación del consorcio microbiano funcional en reactor biológico de membrana y por lote.

Ahora se procede a inocular los reactores biológicos que darán seguimiento al experimento. El reactor biológico de membrana fue inoculado y puesto en operación el día 11 de noviembre de 2015, el sistema es un rectángulo de medida 20 cm x 10 cm x 40 cm y de material acrílico, la membrana fue colocada en la superficie del reactor sujeta a la tapa del mismo, la carga bacteriana se retiene a la pared del contenedor con alambre común, recubierto de cinta teflón y procurando que llegue al fondo del reactor, en donde ya se encuentra la piedra porosa que proporcionará la aireación a todo el sistema (figura 16), la disolución sintética se localiza en un tanque conectado a una bomba peristáltica, la que permite regular el flujo (4 mL/min) del sistema, se observa también un depósito que contiene la disolución amortiguadora, esta mantiene estable el pH, finalmente se observa el recipiente que recibe al efluente. Las características del RBM en continuo se ubican en la tabla 8.



Tabla 8. Condiciones físicas para la operación del reactor biológico de membrana (RBM), durante la reactivación del consorcio microbiano funcional.

Parámetro	Condición
Aireación	6 LPM
Figura	cubo
Flujo de alimentación	4 mL/ min
Oxígeno disuelto	5- mg/L O ₂
pH	8- 8.5 (este intervalo se mantiene con una disolución NaHCO ₃ (40g/L))
Temperatura	25°C
Tiempo de retención hidráulico (THR)	1250 minutos

Una vez montado el reactor, se da inicio a la operación, con una concentración inicial de 36 mg/L de la mezcla de fenoles totales (fenol, p-cresol, o-creso, 3,4 dimetilfenol y 3,5 dimetilfenol) y una concentración inicial de 150mg/L de nitrógeno amoniacal.

El reactor por lote fue montado e inoculado el día 12 de noviembre de 2015, fue operado en 13 ciclos para la remoción de N-NH₄⁺ y la mezcla de fenoles totales, la carga bacteriana del reactor por lote, fue sujeta a la pared del mismo con un alambre de hierro y recubierto con cinta teflón, con la precaución de que la media tocara la pared del fondo del contenedor (figura 17), a fin que la aireación sea homogénea en todo el sistema y el aumento de la biomasa se observe en un lapso de tiempo apropiado. Este sistema comparte las características básicas del RBM en continuo, sólo que no presenta membrana de ultrafiltración en su construcción. Cabe mencionar que las características físicas del sistema por lote se pueden observar en la tabla 9.



Tabla 9. Condiciones físicas para la operación del reactor biológico por lote, durante la reactivación del consorcio microbiano funcional.

Parámetro	Condición
Aireación	6 LPM
Figura	cubo
Oxígeno disuelto	5- mg/L O ₂
pH	8- 8.5 (este intervalo se mantiene con una disolución NaHCO ₃ (40g/L))
Temperatura	25°C
Tiempo de retención hidráulico (THR)	De 10 a 20 días.
Membrana	No contiene

La tabla 10 muestra, la información del tiempo de duración de los ciclos del reactor por lote y la concentración de fenoles totales y nitrógeno amoniacal que degradaron.

Tabla10. Etapas de duración del proceso por lote

Etapa	Tiempo (días)	[N-NH ₄ ⁺] mg/L	[Fenoles totales] mg/L
1	10	~150	~36
2	10	~150	~36
3	12	~150	~36
4	17	~150	~36
5	9	~150	~36
6	10	~150	~36
7	9	~150	~36
8	10	~150	~36
9	13	~150	~36
10	13	~150	~36
11	20	~300	~36
12	20	~300	~60
13	20	~300	~60

Elaboración propia, basada en resultados experimentales.

Como se observa en la tabla 10, se aumentó primero la concentración de nitrógeno amoniacal (ciclo 11), y posteriormente se aumentó la concentración de fenoles totales (ciclo

12). Esto con el objetivo de aumentar primero la concentración de un parámetro y después el otro, para que de este modo se exponga una mejor respuesta.

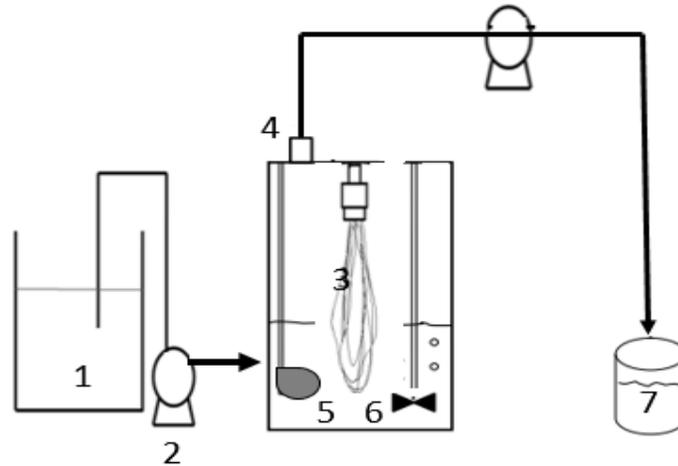


Figura 16. Reactor biológico de membrana usado en este experimento. 1) influente, 2) bomba peristáltica, 3) membrana de ultrafiltración, 4) disolución amortiguadora, 5) carga bacteriana, 6) agitador, 7) efluente.

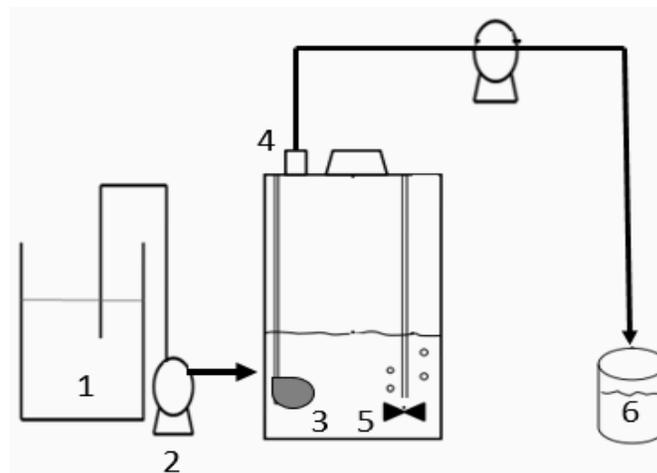


Figura 17. Reactor por lote usado en este experimento 1) influente, 2) bomba peristáltica, 3) carga bacteriana, 4) disolución amortiguadora, 5) agitador, 6) efluente.

En la página 53 se muestran imágenes reales, de la construcción de estos sistemas usados en este trabajo (Figuras 20 y 21).



5.4 ETAPA III. Cinéticas de degradación del consorcio reactivado, funcional nitrificante y degradador de compuestos fenólicos proveniente del RBM en continuo. Cinéticas de bioaumentación de los tres consorcios PTAR CE, preservado original, preservado reactivado

5.4.1 Cinéticas de degradación para el consorcio reactivado, nitrificante y degradador de compuestos fenólicos.

Las cinéticas de degradación se realizaron por duplicado y se utilizó el consorcio reactivado obtenido del RBM en continuo.

0. Se centrifugaron 330 mL de lodos activados, provenientes del reactor biológico de membrana sujeto a reactivación (Ver cálculos en el anexo 9.8), los lodos fueron centrifugados y lavados con NaCl 0.85 % con una frecuencia de 4 000 rpm; en un tiempo de 15 minutos.
1. El lodo centrifugado fue suspendido en un volumen de 600 mL de disolución sintética, de concentración 300 mg N-NH₄⁺/L más nutrientes (cuya composición se encuentra descrita en la tabla 11) y la concentración de la mezcla de fenoles totales 60 mg/L.
2. Para simular los reactores por lote se utilizaron recipientes de plástico de 1L, mismos que contenían piedras porosas en el fondo, a fin de que éste proporcione la aireación necesaria para todo el sistema; mientras que el aire fue suministrado con una bomba para pecera (Figura 18).
3. Se vertieron 300 mL de licor mezclado en cada reactor y después se añadieron 20 mL de bicarbonato de sodio (40 g/L) para controlar el pH en un intervalo de 8-8.5; obteniéndose un volumen total de operación de 320 mL.
4. Una vez dado inicio la reacción, se tomó la primera muestra (5 mL de lodos activados), a la cual se le determinaron los parámetros sólidos suspendidos totales y volátiles, concentración inicial de nitrógeno amoniacal, nitratos, nitritos y concentración inicial de la mezcla de fenoles.



5. Se tomó muestra cada hora, pero únicamente del sobrenadante, por lo que 5 minutos antes de cada muestra fue necesario retirar el difusor y dejar sedimentar el lodo.
6. Una vez que el sistema mostró un comportamiento constante en la concentración de fenoles totales y nitrógeno amoniacal o en su defecto, no se observó remoción de estos, se da por concluido el perfil de degradación y se toma una última muestra de 5 mL de la mezcla lo más homogénea posible, para determinar la concentración de sólidos suspendidos totales y volátiles del sistema. La cinética duró 31 horas.



Figura 18. Experimento cinéticas de degradación

5.4.2 Cinéticas de bioaugmentación

Se realizaron dos repeticiones de cada cinética de bioaugmentación, el experimento constó del montaje de tres reactores por corrida, de nombre (consorcio PTARCE, consorcio preservado original y consorcio preservado reactivado), se le dan estos nombres porque el primer consorcio fue adquirido de la Planta de tratamiento de aguas residuales cerro de la estrella (PTARCE), ubicada en Iztapalapa, Ciudad de México. El segundo consorcio es llamado “consorcio preservado original” porque pertenece al consorcio pulverizado obtenido del reactor biológico donante. Y finalmente se presenta el “consorcio preservado reactivado” éste fue extraído del reactor biológico de membrana sujeto a reactivación.



- 1) Se extrajeron 953 mL de lodos activados, provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales Cerro de la Estrella (PTARCE), ubicada en la Delegación Iztapalapa, Ciudad de México. Cabe mencionar que la concentración de sólidos suspendidos totales para estos microorganismos es de 5 190 mg/L.
- 2) Los microorganismos fueron centrifugados y posteriormente lavados con una disolución de cloruro de sodio 0.85%, durante 15 minutos y 4 000 rpm.
- 3) El lodo centrifugado fue suspendido en un volumen de 1 200 mL de disolución sintética, de concentración 300 mg NH_4^+ /L más nutrientes (cuya composición se encuentra descrita en la tabla 11) y la concentración de la mezcla de fenoles totales 60 mg/L.
- 4) Para simular los reactores por lote se utilizaron recipientes de plástico de 1L, mismos que contenían piedras porosas en el fondo las cuales proporcionan la aireación necesaria para todo el sistema (Figura 19); mientras que el aire fue suministrado con una bomba para pecera.
- 5) Se vertieron 400 mL de licor mezclado en cada uno de los tres reactores, después se añadieron 20 mL de bicarbonato de sodio (40 g/L) para controlar el pH en un intervalo de 8-8.5; finalmente se obtuvo un volumen de operación de 420 mL.
- 6) Una vez dado inicio la reacción, se tomó la primera muestra (5 mL de lodos activados), a la cual se le determinaron los parámetros sólidos suspendidos totales y volátiles, concentración inicial de nitrógeno amoniacal, nitratos, nitritos y concentración inicial de la mezcla de fenoles.
- 7) Se muestrea cada 60 minutos durante las primeras cuatro horas de la reacción, para observar paulatinamente el proceso de oxidación del sustrato principal (N-NH_4^+) y el inhibidor (mezcla de fenoles)

La manera en la que se toma la muestra es la siguiente:



- Apagar la bomba que proporciona el aire al sistema 5 minutos antes del muestreo, esto con el propósito que sedimente y así extraer la menor cantidad de lodos en la toma de muestra.
 - Tomar 5 mL del sobrenadante dentro del reactor y depositarlo en frascos vial para determinar los parámetros mencionados anteriormente exceptuando SST y SSV. El intervalo de muestreo se definió de acuerdo a la velocidad de degradación de cada sustrato, como parámetro adicional se determinó pH.
- 8) Una vez transcurridas las 4 horas de reacción en dos de los reactores, se procedió a la bioaumentación, dicho proceso consiste en adicionar un consorcio diferente a los lodos de planta que estaban previamente contenidos en cada uno de los reactores.
- Al primer reactor llamado “Consortio PTARCE” no se adicionó más cantidad de masa del consorcio, puesto que es considerado como experimento testigo en comparación con los otros dos.
 - Al segundo reactor llamado “Consortio preservado original” se añadió 1.0 g del consorcio liofilizado (polvo). La masa que se adicionó del consorcio preservado en la bioaumentación, es proporcional con la concentración de sólidos totales del consorcio proveniente de la planta.
 - Al tercer reactor se adicionó una pasta de microorganismos centrifugados, correspondiente al volumen de 66 mL del consorcio reactivado en el reactor biológico de membrana (El volumen de consorcio reactivado añadido es proporcional a la concentración de sólidos totales del consorcio proveniente de la planta. (Ver cálculos correspondientes en Anexo 9.9)

Al transcurrir las primeras 4 horas de la cinética, se da por concluida la cinética de degradación. Posteriormente, se comienza a monitorear la cinética de bioaumentación con este nuevo consorcio adicionado en cada caso.

Se tomó una muestra de 5 mL (sistema completamente homogéneo) a la cual se le determinaron sólidos suspendidos totales y volátiles además de los parámetros ya asistidos anteriormente.

- 9) La bioaumentación duró 28 horas y luego que el sistema mostró un comportamiento constante en la concentración de fenoles totales y nitrógeno amoniacal o en su caso no se observó remoción de éstos, concluye el perfil de degradación del sustrato y se toma una última muestra que permite conocer si hay crecimiento microbiano dentro de los reactores.



Figura 19. Experimento cinéticas de bioaumentación

Tabla 11. Composición de la disolución sintética con los nutrientes y el sustrato principal de amonio

Nombre del compuesto	Fórmula	Concentración		Nombre del compuesto	Fórmula	Concentración	
		(g/L)	(mM)			(g/L)	(mM)
cloruro de amonio	NH ₄ Cl						
Cloruro de sodio	NaCl	0.106	1.81	Sulfato de cobre II	CuSO ₄	0.166	0.07
Fosfato diácido de potasio	KH ₂ PO ₄	0.098	0.720	Sulfato de manganeso II	MnSO ₄	0.0113	0.077
Sulfato de magnesio II	MgSO ₄	0.024	0.199	Sulfato de hierro II	FeSO ₄	0.166	0.109

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA I: Preservación por liofilización del consorcio nitrificante y degradador de compuestos fenólicos.

En este trabajo fue posible la preservación del consorcio nitrificante funcional y degradador de compuestos fenólicos. La muestra se obtuvo como sólido pulverizado, después de 56 horas sometido a deshidratación como se puede apreciar en la figura 14 página (40). Esta aseveración se sustenta en los resultados presentados en la ETAPA II.



Figura 20. (a) (b)



Figura 21. (a) (b)

Figura 20 RBM en continuo (a) y sistema por lote (b), durante la instalación y Figura 21. RBM en continuo (a) y sistema por lote (b) al final de la operación (196 y 186 días) respectivamente.

En las figuras 20 y 21 se observan imágenes de los reactores biológicos de membrana en continuo y por lote el día de la construcción y último día de operación respectivamente, se nota cualitativamente la presencia de lodos activados, este hecho evidencia aumento de la biomasa durante la operación de cada reactor (Figuras 29 pàg (61) y 36 pàg (67)). Para llevar a cabo la etapa III los microorganismos con los que se realizaron las cinéticas de degradación y bioaumentación se obtuvieron del sistema RBM en continuo sujeto a



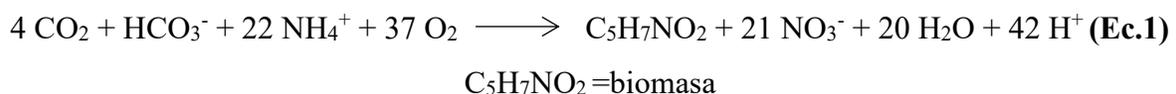
reactivación. El consorcio fue extraído cuando el reactor se encontraba a una concentración influente de 300 mg N-NH₄⁺ /L y 60 mg fenoles totales /L.

5.2 ETAPA II: Reactivación por bioaumentación del consorcio nitrificante y degradador de compuestos fenólicos en dos tipos de reactores RBM en continuo y un sistema por lote.

La etapa dos consistió en la reactivación de un consorcio bacteriano funcional en dos tipos de reactores biológicos. Se construyó y operó un sistema reactor biológico de membrana (RBM) en continuo, y un reactor por lote, a ambos se les determinó los parámetros analíticos contenidos en la tabla 7.

5.2.1 Reactor biológico de membrana (RBM) en continuo

En la figura 22 se muestra la determinación de valor de pH dentro del reactor, a lo largo de su funcionamiento. Cabe mencionar que el valor de pH óptimo para que se lleve a cabo la nitrificación debe oscilar entre los valores 8.0 y 8.5, esta gráfica nos muestra que en ocasiones este parámetro menguó a valores incluso muy bajos o ácidos, y por el contrario se observa que algunos días éste se disparó a valores más altos, propiciando alcalinidad en el medio y en consecuencia la volatilización del amoníaco en su estado natural (gas). Es importante señalar que el aumento o descenso de este parámetro se le atribuye a dos circunstancias, la primera: un exceso o falta de la disolución amortiguadora NaHCO₃ (~0.5 M) en el medio, y la segunda asocia a aspectos del proceso de nitrificación. Atendiendo la ecuación 1.



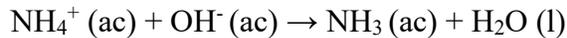
Esta ecuación considera que por cada mg/L de NH₄⁺ oxidado, se deriva una disminución de 7.14 mg/L de alcalinidad expresada como carbonato de calcio (CaCO₃), lo cual representa un descenso en el valor de pH (Metcalf, Eddy, 2003).

Durante la experimentación, lo anterior se comprende debido al exceso de bicarbonato de sodio en el medio, se estiman valores de pH altos, sin embargo esto no es lo que se



requería, puesto que esta acción presenta consecuencias en el proceso de nitrificación, la reacción de disociación del cloruro de amonio (NH_4Cl) es la siguiente:

$\text{NH}_4\text{Cl} (\text{ac}) \rightarrow \text{NH}_4^+ (\text{ac}) + \text{Cl}^- (\text{ac})$ como se observa, la sal se disocia completamente en estado acuoso, dando lugar a la formación del catión amonio el cual en contacto con agua se hidroliza, dando origen a la especie amoniaco.



El amoniaco en su forma natural es un gas, por tanto si el pH es igual a 9.4 o más el amoniaco se volatiliza y se va al ambiente sin pasar por el proceso de nitrificación, esto no sucede si el pH se mantiene en un intervalo entre 8 y 8.5 óptimo para bacterias nitrificantes, los microorganismos realizan el proceso de nitrificación y la especie amoniaco se oxida hasta la especie nitrato, nos damos cuenta que se está llevando a cabo el proceso, por la disminución del pH.

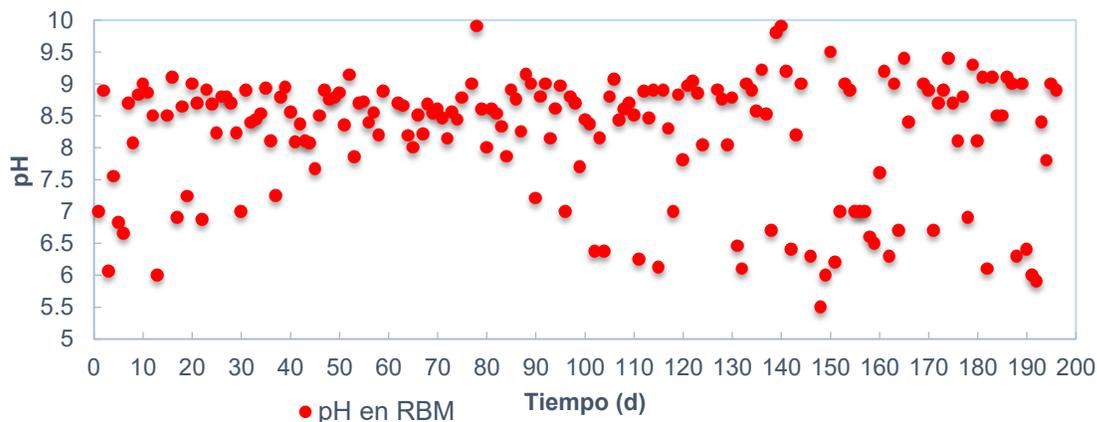


Figura 22. Determinación de pH en RBM

El reactor biológico de membrana operó 196 días consecutivos, en la figura 23 se aprecia que el reactor fue puesto en marcha con una concentración inicial de aproximadamente 36 mg fenoles totales/L; permaneció 140 días con esta concentración, obteniéndose una eficiencia de remoción de fenoles totales igual a 96%. En el día 141 de operación, la concentración se aumentó a 60 mg fenoles totales/L aproximadamente. El reactor persiste 57 días más con dicha concentración (casi el doble), logrando una eficiencia de remoción del 99% en un total de 196 días en operación, este fue el final de la operación.



En la figura 24 se aprecia gráficamente la eficiencia promedio obtenida al finalizar el experimento de degradación de la mezcla de fenoles totales siendo igual a $\%E_{\text{promedio}}=99\%$.

Para calcular el porcentaje de eficiencia promedio en el transcurso de operación del reactor biológico de membrana se utiliza la ecuación 4.1.

$$\%E_{\text{promedio}} = \frac{[\text{Concentración inicial}] - [\text{Concentración final}]}{[\text{Concentración inicial}]} * 100\% \quad \text{Ec. 4.1.}$$

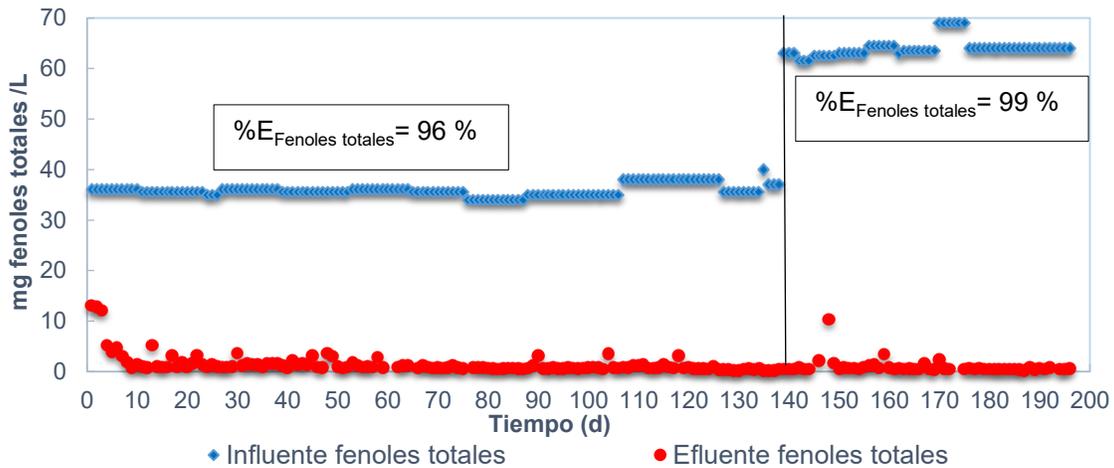


Figura 23. Determinación de degradación de la mezcla de fenoles totales en RBM

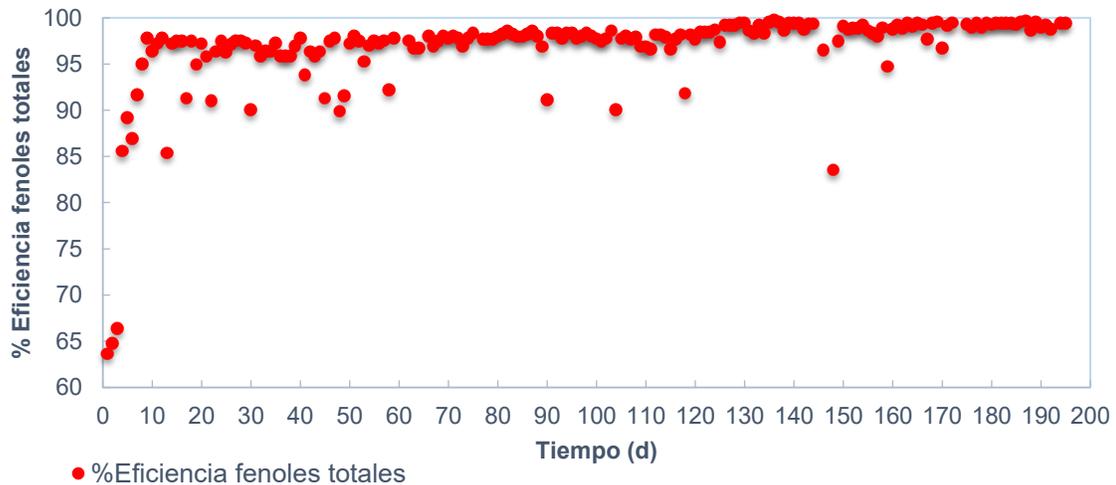


Figura 24. Determinación del porcentaje de Eficiencia promedio de degradación de la mezcla de fenoles en RBM.



En la figura 25 se aprecia la oxidación de nitrógeno amoniacal. El experimento se realizó en dos etapas, en la primera la concentración inicial fue de ~ 150 mg N-NH₄⁺ /L, esta concentración persiste 136 días obteniendo un %E_{N-NH₄⁺}=82%, en el día 137 la concentración de nitrógeno amoniacal se aumentó al doble es decir 300 mg/L y esta concentración permanece hasta el día que el reactor dejó de operar los cuales fueron 196 días, obteniendo un % E_{N-NH₄⁺}=90%.

Los microorganismos previamente liofilizados muestran la reactivación esperada, claramente se observa en la eficiencia promedio para la remoción de la mezcla de fenoles totales y nitrógeno amoniacal.

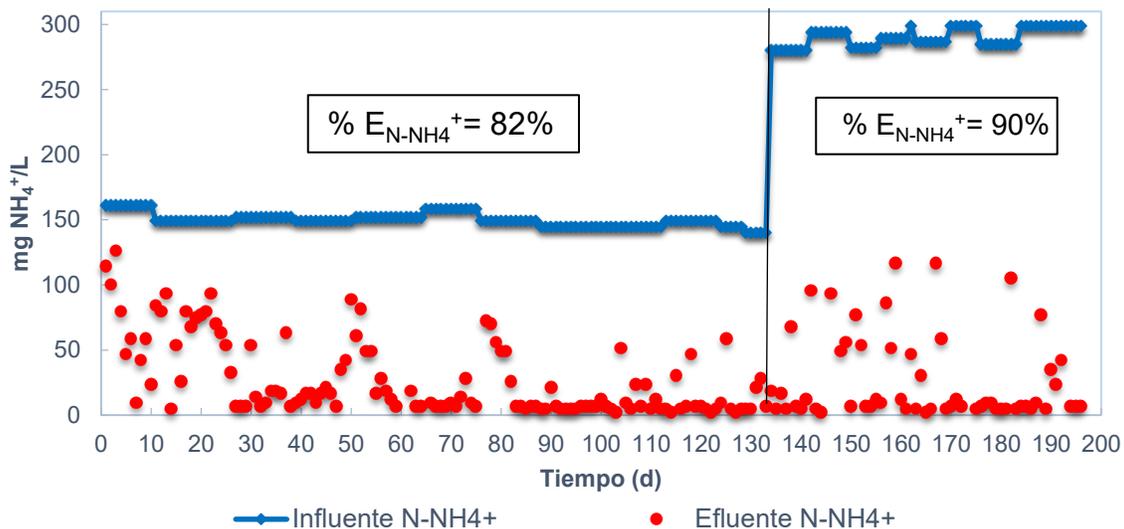


Figura 25. Nitrificación en presencia de compuestos fenólicos RBM

También se puede observar que a pesar de la presencia de compuestos fenólicos en el medio se llevó a cabo el proceso de nitrificación, este hecho se refuta en la figura 26, se observa que la producción de iones nitrato (NO₃⁻) va en aumento y la concentración de la especie nitrito (NO₂⁻) descende conforme la concentración de iones nitrato aumenta.

Como bien se ha mencionado anteriormente, el proceso de nitrificación se divide en dos etapas. En la figura 26 se observan experimentalmente cómo se lleva a cabo el proceso de



nitritación (a) y el proceso de nitratación (b). Estos procesos se pueden observar en la ecuación 2.



El proceso de nitritación (a) es la oxidación del ion amonio a nitrito y se lleva a cabo por un grupo de bacterias llamadas nitrosomonas, como se puede observar en la figura 26, cuando se determinó este parámetro por primera vez pasaron 44 días y la concentración de los mismos se encontraba alta (~120 a 40 mg/L) obteniendo un $\%E_{\text{N-NO}_2^-} = 58.06 \%$. Esto quiere decir que las bacterias nitrosomonas predominaban en el proceso oxidando la especie amonio a nitrito solamente. Para solucionar el problema se realizaron un par de experimentos para conocer la relación F/M hasta ese punto del reactor y se aumentó la oxigenación dentro del mismo. A medida que los microorganismos se aclimataron y conforme fue avanzando el tiempo la concentración de biomasa aumentó. Se observa que la concentración del anión nitrito disminuye paulatinamente y la de nitratos aumenta hasta una concentración de 290 mg/L aproximadamente, esto supone que las bacterias del género *Nitrobacter* han proliferado en el proceso de nitrificación.

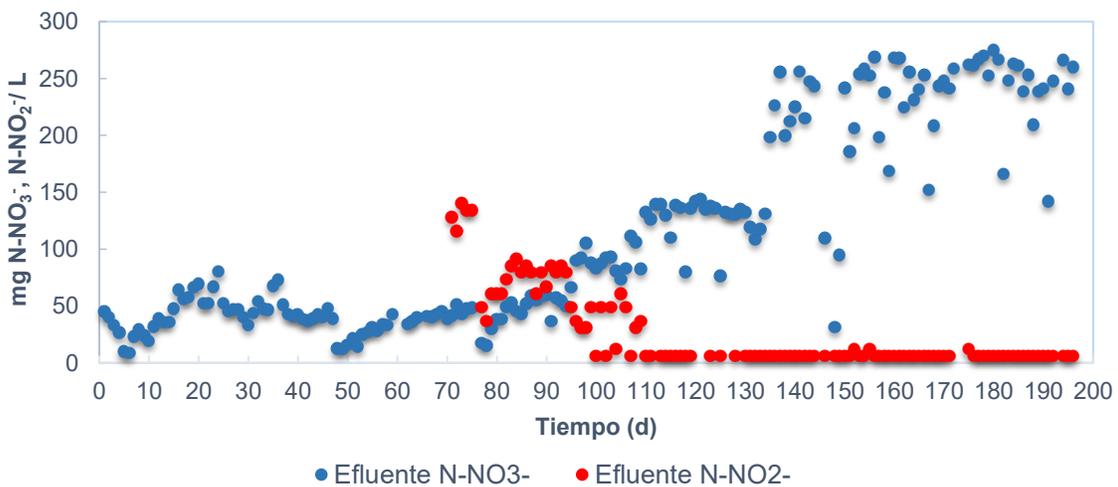


Figura 26. Continuación de nitrificación en presencia de compuestos fenólicos RBM



La figura 27 es una representación gráfica del porcentaje de eficiencia promedio al finalizar el experimento se obtuvo un $\%E_{\text{promedio}}=90\%$. Este dato muestra que la degradación de nitrógeno amoniacal fue eficiente, en el tiempo de operación, del reactor biológico de membrana en continuo.

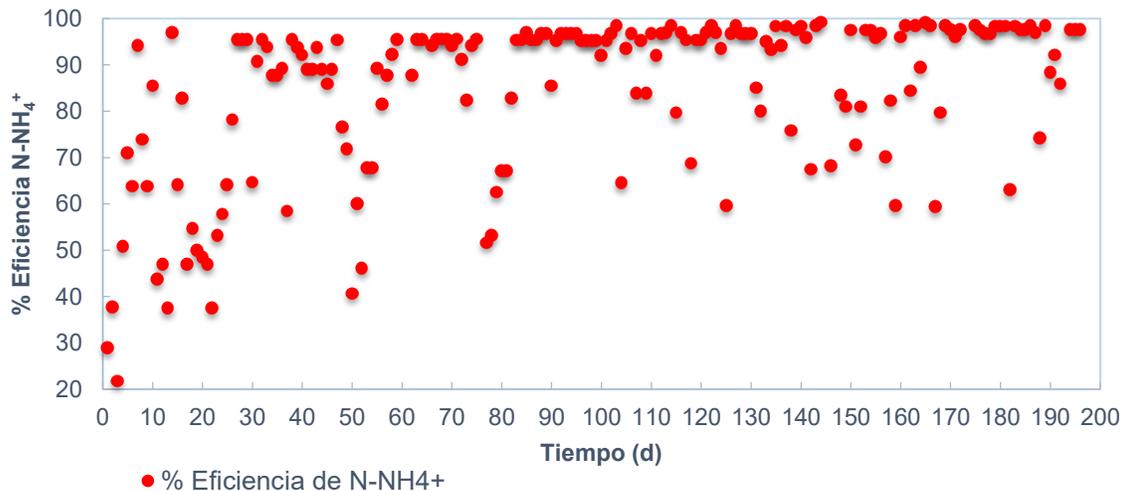


Figura 27. Determinación del porcentaje de Eficiencia promedio de degradación de la especie $N-NH_4^+$ en RBM

En la figura 28, se muestra la concentración de carbono orgánico total en la mezcla de fenoles totales, para esto se utilizó un analizador de carbono orgánico total (Shimadzu, TOC-V CSN), cuyo principio se basa en la absorción de radiación infrarroja que presenta el CO_2 para cuantificar el carbono orgánico de tal manera que el carbono inorgánico como en $NaHCO_3$ sea eliminado en forma de CO_2 en las muestras. (Silva, 2011).

Se aprecia que la concentración de carbono orgánico total inicial para la primera parte es de 33.5 mg/L, para la segunda parte aumentó la concentración de la mezcla de fenoles totales y por lo tanto la concentración de COT es de 48.09 mg COT/ L como influente, cabe mencionar que estos son valores promedio de las entradas determinadas de la disolución sintética que simula agua desfleada de la industria petrolera. Al finalizar el proceso de



nitrificación en presencia de compuestos fenólicos se obtuvo una concentración final de 6.04 mg COT /L.

Este parámetro fue determinado con el fin de observar la oxidación de la mezcla de fenoles (fenol; o-cresol; p-cresol; 3,4-dimetilfenol; 3,5-dimetilfenol), se asume la concentración inicial de 60 mg fenoles totales /L.

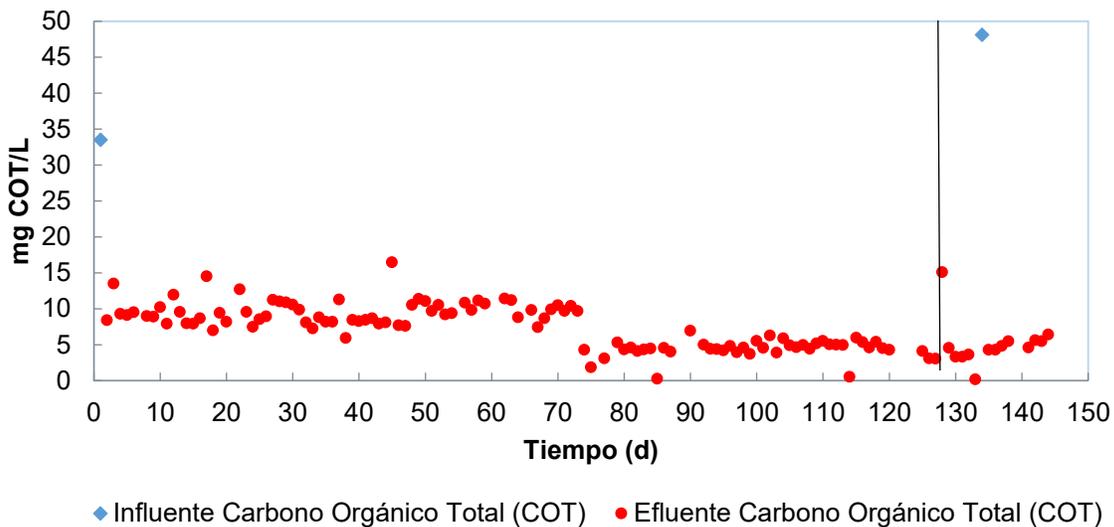


Figura 28. Determinación de carbono orgánico total (COT) en RBM

La figura 29 describe el crecimiento microbiano durante el proceso de operación del reactor biológico de membrana, el reactor se inoculó con una concentración inicial de SST=720 mg/L y de SSV= 440 mg /L. Estos parámetros se determinaron para observar la variación del crecimiento de la biomasa dentro del reactor a lo largo del experimento, el cual, al finalizar el tiempo de operación muestra un incremento en la concentración microorganismos de 4 560 mg/L para SST y 2 940 mg/L para SSV.

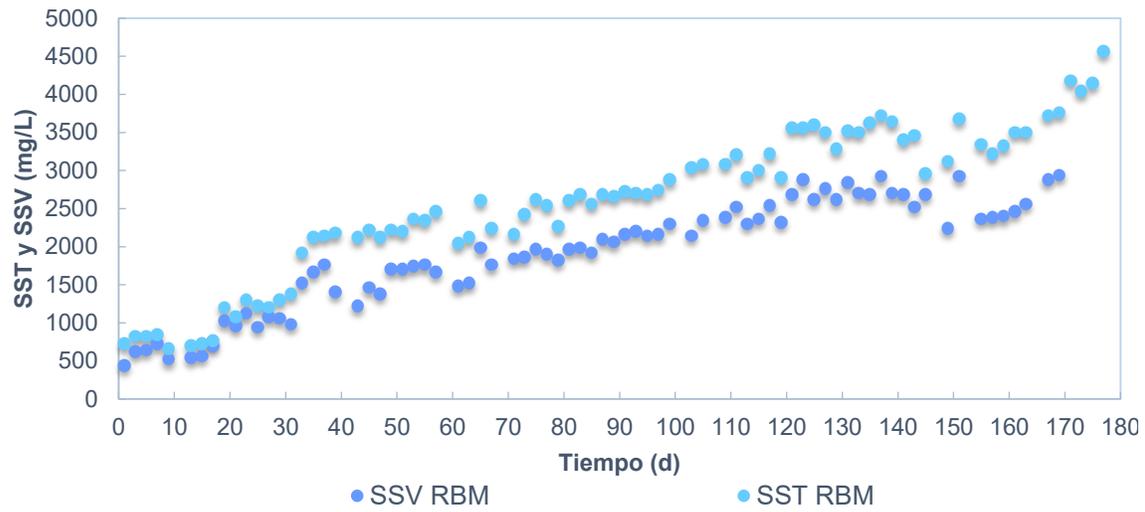


Figura 29. Determinación de sólidos suspendidos totales y volátiles en RBM.

5.2.2 Reactor por lote

El reactor por lote operó en 13 ciclos, de los cuales se determinaron los parámetros analíticos descritos en la tabla 7, cuyos resultados se dan a conocer a continuación:

La figura 30 muestra la variación de pH en el transcurso de la experimentación, este parámetro osciló en un intervalo entre 6 y 9.5. Cabe mencionar que el pH óptimo para que se lleve a cabo el proceso de nitrificación es de 8.0 a 8.5, por lo que un pH ácido interfiere con el proceso de nitrificación, así mismo un valor de pH alcalino, convierte el ion amonio en amoníaco y este es volatilizado en su forma natural (gas). Esta es la razón por la cual el nitrógeno amoniacal no era removido en su mayor totalidad y por ende la concentración de iones nitrato se muestra insuficiente.

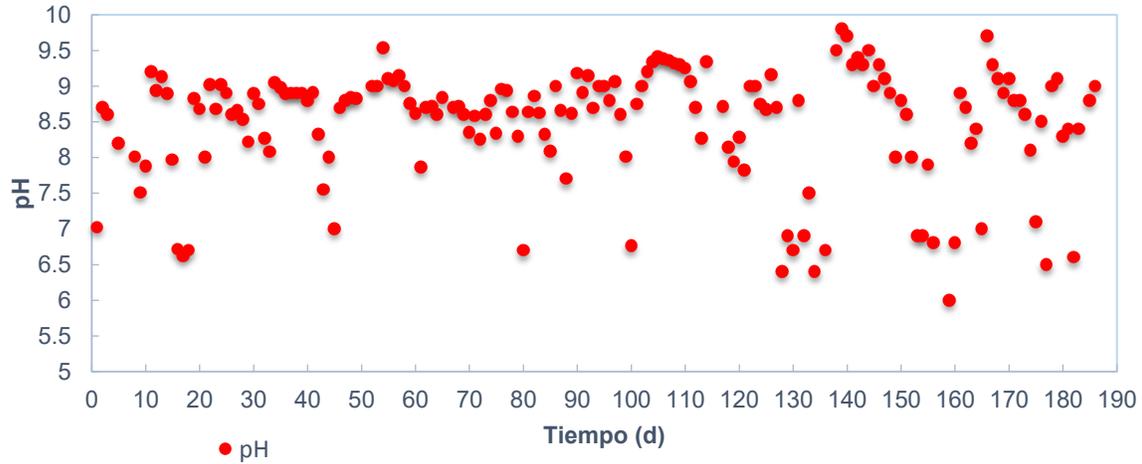


Figura 30. Determinación de pH en reactor Lote

En los trece ciclos que se operó el reactor biológico por lote se apreció la remoción casi completa de fenol (figura 31). Los primeros 11 ciclos de operación la concentración de fenoles totales fue de (~ 36 mg/L), obteniendo en el ciclo número once una eficiencia de 96% (figura 32), en los ciclos 12 y 13 la concentración de trabajo de la mezcla de fenoles fue (~ 60 mg/L) logrando 99.33% eficiencia al finalizar el experimento. Lo que quiere decir que el consorcio funcional contenido en el reactor por lote oxidó una concentración máxima de la mezcla de fenoles totales de 60 mg/L en 20 días.

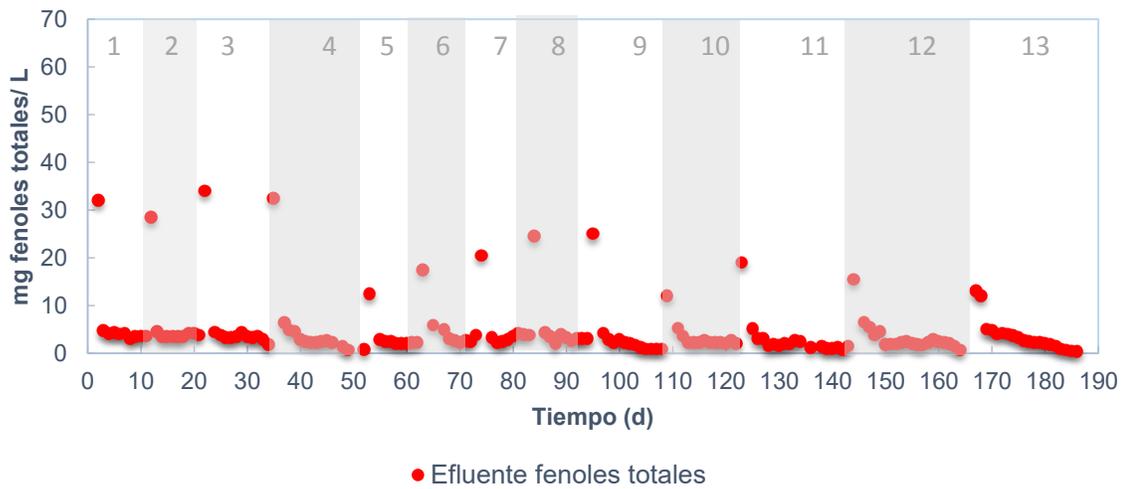


Figura 31. Determinación de degradación de la mezcla de fenoles en reactor Lote

La figura 32 muestra la determinación del porcentaje de eficiencia en el reactor por lote la eficiencia es calculada como eficiencia promedio en cada ciclo (Ec.4.1). Con base en este cálculo, se puede observar que las eficiencias de remoción se muestran por encima del 90%.

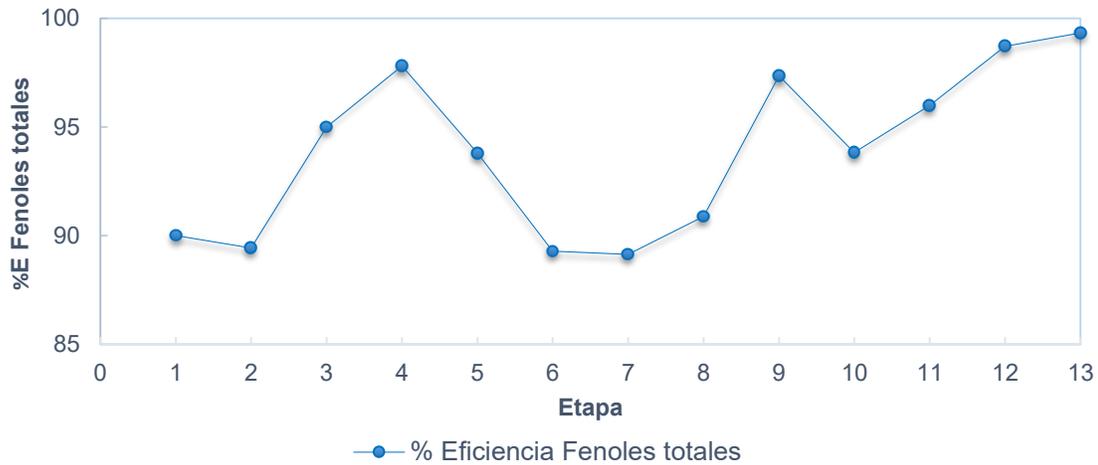


Figura 32. Determinación del porcentaje de Eficiencia de la mezcla de fenoles totales en reactor Lote

En la figura 33 se muestra la determinación de la degradación de nitrógeno amoniacal en los trece ciclos, se observa que en los primeros diez ciclos la remoción de nitrógeno amoniacal se llevó a cabo casi en su totalidad. También se muestra que la presencia de compuestos fenólicos no limita la oxidación del ion amonio en el proceso de nitrificación, se alcanzó un porcentaje de eficiencia de remoción de 93.54% (figura 35). En comparación con los diez ciclos anteriores el 11, 12 y 13 mostraron un porcentaje más alto (97.5, 97.2, 99.2 % respectivamente). Nótese que en el caso de la mezcla de fenoles totales la concentración se aumentó en los últimos dos ciclos, en este caso no fue así puesto que se aspiró monitorear primero el sustrato de mayor concentración presente en la disolución, posteriormente el segundo contaminante.

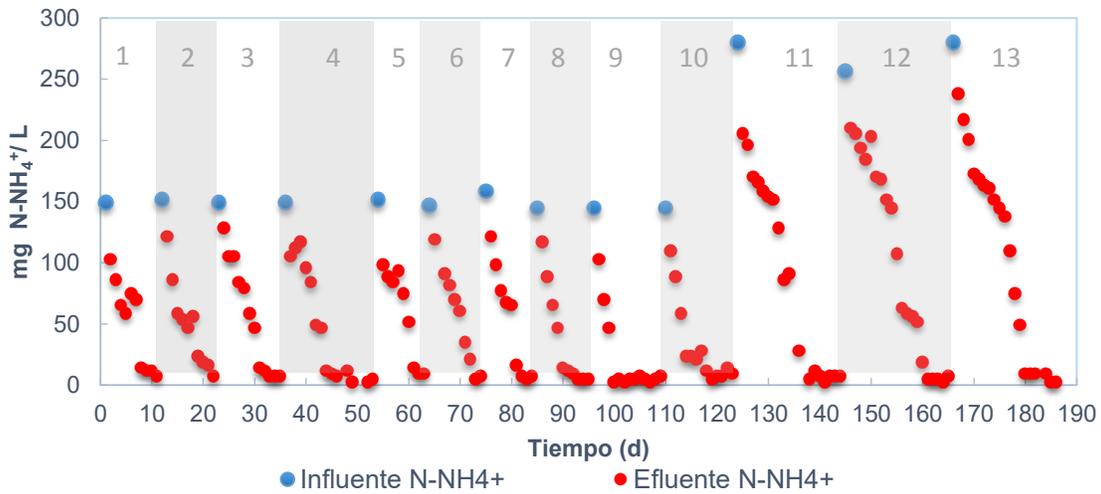


Figura 33. Nitrificación en presencia de compuestos fenólicos en reactor Lote

En cuanto a la producción de nitratos la figura 34 señala que en los primeros diez ciclos no hay un aumento considerable de iones nitrato, incluso, hasta antes del ciclo ocho se observa gran cantidad de iones nitrito. Para contrarrestar este problema se aumentó la aireación del sistema, a fin que a través del oxígeno suministrado, se complemente el proceso de nitrificación oxidando la especie nitrito hasta la especie nitrato; con esta mejora se observa un resultado eficaz y a partir del ciclo nueve la disminución de iones nitrito es notoria observándose un aumento considerable en la concentración de iones nitrato, alcanzando un máximo de 254.5 mg/L.

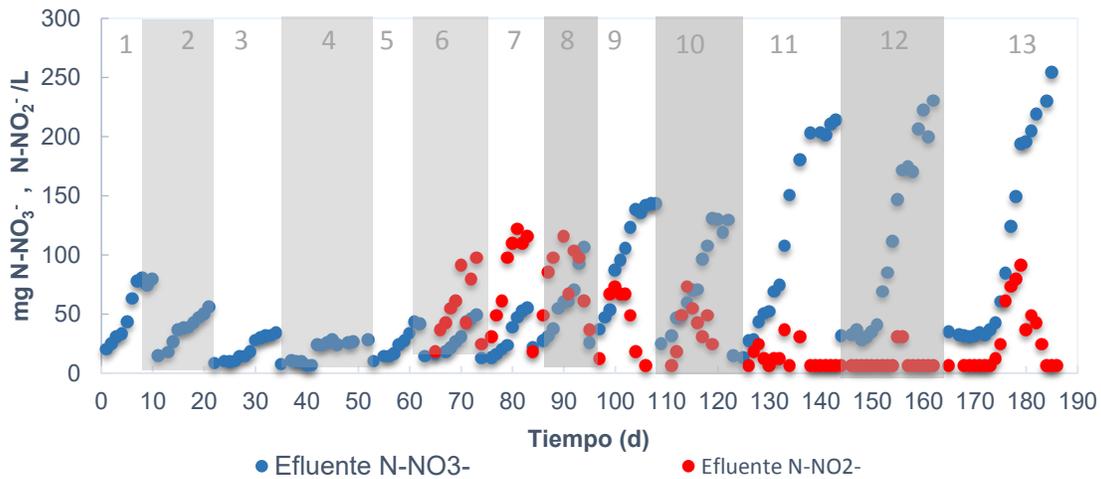


Figura 34. Continuación de nitrificación en presencia de compuestos fenólicos en reactor Lote

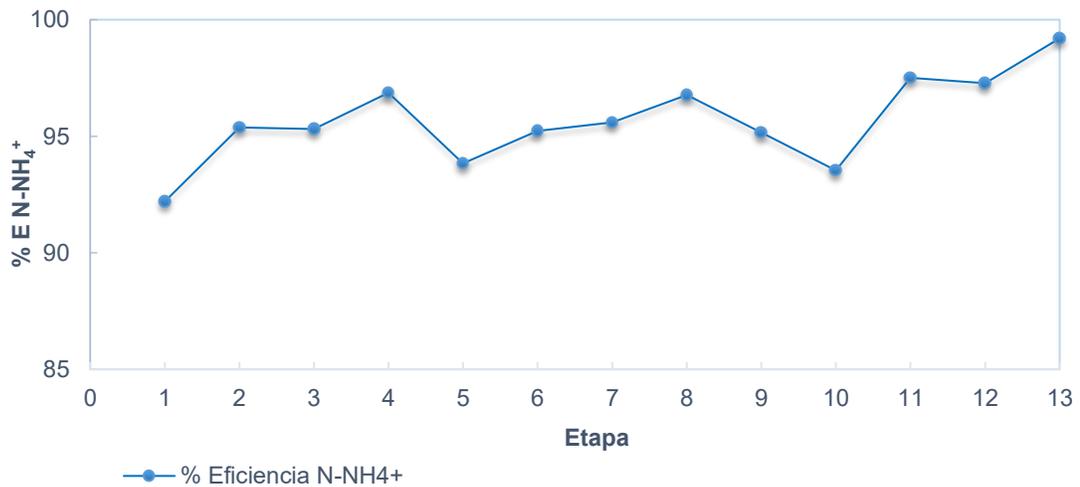


Figura 35. Determinación del porcentaje de Eficiencia de degradación de la mezcla de $N-NH_4^+$ en reactor Lote.

En la figura 36 se aprecia el aumento de crecimiento microbiano en el reactor lote, en los días de monitoreo. En el caso de los sólidos suspendidos totales se inició con una concentración de 300 mg/L y alcanzó una concentración de 1 180 mg/L al final de la operación. Así mismo para los sólidos suspendidos volátiles el incremento se reporta de la siguiente manera, 100 mg/L SSV a 960 mg/L SSV, hasta el final de la operación.

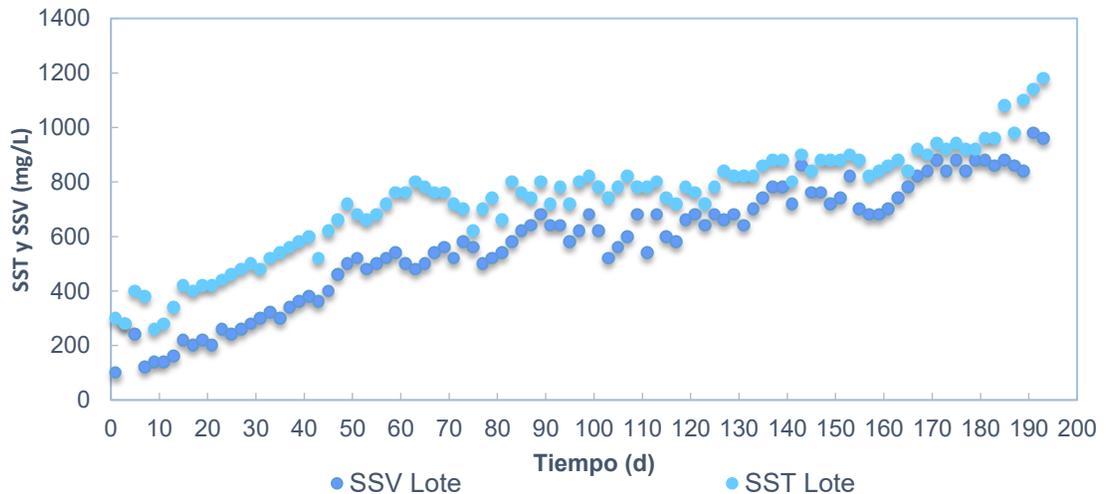


Figura 36. Determinación de sólidos suspendidos totales y volátiles en reactor Lote.

5.3 ETAPA III. Cinéticas de degradación del consorcio reactivado, funcional nitrificante y degradador de compuestos fenólicos proveniente del RBM en continuo. Cinéticas de bioaumentación de los tres consorcios PTAR CE, preservado original, preservado reactivado.

5.3.1 Cinéticas de degradación para el consorcio microbiano funcional de RBM en continuo sometido a reactivación

A continuación, se muestran los resultados estimados para referenciar el perfil cinético del reactor biológico de membrana en continuo, como se mencionó anteriormente el experimento se realizó por duplicado, los cálculos para realizar este tipo de cinéticas se observan detalladamente en el anexo 9.8

Los presentes son el promedio de ambos eventos. El perfil cinético de degradación se llevó a cabo en 31 horas. Durante el experimento se monitorearon los parámetros analíticos, pH, sólidos suspendidos totales y volátiles, degradación de nitrógeno amoniacal y fenoles totales. Es importante mencionar que las cinéticas de degradación son una especie de simulacro, para monitorear el comportamiento de los microorganismos antes de llevar a cabo la bioaumentación en experimentaciones posteriores.



En primer lugar, la figura 37, muestra la variación del pH en el transcurso del experimento. Durante el tiempo que duró la cinética, el pH se mantuvo entre 6 y 8.5, no obstante que durante algunas horas el pH estuvo bajo, los resultados de la nitrificación en presencia de compuestos fenólicos para esta experimentación se muestran favorecidos.

La figura 38 muestra el perfil de degradación de los contaminantes fenólicos. Se observa que de una concentración ~ 50 mg/ L, se alcanza una remoción casi en su totalidad. Los puntos fueron muestreados cada seis horas, mostrándose un avance en la reacción exitoso.

La figura 39 muestra la degradación de nitrógeno amoniacal con concentración de 300 mg/L, se puede observar claramente que en 31 horas el contaminante fue degradado a pesar de la presencia de compuestos fenólicos en el medio.

También se puede observar (Figura 40) que la nitrificación se lleva a cabo produciendo un máximo de 150 mg/L de N-NO_3^- ; la gráfica no muestra obtención de iones N-NO_2^- .

Finalmente, para este experimento se muestra notoriamente, el aumento de la biomasa (Figura 41), la cinética dio inicio con una concentración de sólidos suspendidos volátiles igual a 3 200 mg/L, los cuales aumentaron a 3 600 mg/L después de 31 horas que duró la cinética.

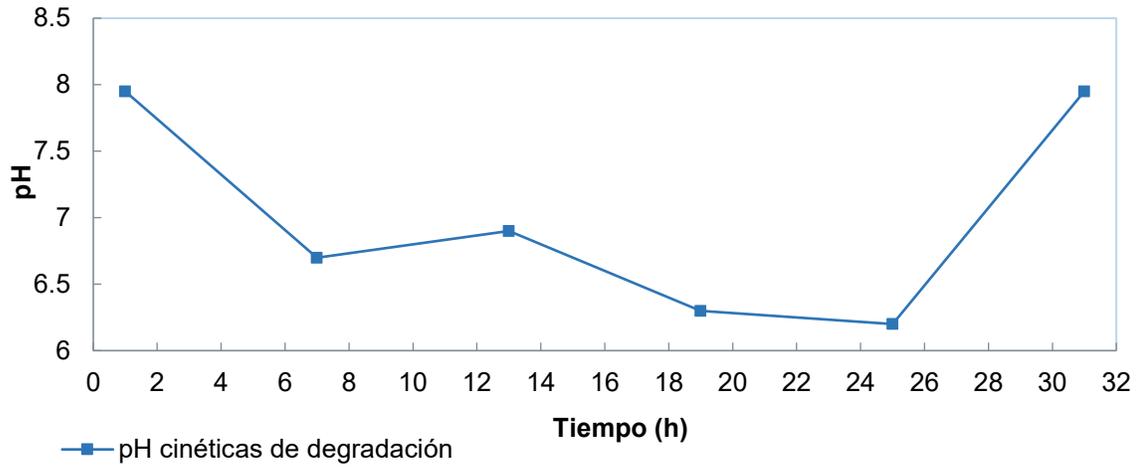


Figura 37. Determinación de pH en perfil cinético de degradación RBM.

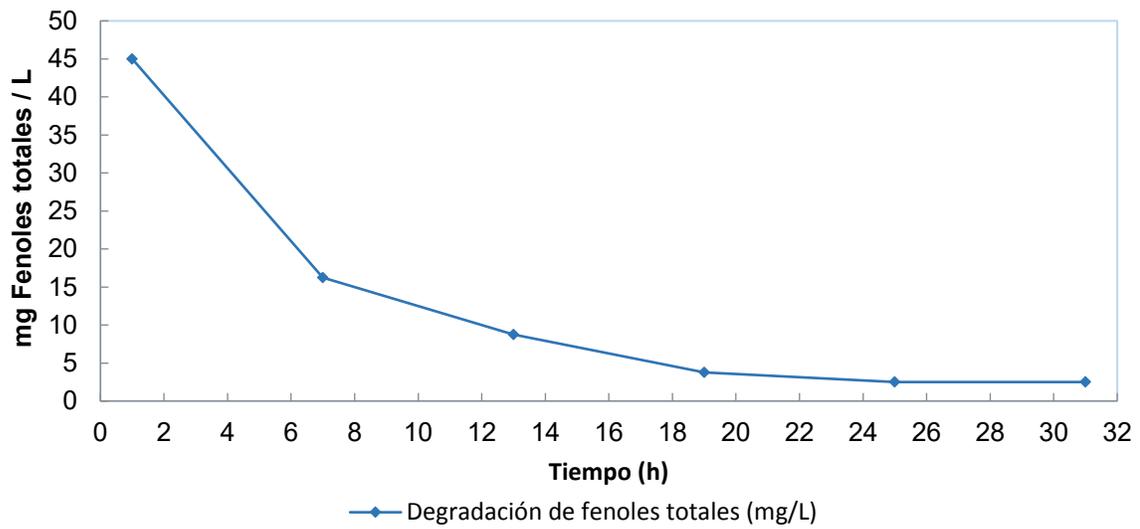


Figura 38. Determinación de degradación de fenoles totales en perfil cinético de degradación RBM

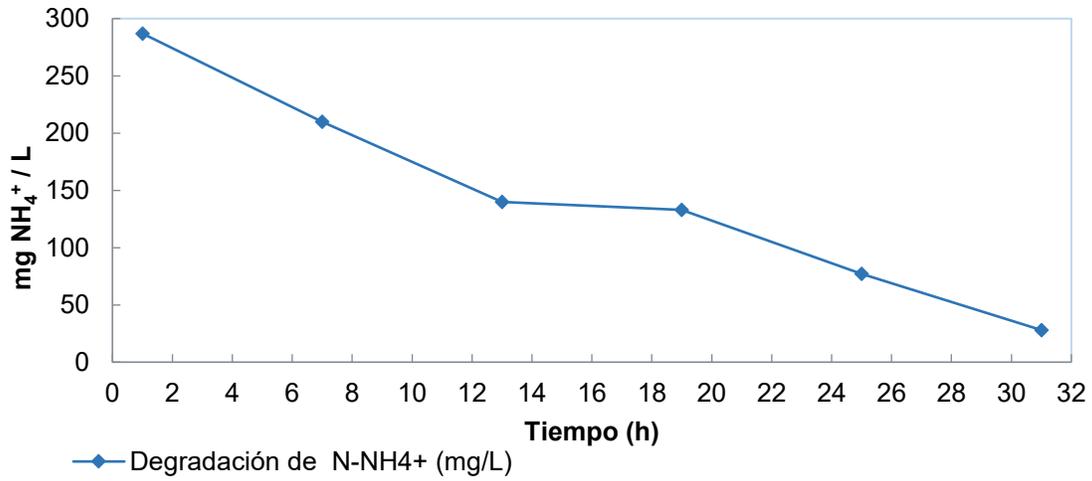


Figura 39. Perfil cinético de degradación de $N-NH_4^+$ en RBM

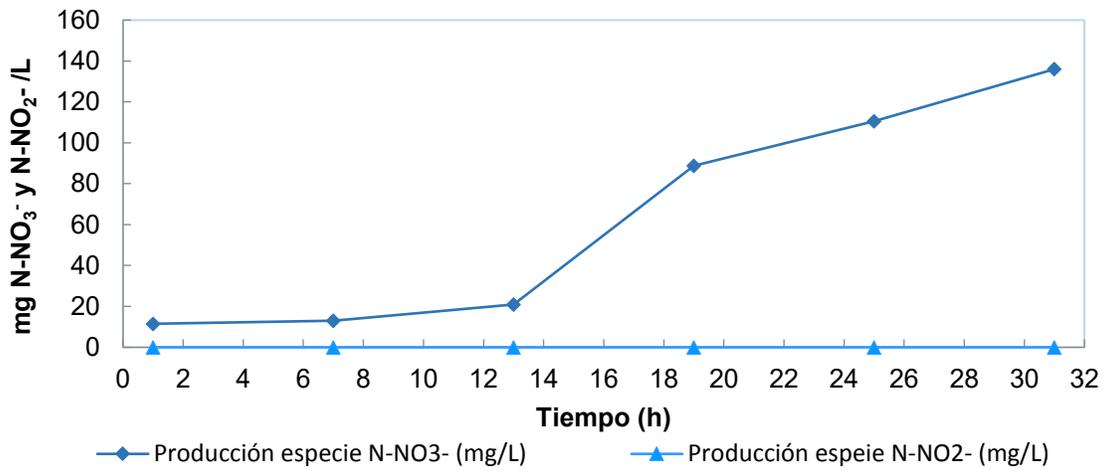


Figura 40. Oxidación de $N-NH_4^+$ a $N-NO_2^-$ a NO_3^- en perfil cinético RBM

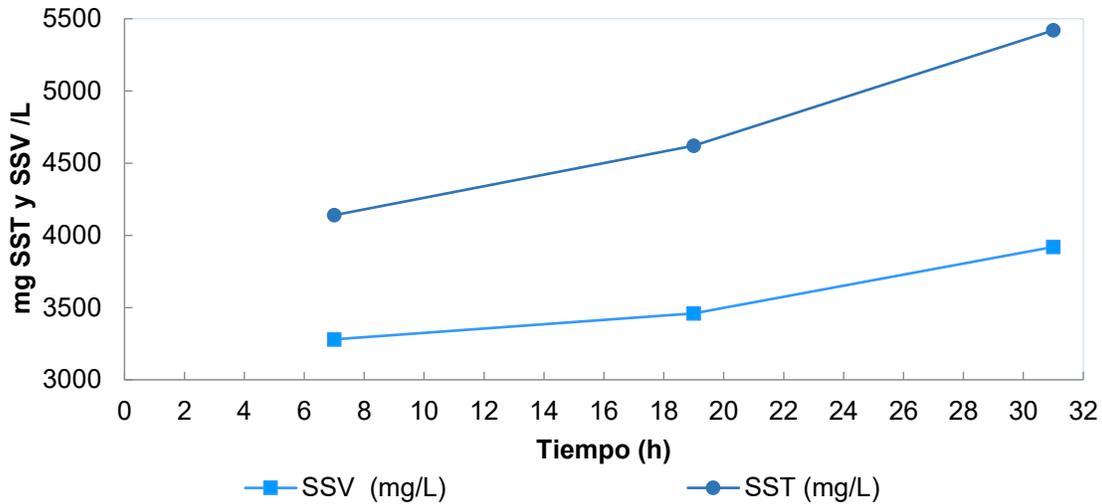


Figura 41. Determinación de sólidos suspendidos totales y volátiles en perfil cinético RBM

También se presenta el valor de μ para el consorcio sujeto a reactivación en este experimento ($\mu=0.0074$ mg/L*h), y el valor de K_s y μ_{max} para la mezcla de fenoles totales son (10.24 mg/L y 0.138 mg/L*h) respectivamente. Estos valores, son parámetros cinéticos.

5.3.2 Cinéticas de bioaumentación comparación entre los tres consorcios.

En el transcurso de este trabajo se han mostrado los resultados de la reactivación del consorcio nitrificante degradador de compuestos fenólicos, se han demostrado evidencias de la nitrificación aún en presencia de contaminantes tóxicos, también se menciona que se llevó a cabo un simulacro para observar los perfiles de degradación de los contaminantes principales en este estudio, es decir la mezcla de fenoles totales y el nitrógeno amoniacal, también se describe cómo actúan los microorganismos reactivados en este estudio.

Como se mencionó en un principio, también se realizaron cinéticas para observar el aumento de la biomasa, y los perfiles de degradación de los sustratos. En este apartado del capítulo se muestran los resultados comparativos de los tres consorcios estudiados 1) Consorcio PTAR CE, 2) Consorcio preservado original y 3) Consorcio preservado



reactivado. El primero es un consorcio activo obtenido de la Planta de Tratamiento de aguas residuales Cerro de la Estrella, ubicada en Iztapalapa, CDMX. El segundo consorcio se refiere al liofilizado, experto en llevar a cabo el proceso de nitrificación aún en presencia de compuestos fenólicos, obtenido directamente del reactor biológico de membrana aclimatado por la Candidata a Dra. Paulina Sarabia Bañuelos, cabe mencionar que este consorcio se utilizó en forma de polvo para todos los experimentos.

El consorcio preservado reactivado, es el que fue sometido a reactivación 196 días en un reactor biológico de membrana, para realizar las cinéticas, éste se utilizó centrifugado en apariencia de pasta lodosa, igual que el consorcio PTAR CE.

En este experimento se llevan a cabo dos tipos de cinéticas: Las primeras tres horas se lleva a cabo la cinética de degradación en cada uno de los reactores, la cinética da inicio con los lodos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales, a partir de la hora cuatro da inicio la cinética de bioaumentación, en este punto se agregan los consorcios a estudiar, es decir el consorcio preservado original y el preservado reactivado.

La figura 42, muestra la determinación de pH en todo el proceso cinético, para cada tipo de consorcio.

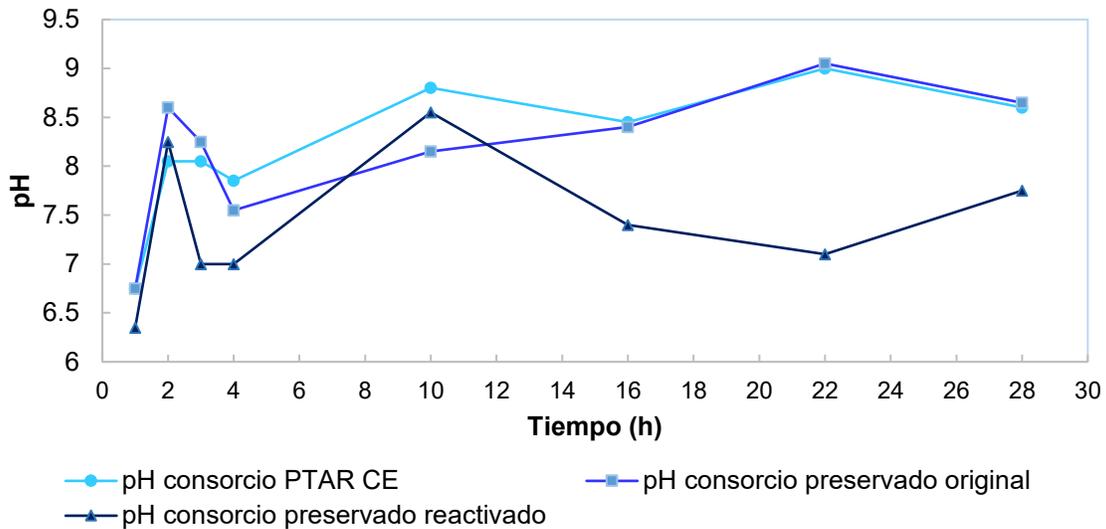


Figura 42. Determinación de pH en perfil cinético de bioaumentación.

El parámetro pH permaneció en el intervalo de 6 a 9. Es importante mencionar que las bacterias oxidantes de amonio (BOA) en este caso las del genero nitrosomonas presentan un mejor crecimiento en un intervalo de pH entre 5.8 y 8.5, en cambio las bacterias nitrito oxidantes (BNO) presentan mayor crecimiento entre 6.5 y 8.5. (Gieseke et al, 2006).

En la figura 43 se observan las curvas de crecimiento microbiano para los consorcios preservado original y preservado reactivado; así mismo se puede apreciar que el consorcio PTAR CE no presenta crecimiento microbiano, se observa la fase muerte desde la segunda hora de reacción, posteriormente se presenta la fase estacionaria, esta etapa permanece hasta la hora número 22 y después se observa la fase exponencial pero en menor concentración.

La curva de crecimiento para el consorcio preservado original exhibe que la fase de adaptación inicia desde el primer momento y permanece hasta la hora 16, después se observa la fase exponencial la cual refiere que los microorganismos están siendo alimentados con el sustrato correspondiente y existe duplicación celular, este evento se



muestra entre las horas 22 y 28 iniciando la fase estacionaria, la etapa endógena o muerte no se observa.

Para el caso del consorcio preservado reactivado no se aprecia la fase latencia debido a que ocurre muy rápidamente. La fase exponencial inicia junto con la bioaumentación (hora 4), luego ocurre la fase estacionaria y predomina hasta la hora número 22, en este último punto de la cinética se aprecia que surge nuevamente la fase exponencial, pero ahora en menor concentración; estudios realizados por (García, 2012) aseveran que a este último fenómeno se le denomina crecimiento críptico, se refiere a que los microorganismos deben metabolizar su propio protoplasma sin la reposición de éste, pues la concentración del sustrato disponible se encuentra al mínimo. En este caso ese sustrato limitante del cual se habla en la mezcla de fenoles totales.

Las curvas de crecimiento para los consorcios preservado original y preservado reactivado son similares, ambas inician con aproximadamente la misma concentración de sólidos suspendidos volátiles (2 700 y 2 680 mg/L), la curva referente al consorcio PTAR CE muestra una concentración de SSV=3 780 mg/L, es importante destacar que se realizaron los cálculos convenientes para que los tres consorcios comenzaran en una concentración similar de Sólidos suspendidos volátiles, ver anexo 9.9, las concentraciones finales de biomasa fueron 1 620 mg/L, 2 920 mg/L y 2 700 mg/L para el consorcio PTAR CE, preservado original y preservado reactivado respectivamente.

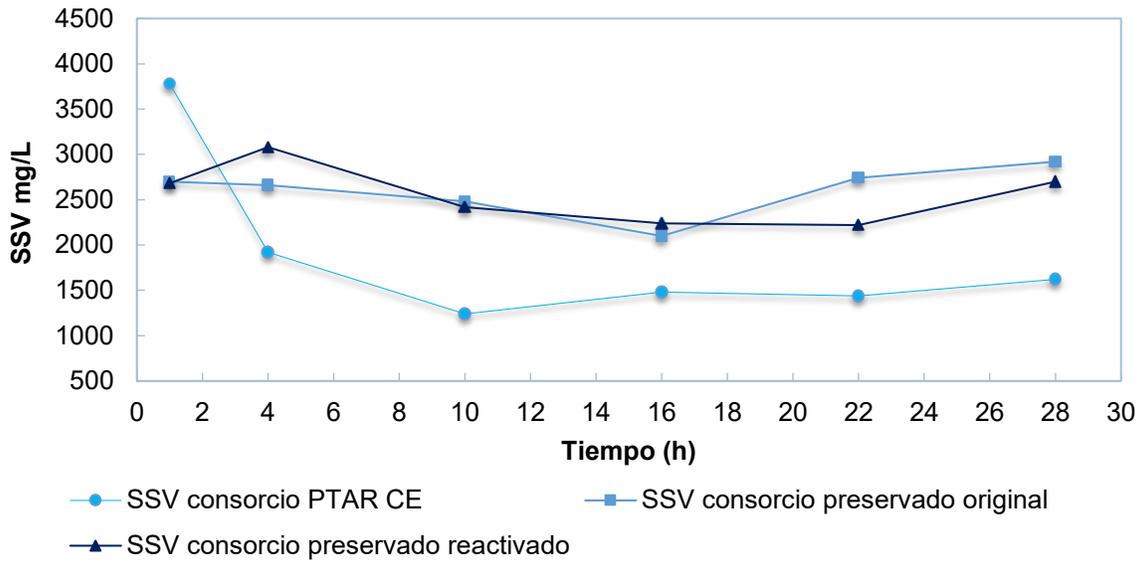


Figura 43. Determinación de sólidos suspendidos volátiles en perfil cinético de bioaumentación

La tabla 12 muestra los valores de la constante para la velocidad específica de crecimiento (μ) en cada tipo de consorcio.

Tabla 12. Velocidades específicas μ , para los consorcios bacterianos.

Consorcio microbiano	μ (mg/ L*h)
Consorcio preservado reactivado	0.0058
Consorcio preservado original	0.0048
Consorcio PTAR CE	0.0032

Los valores de tabla 12 fueron obtenidos utilizando la ecuación 1.6 a, se realiza la gráfica de Ln X vs t, en dicha ecuación $m = \mu$.

Los valores de esta tabla son calculados a partir de la cuarta hora, es el tiempo dónde comienza la bioaumentación.



Se observa que el consorcio preservado reactivado es el que presenta mayor crecimiento exponencial alcanzando un valor para ($\mu=0.0058$ mg/L*h), después está el consorcio preservado original ($\mu=0.0048$ mg/L*h) y finalmente el consorcio PTAR CE, que muestra un valor de ($\mu=0.0032$ mg/L*h).

La figura 44 muestra la determinación de degradación en la mezcla de fenoles totales para cada consorcio, se observa que los tres presentan un comportamiento similar.

Las eficiencias de remoción que presentan los consorcios se consideran buenas. Recordemos que para que un porcentaje de rendimiento o eficiencia de remoción se considere bueno, éste debe estar por encima del 80%. En este estudio los valores estimados para los consorcios preservado original, preservado reactivado y PTAR CE respectivamente son (91.30%, 91.30%, 86.97%). En el anexo 9.10, se muestra el análisis estadístico para estas muestras, utilizando el programa STATGRAPHICS CENTURION.

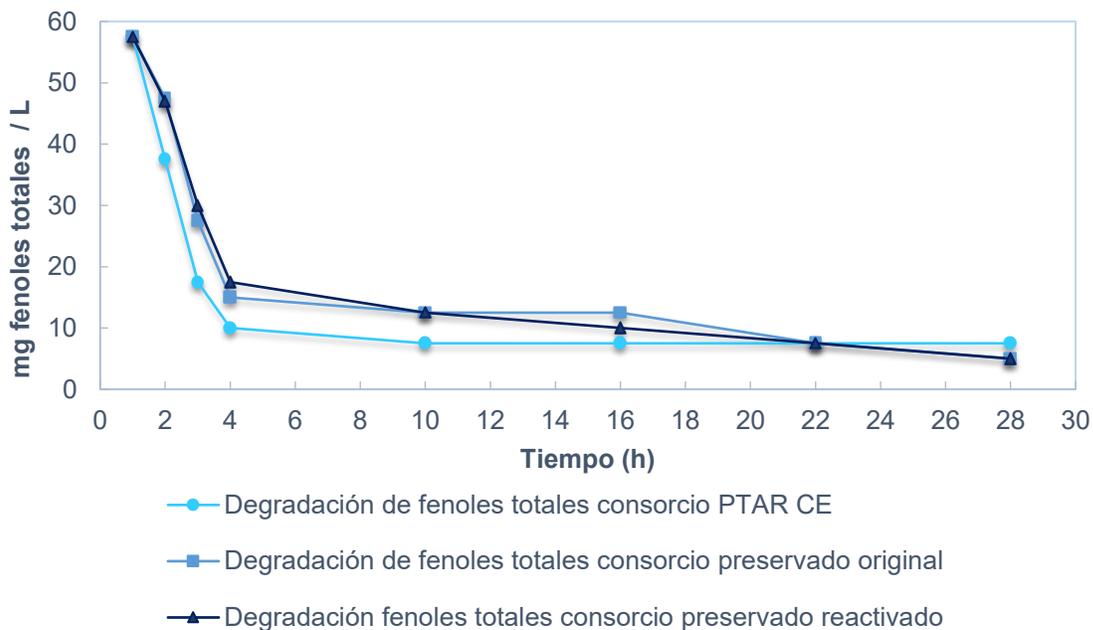


Figura 44. Determinación de degradación de fenoles totales en perfil cinético de bioaumentación



La figura 45 indica la degradación de nitrógeno amoniacal en cada uno de los tres consorcios el consorcio preservado original y el reactivado son semejantes en comportamiento, por el contrario, el PTAR CE está muy alejado de esa tendencia.

En el anexo 9.10 Se observa el análisis estadístico para saber si las muestras aquí representadas son significativas.

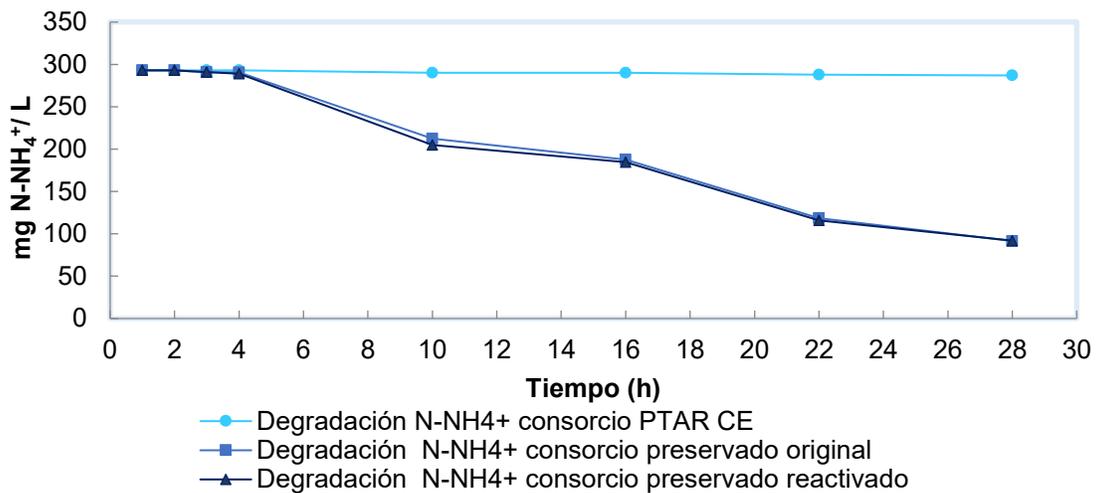


Figura 45. Determinación de la degradación de $N-NH_4^+$ en perfil cinético de bioaumentación

En las figuras 46 y 47 se muestra la producción de las especies nitritos y nitratos, se muestra claramente que la producción de nitratos fue mínima en los tres consorcios, y la producción de nitratos no alcanzó más allá de los 80 mg/L, esta razón se puede atribuir a 1) existió error experimental en el perfil cinético de degradación al momento de tomar la muestra y 2) el perfil cinético del sustrato nitrógeno amoniacal concluyó antes que la producción de $N-NO_3^-$ alcanzará la máxima concentración.

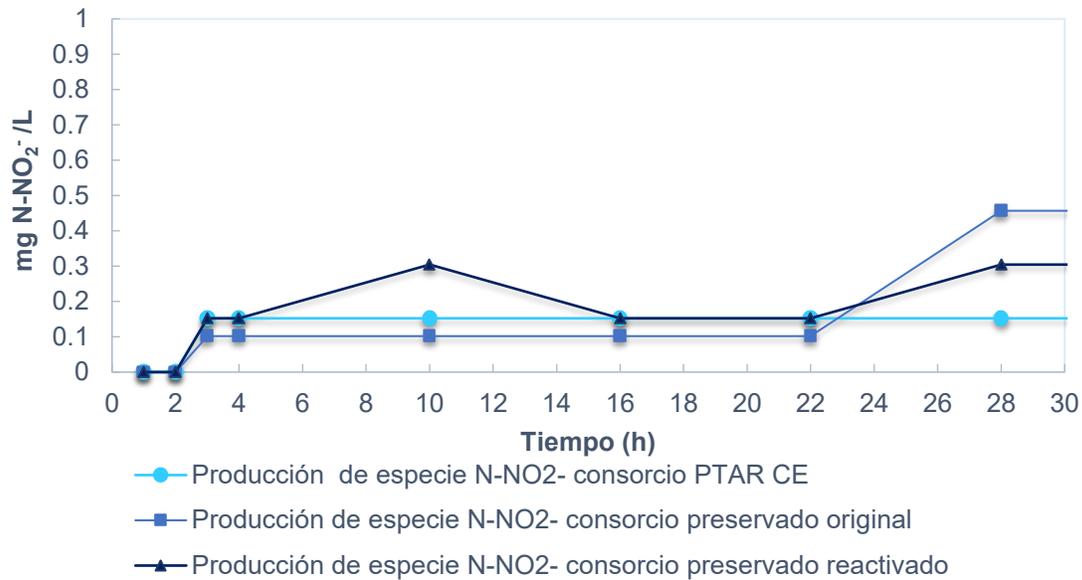


Figura 46. Nitrificación en presencia de compuestos fenólicos perfil cinético de bioaumentación

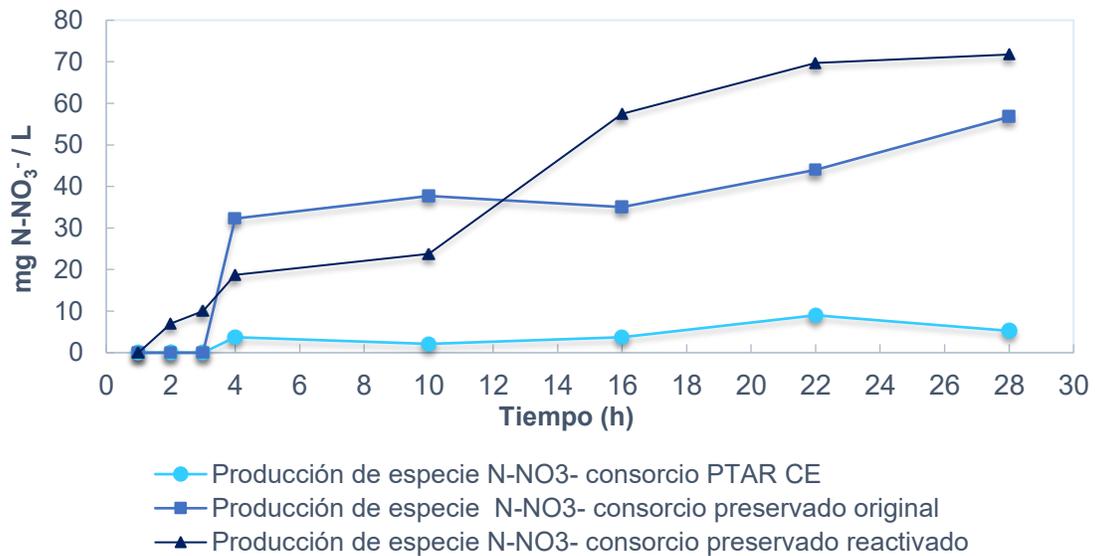


Figura 47. Nitrificación en presencia de compuestos fenólicos, perfil cinético de bioaumentación



Las figuras 48 y 49 respectivamente, muestran los datos obtenidos de los perfiles cinéticos de bioaumentación, para la degradación de la materia orgánica en el sistema. El experimento se realizó mediante la determinación de la degradación de la mezcla de fenoles totales y nitrógeno amoniacal tomando en cuenta los datos de la concentración de SSV, como una medida indirecta del crecimiento microbiano. Se determinaron las rapidezces específicas máximas de crecimiento (μ_{\max}) y las constantes de saturación o afinidad por el sustrato (K_s) a partir de la ecuación de Monod (1.6) y posteriormente se recurre a la ecuación 1.15 ($1/\mu$ vs $1/s$) para estimar los parámetros antes mencionados. Se utiliza el método de linealización Lineweaver-Burk, porque éste es el que presenta el coeficiente de determinación lineal (r^2) más cercano a 1 y predice la velocidad de reacción.

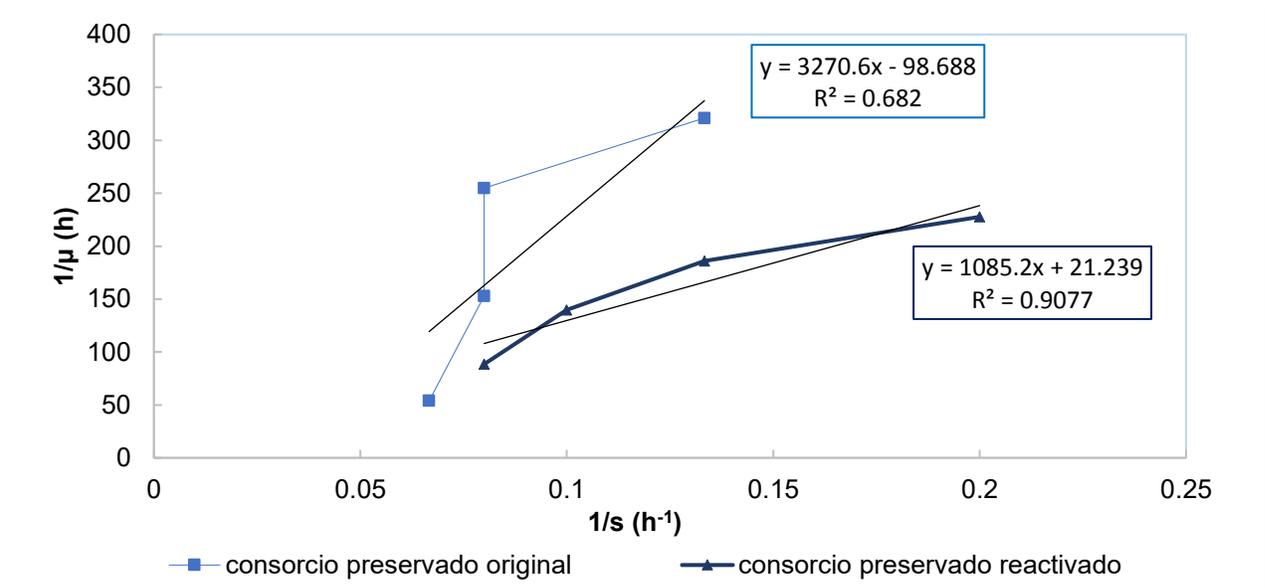


Figura 48. Ecuación de Lineweaver-Burk (SSV) para la mezcla de fenoles totales, en consorcios preservado original y preservado reactivado.

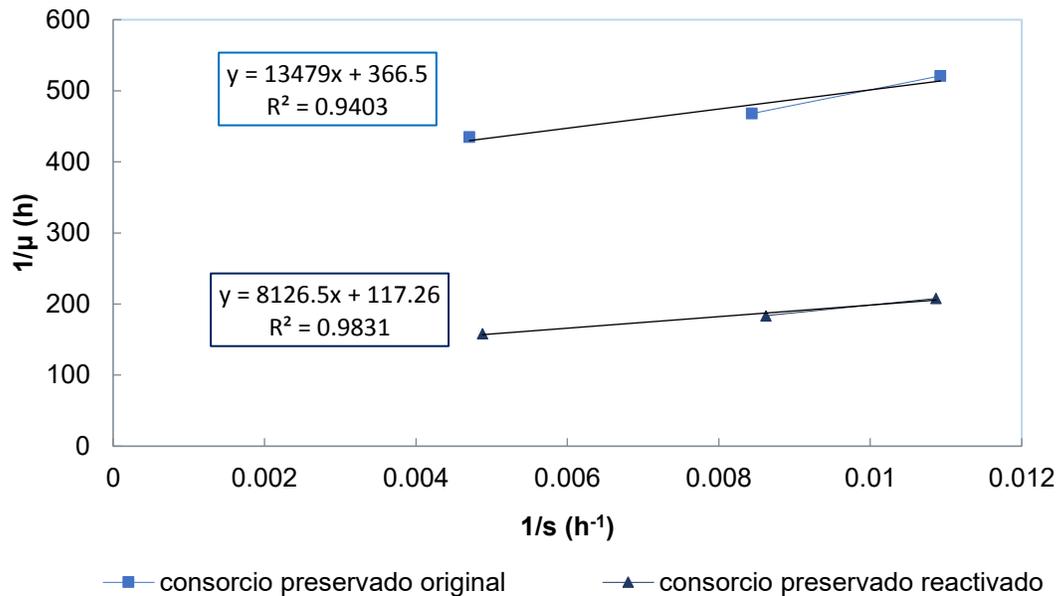


Figura 49. Ecuación de Lineweaver- Burk (SSV), para $N-NH_4^+$ en consorcios preservado original y preservado reactivado.

Es importante mencionar que en la figura 47 sólo se ilustran los resultados de los consorcios preservado original y preservado reactivado, el PTAR CE no se toma en cuenta puesto que no presentó bioaumentación de un consorcio diferente. Los resultados aquí presentes son obtenidos a partir de la cuarta hora de la cinética, porque fue en ese momento en que comenzó la bioaumentación.

En el caso de la figura 48 se toman en cuenta 3 valores del perfil cinético, debido a que es en este intervalo en el que el experimento tuvo un comportamiento lineal.

La tabla 13, muestra los porcentajes de remoción de los tres consorcios.

La tabla 14 concentra los valores cinéticos para (μ_{max} y k_s) estimados con el valor de sólidos suspendidos volátiles en el crecimiento microbiano, para las concentraciones de la mezcla de fenoles totales y nitrógeno amoniacal.



Tabla 13. Porcentaje de eficiencia de fenoles totales y $N-NH_4^+$ en los tres consorcios

Consortio Fenoles	concentración inicial [mg/L]	Concentración Final [mg/L]	% Eficiencia
PTAR CE	57.5	7.5	86.97%
Preservado original	57.5	5.0	91.30%
Preservado reactivado	57.5	5.0	91.30 %
Consortio $N-NH_4^+$	concentración inicial [mg/L]	Concentración Final [mg/L]	% Eficiencia
PTAR CE	293	290	1.02%
Preservado original	293	91.5	68.77%
Preservado reactivado	293	92	68.60%

Tabla 14. Parámetros cinéticos μ_{max} y K_s para SSV, en la degradación de la mezcla de fenoles totales y nitrógeno amoniacal.

Sólidos suspendidos volátiles (mg/L)	Parámetros cinéticos	
	μ_{max} (1/h)	K_s (mg/L)
Consortio	Fenoles totales	
Preservado original	0.0101	33.14
Preservado reactivado	0.04708	51.09
Consortio	Nitrógeno amoniacal	
Preservado original	0.0028	36.77
Preservado reactivado	0.0085	69.30

En el caso de la degradación de fenoles totales se aprecia, un % Eficiencia de degradación de 91.3% para los consorcios preservado original y preservado reactivado, como es notable, ambos consorcios presentan el mismo dato de degradación, sin embargo, el consorcio PO,



muestra un valor de $K_s=33.14$ mg/L y para el consorcio PR, se obtuvo un valor de $K_s=51.09$ mg/L. Con estos datos se aprecia que el consorcio preservado original muestra menor valor de constante de saturación, pero se obtiene una degradación buena, por lo tanto, se dice que ambos consorcios tienen afinidad por el sustrato, ya que es degradado casi en su totalidad.

Para el caso de nitrógeno amoniacal se muestran los porcentajes de degradación estimados en la tabla 13. Es posible percibir que el porcentaje de degradación para el consorcio PTAR CE, es muy bajo (1.02 %) con respecto al que muestran los consorcios PO y PR (91.3%), éstos últimos refieren más afinidad por el sustrato, es decir que degradan el nitrógeno amoniacal casi en su totalidad, los valores de K_s se muestran en la tabla 14.

También podemos apreciar los valores estimados de la tasa máxima de crecimiento específica (μ_{max}), en este caso es importante mencionar, que de los tres consorcios estudiados en esta etapa el que presentó mayor concentración de microorganismos fue el proveniente de la PTAR CE (3 780 mg/L), cabe resaltar que no se calcularon los valores de los parámetros cinéticos para este consorcio, porque a éste no se le añadió un consorcio adicional en la bioaumentación, en la figura 43 se aprecia cualitativamente esta afirmación.

Por otra parte, la tabla 14 contiene los datos de (μ_{max}) para el consorcio preservado original y el preservado reactivado los valores que presentan son (0.010 y 0.047 h^{-1}) respectivamente, estos valores muestran que el consorcio preservado reactivado obtuvo el máximo crecimiento específico para la concentración de sustrato, en este caso la mezcla de fenoles totales.

Para el caso del sustrato nitrógeno amoniacal, la tasa máxima de crecimiento específico adoptó el mismo comportamiento (tabla 14), el mayor valor de μ_{max} alcanzado es el del consorcio PR (0.0085 h^{-1}), seguido del consorcio PO (0.0028 h^{-1}), estos datos refutan lo anterior que el máximo crecimiento alcanzado entre estos dos consorcios le corresponde al consorcio preservado original, aunque ambos arrojan el mismo porcentaje de remoción.

Se observa que los consorcios de ambos experimentos son semejantes y realizan la operación a la par, no obstante que en uno de ellos el crecimiento bacteriano era más lento.

Por último, se puede observar que en todos los casos el valor de K_s fue mucho menor que la concentración del sustrato, por lo que se asume que el orden de las reacciones en ambos



consorcios es de primer orden, en las figuras 49 y 50 se muestran detalladamente los valores estimados.

5.3.2.1 Constantes de velocidad para la degradación de fenoles totales y nitrógeno amoniacal.

La figura 50 muestra los datos con los que se obtienen las constantes de velocidad de degradación de la concentración de nitrógeno amoniacal (k) haciendo uso de la ecuación para una cinética de primer orden $\ln[C]/[C_0] = -kt$, donde $[A]$ es la concentración descrita a un tiempo t .

Los valores de la constante de velocidad obtenidos experimentalmente son, 0.0003, 0.0442, 0.0444 (h^{-1}) para el consorcio PTAR CE, preservado original y preservado reactivado respectivamente. Lo que indica que el consorcio PTAR CE, es el que degrada el N-NH_4^+ más lentamente, ya que es el que presenta la menor k en comparación con los tres cultivos.

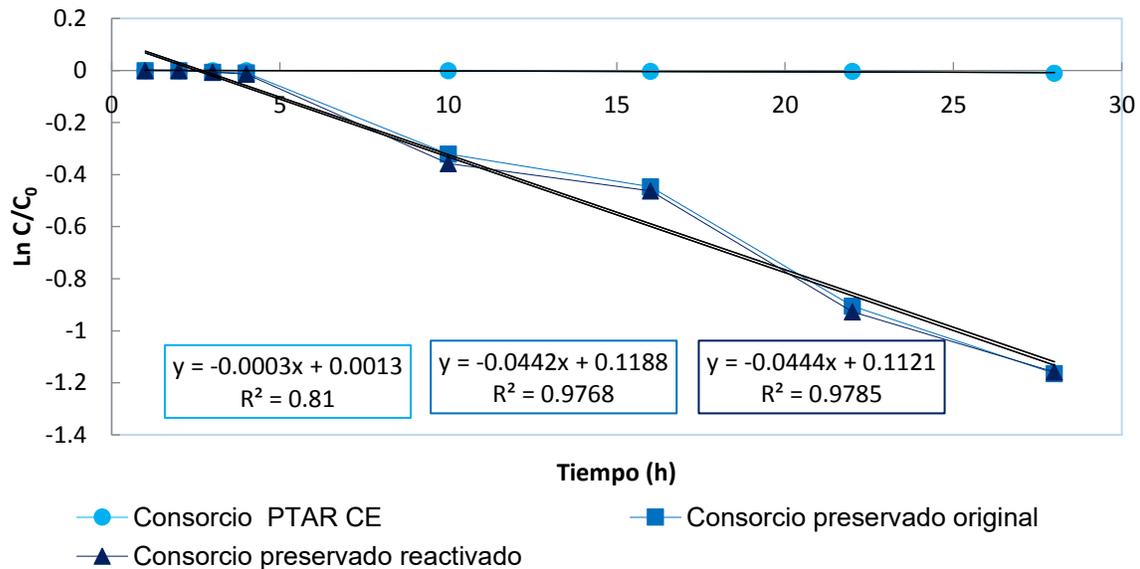


Figura 50. Cinéticas de degradación Consorcio PTAR CE, PO y PR. Nitrógeno amoniacal



De acuerdo con la figura 51 se observan las constantes de velocidad experimentales para la degradación de la mezcla de fenoles, (0.0582, 0,076 y 0.079), para el consorcio PTAR CE, PO y PR, respectivamente, como se puede apreciar el orden creciente de la constante de velocidad es el mismo que con el sustrato nitrógeno amoniacal, también es representado con una cinética de primer orden en su forma integrada siendo el consorcio PTAR CE el que degrada más lentamente la mezcla de fenoles totales.

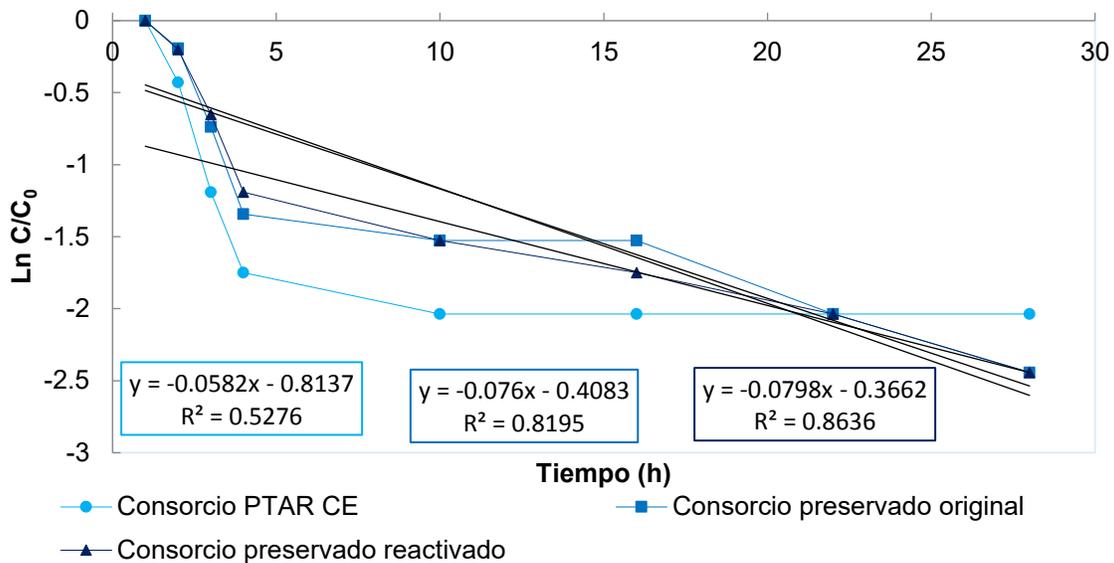


Figura 51. Cinéticas de degradación Consorcios PTAR CE, PO y PR. Mezcla de fenoles totales.



CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la preservación de un consorcio funcional nitrificante y degradador de compuestos fenólicos por el método de liofilización.

Se logró la reactivación del consorcio preservado por bioaumentación en dos tipos de reactores, un reactor biológico de membrana con operación en continuo y un sistema por lote sin membrana.

Fue posible reconocer el aumento de la biomasa con la evaluación de curvas de crecimiento microbiano mediante la cuantificación de sólidos suspendidos volátiles y la determinación de carbono orgánico total (COT), además de observar la degradación continua de una mezcla de fenoles.

Se cuantificó la concentración de nitrógeno amoniacal, con el fin de evaluar el consorcio microbiano sujeto a reactivación, para garantizar la eficiencia del método, a la comunidad microbiana le correspondía degradar ($300 \text{ mg N-NH}_4^+ / \text{L}$ y 60 mg mezcla de fenoles totales /L). Con la evaluación de la prueba analítica para observar la degradación de nitrógeno amoniacal se aprecian porcentajes de eficiencia de remoción mayores al 90%, que en términos químicos este valor se considera bueno y por lo tanto garantiza la eficiencia del proceso con el consorcio microbiano sujeto a reactivación.

Como se mencionó anteriormente el proceso de nitrificación se ve inhibido en presencia de compuestos fenólicos, sin embargo es importante destacar que en este experimento el consorcio microbiano a estudiar también degradó la mezcla de contaminantes aromáticos, logrando eficiencias de remoción mayores al 95%.

Se observa que las eficiencias de remoción de los contaminantes para el reactor biológico de membrana y el sistema por lote son muy similares, por lo que se concluye que no es necesario preservar el consorcio en un sistema por lote y después sembrarlo en otro, sino que es posible ahorrar el paso de aclimatación de los microorganismos en un sistema por lote y sembrar el consorcio directamente en el reactor en continuo.

Los perfiles cinéticos de degradación de los contaminantes muestran mayor afinidad al sustrato para el consorcio preservado original (PO), seguido del consorcio preservado reactivado (PR).



Finalmente se afirma que de los tres consorcios estudiados el PTAR CE fue el que presentó menor porcentaje de remoción para la concentración del N-NH_4^+ y la mezcla de fenoles totales, también es posible apreciar que los consorcios PO y PR muestran eficiencias de remoción muy semejantes entre sí, a pesar que este último no fue sometido al proceso de reactivación.



CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

Al-Khalid, T., El-Naas M (2012). Aerobic biodegradation of phenols. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42, 1631-1690.

ASTDR (2008) Toxicological profile for phenol. Agency for toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, pp 127-133.

Barrios, M.A., Barbot, E., Marrot, B., Moulin, P., Roche, N. (2006). Degradation of synthetyc phenol- containing wastewaters by MBR. *Journal of Membrane Science*, 281, 288-296.

Beristain, C. R., Texier, A.C., Razo, F.E., Méndez P. R. y Gómez J. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/ or S, by nitrification /denitrification. *Science and Bio/Technology*, 8, 325-342.

Bernet N. y Spérandio, M. (2009). Principles of nitrifying processes. En: *Environmental technologies to treat nitrogen pollution. London*, 23-39.

Camacho, C.C. (s.f). *Compuestos fenólicos y el medio ambiente*. Universidad de Matanzas, Cuba.

Camargo J.A y Alonso, A. (2007). Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. *Ecosistemas*, 2(16), 1-13.

Coelho A., Castro V A., Dezzoti M., Sant' Anna Jr. G. L. (2006). Treatment of petroleum refinery wastewater by advanced oxidation processes. *J. Hazard. Mater.* 137, 178-185.

Diya`uddeen, B.H; Wan Daud, W.M.A; Abdual, A.A.R. (2011). Treatment technologies for petroleum refineries effluents: *Process Safety and Environmental Protection*, 89: 95-105.

EPA (Environmental Protection Agency). 1987. Design manual: phosphorus removal. EPA 1625/1-87 1001. Cincinnati, OH, U.S.A.



- Figuerola E.L.M. y Erijman, L. (2010). Diversity of nitrifying in a full-scale petroleum refinery wastewater treatment plant experiencing unstable nitrification. *Journal of Hazardous Materials*, 181, 281-288.
- García L.M.D y Uruburu, F.F. (2001). La conservación de cepas microbianas. *Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)*, 1-5.
- García, F.R. (2012). *Tratamiento por bioaumentación en agua contaminada con hidrocarburos colectada en un terreno en rehabilitación*. Tesis para obtener el título de Maestro en Ingeniería Ambiental , Univeridad Nacional Autónoma de México, México.
- García, M.J.A. (2007). *Biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada*. Tesis para obtener el título de licenciado en Química , Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo .
- Gasperín, S. R. (2013). *Tratamiento de agua residual de una refinería de petróleo por medio de un reactor biológico de membrana*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ingeniería, UNAM, México.
- Ghasem D. Najafpour. (2007). *Biochemical Engineering and Biotechnology* (primera ed.).
- Gieseke, A.; Tarre, S.; Green M; de Beer D. (2006). Nitrification in a biofilm at low pH values: Role of in situ microenvironments and acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4283-4292.
- Gómez, B.S; M.Vivó; E.Soria. (2001). Pruebas de significación bioestadística. *Diagnóstico biológico*, 50(4).
- Halbinger, C., Ramírez, Z.R.M., Durán, M.A. (2002). *Eliminación de amoniaco en aguas residuales clarificadas por el proceso de intercambio iónico con zeolitas*. Instituto de ingeniería, UNAM. Ciudad Universitaria , México.



Hernández S.D. y Loaiza C, A.S. (2014). *Selección de un método para la conservación y preservación de actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Anteproyecto de Trabajo final para obtener el grado de Tecnóloga Química , Universidad tecnológica de Pereira .

Holt, J.G; Krieg N.R; Sneath P.A.; Stanley J.T y Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacterology*. (9na ed.). Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins. .

Ishak, S., Malakahmad, A., Isa, M H. (2012). Refinery wastewater biological treatment: A short review. *Journal of Scientific & Industrial Research*(71), 251-256.

Jiménez, D.E. (2010). Modelación matemática del proceso de nitrificación en dos etapas. Desarrollo de metodologías de calibración del modelo para un reactor SHARON y un proceso de fangos activados. Tesis para obtener el título de Doctor en ingeniería hidráulica y medio ambiente, Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Ingeniería hidráulica y medio ambiente, España.

Lozano, F. V., Pujol, R. O., y Coda, F. E. (2006). El reactor biológico de membrana en el tratamiento de aguas residuales. *Ingeniería química*(435), 160-167.

Lazcano A. L. (2010). Estudio de la oxidación química y la biodegradabilidad en la depuración del efluente acuoso final de una refinería: eliminación de fenoles e hidrocarburos, Tesis para obtener el título de Doctora en Ingeniería (Procesos). Facultad de Química. UNAM. México.

Mackenzie, L.Davis., Susan J. Masten. (2005). *Ingeniería y ciencias Ambientales* (Primera Edición ed.). México : Mc Graw –Hill Interamericana.

McMurry, Jonh. (2012). *Química Orgánica* (8va edición ed.). CENANGE Learning.

Metcalf, y Eddy. (2003). *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse*. (4 Edición ed.). McGraw-Hill inc.



Nava, U.L.M. (2014). Tratamiento de aguas residuales de refinerías de petróleo por medio de reactores biológicos con membrana. Tesis para obtener el título de Doctora en Ingeniería. Facultad de Química. UNAM. México.

Nava, U.L.M; Gasperín, S.R; Durán M.A. (2013). Comparación de un reactor de biomasa suspendida y un reactor de biomasa adherida para la biodegradación de compuestos tóxicos presentes en aguas residuales de refinerías de petróleo. *Revista internacional de contaminación ambiental* , 30(1).

Norma Mexicana. NMX-AA-082-1986. Determinación del nitrógeno del nitrato. Método espectrofotométrico ultravioleta. México.

Norma Mexicana. NMX-AA-008-SCFI-2001. Determinación del pH. México.

Norma Mexicana. NMX-AA-034-SCFI-2001. Medición de sólidos y sales disueltas en aguas residuales y residuales tratadas. México.

Norma Mexicana. NMX-AA-050-SCFI-2001. Determinación de fenoles totales en aguas naturales, portables, residuales y residuales tratadas. México.

Norma Mexicana. NMX-AA-026-SCFI-2010. Medición del nitrógeno total Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. México.

Norma Mexicana. NMX-AA-154-SCFI-2011. Determinación de nitrógeno de nitritos en aguas naturales, residuales, residuales tratadas y marinas. México.

Olmos A., Olguín P., Fajardo C., Razo E. y Monroy O. (2004). Physicochemical Characterization of Spent Caustic from the OXIMER Process and Sour Waters from Mexican Oil Refineries. *Energy & Fuels*, 302-304.

Ortiz, O. P.I. (2013). *Evaluación de un reactor por lotes para la biodegradación de compuestos fenólicos*. Tesis para obtener el título de Ingeniera Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Park, D., Lee, S.D., Kim M.Y., Park, J.M. (2008). Bioaugmentation of cyanide-degrading microorganisms in a full-scale cokes wastewater treatment facility. *Bioresource Technology*, 99, 2092-2096.



Petróleos Mexicanos, 2015.

Quan, X., Wang, F., Zhao, Q., Zhao, T., Xiang J. (2009). Air stripping of ammonia in a water-sparged aerocyclone reactor. *Wat. Sci. Technol*, 170, 983-988.

Schlegel, H.G. (1997). *General Microbiology* (7 edición ed.). Cambridge University .

Semrany, S., Favier, L., Hayet, D., Taha, S., Amrane, A. (2012). Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio- Refractory Organic Compounds (Bio-RoCs). *Biochemical Engineering Journal*, 69, 75-86.

Siegfried, E., Joke, G., Han, V., Nico, B. (2007). Reactivation of aerobic and anaerobic ammonium oxidizers in OLAND biomass after long-term storage. *Environmental biotechnology*, 74, 1376-1384.

Silva, C.D. (2011). *Estudio fisiológico de la nitrificación y oxidación del p- cresol en un consorcio nitrificante*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología, UAM, México , México.

Texier C. A. y Gómez, J. (2001). *Sedimentabilidad y comportamiento respiratorio de un lodo nitrificante en un reactor de lotes secuenciados*. UAM, Iztapalapa , Biotecnología , México.

Texier C.A., Gómez J. (2007). Simultaneous nitrification and p-cresol oxidation in a nitrifying sequencing batch reactor. *Water Research*. 41:315-322

Trinidad, B.A. (2014). *Modelos de crecimiento en biología, su significado biológico y selección del modelo por ajuste*. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias matemáticas aplicadas e industriales. , Universidad Autónoma Metropolitana .

Turan, M., Gulsen ,H. y Celik, M. (2005). Treatment of landfill leachate by a combined anaerobis fluidized bed and zeolite column system. *Journal of Environmental Engineering*, 131(5), 815-819.

Valera, D.V. (2006). *Obtención de un consorcio microbiano granular para la biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada*.



- Van Hulle, S.W.H., Volcke, E.I.P., López, T. J., Donckels B., Van, L M.C.M., Vanrolleghem, P.A. (2007). Influence of temperature and pH on the kinetics of the Sharon nitrification process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 471-480.
- Wang, J.,Quan,X.,Wu,L.,Quian,Y., Werner,H. (2002). Bioaugmentation as a tool to enhance the removal of refractory compound in coke plant wastewater. *Process Biochemistry*, 38, 777-781.
- Weng A, Z. D. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 43(3), 1-5.
- Weng, A. Z., Díaz, R O.E., y Álvarez, M.I. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 43(3), 1-4.
- Wouter, R., Miclea, A.I., Udo, G.J.M., Muyze,r Gerard, Picioleanu, Cristian. (2008). The membrane bioreactor: A Novel Tool to Grow Anammox Bacteria as Free Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 286-294.



CAPÍTULO 9. ANEXOS

Anexo 9.1

Manual de Procedimiento de Reactivación de Consorcios Bacterianos

Comerciales



La Naturaleza trabajando para ti.

Manual de Procedimiento de Reactivación de Consorcios Bacterianos Comerciales

La reactivación de los consorcios bacterianos comerciales especializados en la degradación de diversos tipos de compuestos contaminantes se lleva a cabo en el Bio[→]Reactor MEN[®].

Se pesan las siguientes cantidades de nutrientes, fécula de maíz y consorcios bacterianos de acuerdo a lo requerido.

Nutriente	% w	w	Nutriente	% w	w
NaCl	27.7	0.277	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.0	0.06
Na ₂ HPO ₄	16	0.16	CaCO ₃	6.0	0.06
NaH ₂ PO ₄	10	0.1	CuSO ₄	1	0.01
FeSO ₄	4.5	0.045	NiSO ₄	0.1	0.001
MgSO ₄	4.5	0.045	CoSO ₄	0.1	0.001
ZnSO ₄	4.5	0.045	MoSO ₄	0.1	0.001
MnSO ₄	4.5	0.045	Fécula de maíz	10	0.1
			Consortio bacteriano	10	0.1

Dr. Jorge F. Rodríguez González

Director General



Anexo 9.2 Método Potenciométrico usado para las determinaciones de potencial de hidrógeno. NMX-AA-008-SCFI-2001.

De cada reactor se extrajeron aproximadamente 50 mL de lodos activados, el electrodo se encuentra sumergido en una disolución de cloruro de potasio 3M, la membrada debe ser lavada con agua destilada, y posteriormente, se sumerge el electrodo en el recipiente que contiene la muestra, cuando el equipo estabiliza la cifra se registrar el dato de pH.

Anexo 9.3 Técnica espectrofotométrica usada para las determinaciones de fenoles totales. NMX-AA-050-SCFI-2001

Para llevar a cabo esta técnica se usaron 25 mL de la muestra (influyente y efluente de cada reactor en operación).

- Determinación de la concentración de entrada de fenoles totales.
 - 1) Preparar una dilución 1/5 de la disolución sintética, preparada para alimentar los reactores. Es decir, se tomaron 10,0 mL de la disolución sintética (Fenoles totales+ N-NH₄⁺ + nutrientes) y se aforó a 50,0 mL con agua destilada.
 - 2) En un vaso de precipitados de 50 mL se coloca una alícuota de 25,0 mL de la dilución preparada previamente.
 - 3) A esta última ejecución se añadieron 625 μ L de una disolución de NH₄OH (0.5N) y 250 μ L de 4-aminoantipirina (2 % m/v), agitar suavemente la mezcla y posteriormente agregar 250 μ L de ferricianuro de potasio, K₃ Fe(CN)₆ (8 % m/v).
- Determinación de la concentración de salida de fenoles totales.
 - 1) A una muestra de 25 mL de efluente del reactor en operación (sin dilución), se añadieron 625 μ L de una disolución de NH₄OH (0.5N) y 250 μ L de 4-aminoantipirina (2 % m/v), después de efectuar esta última adición, agitar suavemente la mezcla y posteriormente agregar 250 μ L de ferricianuro de potasio (8 % m/v).



Es importante destacar que cualitativamente la concentración de fenoles totales de entrada al reactor, se tornaba color rojo entre más alta era la concentración de compuestos fenólicos existentes, y amarillo para concentraciones más bajas. Esta deducción, podía comprobarse cuantitativamente a través de una prueba analítica espectroscópica en el espectrofotómetro Cary 50 con ayuda de la siguiente curva de calibración. $0.04796 * \text{conc} + 0.004442 \quad r^2 = 0.99889 \quad \text{Abs} = 506.9 \text{ nm}$

Anexo 9.4 Técnica espectrofotométrica usada para las determinaciones de nitratos. NMX-AA-082-1986.

- 1) Para llevar a cabo esta técnica se necesitaron 500 μL de muestra (efluente) de cada reactor en operación.
- 2) Se adicionó agua des ionizada a la mitad de un matraz volumétrico de 25,0 mL, posteriormente, se adiciona la muestra y en seguida 500 μL de HCl (8.3%).
- 3) La muestra se dejó reposar durante 5 minutos y posteriormente se leyó en el mismo equipo Cary 50 usando la siguiente curva de calibración.

$0.26380 * \text{conc} + 0.03178 \quad r^2 = 0.99989 \quad \text{Abs} = 220.1$

Anexo 9.5 Técnica espectrofotométrica usada para las determinaciones de nitritos. NMX-AA-154-SCFI-2011

Preparación del reactivo de color de buffer: En un vaso de precipitados 500 mL colocar 250 mL de agua desionizada, añadir 105 mL de HCl (Para realizar esta ejecución, colocar el matraz sobre una cuba hidroneumática, esto ayudará a amortiguar el calor propiciado por la reacción exotérmica que ocurrirá al mezclarse el ácido con el agua, para realizar correctamente la disolución desplazar cuidadosamente el ácido por las paredes del matraz).

Agregar 5 gramos de sulfanilamida y 0.5 gramos de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina. Agitar vigorosamente hasta observar la completa disolución de los compuestos participantes, se observará una coloración buganvilia. Agregar 136 gramos de



acetato de sodio, trasvasar a un matraz volumétrico de 500,0 mL y aforar con agua desionizada.

Se emplearon 25,0 μL de la muestra (efluente) de los reactores en operación.

En un matraz de 50,0 mL se colocaron ~ 25 mL de agua desionizada y el volumen de muestra correspondiente. El matraz se afora a la máxima capacidad de su volumen y posteriormente se agregan dos mililitros del reactivo de color buffer.

Con esta última adición la mezcla se deja reposar 15 minutos y si no hay desaparición del color, entonces puede ser leída en el espectrofotómetro haciendo uso de la curva $0.95543 \cdot \text{conc} + 0.00325$ $r^2 = 0.99904$ Abs. 540.1 nm.

Anexo 9.6 Método titulométrico para las determinaciones de nitrógeno amoniacal **NMX-AA-026-SCFI-2010.**

- 1) Para llevar a cabo esta técnica, es necesario que el matraz bola contenga agua destilada, posteriormente se abre la llave del agua (B), luego se abre la llave del vacío (A) y se conecta el equipo para que el agua del matraz ebulle.
- 2) Mientras el agua del matraz se calienta a temperatura de ebullición, se colocan 20 mL de ácido bórico (20 g/L), y tres gotas de una mezcla de indicador rojo de metilo y azul de metileno (3:2), la coloración que adopta dicha disolución es color violeta.
- 3) Se utilizan 6 mL de muestra y se depositan en el contenedor del equipo (1), se añaden 4 mL de hidróxido de sodio 6N, cuando la mezcla esté lista, se abre la llave (2), inmediatamente se cierra la llave número 4, el vaso que contiene el indicador se coloca en el espacio (5), donde será recolectado el amoníaco en forma de gas, mismo que se utilizará para la cuantificación de la degradación del nitrógeno amoniacal, se espera a que el vaso de precipitados se llene al doble del volumen inicial, o sea 40 mL, cuando éste volumen se alcanza, la reacción ha finalizado y se procede a la siguiente parte.
- 4) En una bureta de 25,0 mL se coloca el titulante ($\text{H}_2\text{SO}_4 = 0.01\text{N}$), la muestra anterior se titula con el ácido sulfúrico, la valoración termina cuando el vire final es similar



o casi igual al vire inicial (violeta), es importante mencionar que un exceso de amoníaco tornará una coloración verde en el ácido con indicador.

5) La ecuación con la que se estima el valor de $N-NH_4^+$, en la muestra es:

$$[N-NH_4^+] = \frac{14000 * \text{Concentración del titulante (\#equivalentes/L)} * \text{volumen del titulante gastado (mL)}}{\text{Volumen de la muestra (mL)}}$$

Nota 1: La mezcla de indicador rojo de metilo y azul de metileno (3:2) se prepara pesando 200 g de cada reactivo por separado, el azul de metileno se coloca en un vaso de precipitados de 50 mL y se agregan 3 gotas de agua desionizada; la mezcla se homogeneiza con ayuda de una varilla de vidrio, cuando ya esté casi disuelto el soluto, de trasvasa un matraz volumétrico de 50,0 mL y se afora con etanol, lo mismo se hace para el caso del rojo de metilo. Cuando las disoluciones están listas se mezclan 3 partes de rojo de metilo y dos partes de azul de metileno. Por ejemplo, se requiere preparar 50 mL de la mezcla de indicadores, se unen 30 mL de rojo de metilo y 20 mL de azul de metileno.

Anexo 9.7 Técnica gravimétrica (peso seco) usada para las determinaciones de sólidos suspendidos totales y volátiles (SST y SSV) NMX-AA-034-SCFI-2001.

- 1) Para llevar a cabo este método se utiliza papel filtro de fibra de vidrio, y charolitas de aluminio. La preparación del papel filtro es ingresar el papel filtro sobre una charola de aluminio (limpia) a la estufa, durante 5 horas, esto con la finalidad de que el papel quede completamente libre de moléculas de agua.
- 2) Una vez transcurrido el tiempo dentro de la estufa, el papel filtro es transferido a un desecador, que contiene silica gel en el interior, con la finalidad de enfriar el papel filtro, éste permanece en el desecador el resto del día.
- 3) Para realizar la prueba, es necesario pesar el papel filtro (despreciando la masa de la charola que lo contiene), se registra esta masa porque es el dato número 1, se extraen 5 mL de lodos activados perfectamente homogeneizados del reactor a estudiar, posteriormente son filtrados al vacío con el papel filtro, después son colocados en las charolitas de aluminio y trasladados a la estufa con $T = 105^\circ C$, allí permanecen durante 8 horas.



- 4) Una vez transcurrido el tiempo dentro de la estufa, se someten al desecador durante 4 horas más, cuando éste tiempo transcurre, nuevamente se registra la masa del papel filtro después de 105 °C y se ingresa 20 minutos a la mufla a una temperatura de 550°C, cuando pasa el tercio de hora recomendado, las charolitas se extraen de la estufa (usando pinzas y guantes gruesos) , finalmente se coloca en el desecador 5 horas y pueden ser pesados, para registrar la última masa del papel filtro, después de 550°C.
- 5) Ahora se menciona la manera en la que son estimados los valores para sólidos suspendidos totales y sólidos suspendidos volátiles.

$$SST = \frac{\text{masaregistrada } 105^{\circ}C(g) - \text{masainicial}(\text{papel filtro seco})(g)}{\text{volumen muestra}} (1000000)$$

$$SSV = \frac{\text{masaregistrada } 105^{\circ}C(g) - \text{masaregistrada } 550^{\circ}C(g)}{\text{volumen muestra (mL)}} (1000000)$$

Con el factor de conversión al multiplicar por un millón, se obtienen unidades de (ppm en mg/L)

Anexo 9.8 Cinéticas de degradación

Los sólidos suspendidos totales (iniciales) del consorcio preservado reactivado corresponde a: SST=4 600 mg/L.

Para que exista la misma cantidad de sólidos suspendidos totales en los reactores por lote de 320 mL cada uno y el reactor biológico de membrana, de donde se obtuvieron los lodos, se calcula que 588.23 mL/L de lodos activados, relacionan eficazmente dicho valor. Es decir:

588.23 mL lodos activados del RBM (5L)-----1000mL volumen total

X=?----- 560 mLvolumen total

X= 330 mL de lodos activados del RBM (5L) reactivado para conservar la concentración dentro del reactor de 4 600 mg/L.

Dónde:



Disolución A: (disolución (300 mg N-NH₄⁺/L más nutrientes, 60 mg mezcla de fenoles totales/L).

Volumen total= (Lodos del RBM (5L) reactivado + disolución A

(300 mg N-NH₄⁺/L más nutrientes, 60 mg mezcla de fenoles totales/L).

Con este cálculo lo que se desea transmitir al lector es que, como bien se menciona anteriormente, el experimento se realizó por duplicado y en cada caso se necesitan 300 mL de muestra (lodos reactivados), por esta razón se extraen únicamente 330 mL de lodos activados del RBM (5L) reactivado/ 0.6 L, una vez centrifugados se retira el sobrenadante, de tal manera que sólo quede disponible el sólido de lodos que tiene un aspecto de pasta, dicha muestra se coloca en un vaso de precipitados de 1000 mL y se afora a 600 mL de la disolución A y así se obtiene el volumen total, con el que se da marcha a la operación de estos reactores.

Anexo 9.9 Cinéticas de bioaumentación experimentos 1 y 2

Primer experimento de cinéticas de bioaumentación.

Sólidos suspendidos totales para PTARCE	5 190 mg/L
Sólidos suspendidos totales para consorcio reactivado	4 120 mg/L

5 190 mg consorcio PTARCE ----- 1000 mL licor mezclado PTARCE

4 120 mg consorcio reactivado ----- X=?

X= 793.83 mL lodos activados del consorcio PTARCE / 1000 mL volumen total

Son tres reactores los que se inocularon con lodo proveniente de la planta de tratamiento cerro de la estrella, cada uno con un volumen total de 300mL, por lo tanto, sólo se centrifugaron 900 mL de lodos activados de la PTARCE, para lo que se realiza el siguiente análisis.

793.83 mL lodos activados consorcio PTARCE -----1000 mL volumen total



$$Y=? \quad \text{-----} 900 \text{ mL volumen total}$$

$$Y= 714.44 \text{ mL lodos activados consorcio PTARCE} / 0.9 \text{ L volumen total.}$$

Dónde:

Disolución A: (disolución (300 mg N-NH₄⁺/L más nutrientes, 60 mg mezcla de fenoles totales/L).

Volumen total= (Lodos del RBM (5L) reactivado + disolución (300 mg N-NH₄⁺/L más nutrientes, 60 mg mezcla de fenoles totales/L).

Con esta conjetura, lo que se desea expresar es que se extrajeron 715 mL de lodos activados del consorcio PTARCE, se centrifugaron, para luego completar un volumen de 900 mL de volumen total, y así comenzar satisfactoriamente con el experimento de degradación. De modo que 715 mL de lodos activados de la planta son suficientes para conservar la concentración de SST =5 190 mg/L, aún en los reactores del experimento de bioaumentación.

Mientras las primeras cuatro horas transcurren, se aprovecha para centrifugar los lodos activados provenientes del reactor biológico de membrana, mismo que contiene los microorganismos reactivados.

$$793.83 \text{ mL lodos activados consorcio PTARCE} \quad \text{-----} \quad 1000 \text{ mL volumen total}$$

$$Z=? \quad \text{-----} \quad 300 \text{ mL volumen total}$$

$$Z= 238 \text{ mL de lodos activados del consorcio reactivado} / 300 \text{ mL de volumen total.}$$

Para el consorcio liofilizado, se parte de que la concentración de SST para el reactor biológico de membrana (5L) es de 4 120 mg/L, entonces.

$$4120 \text{ mg SST en consorcio reactivado} \quad \text{-----} \quad 1000 \text{ mL de volumen total.}$$

$$W=? \quad \text{-----} 300 \text{ mL de volumen total}$$

$$W=1 \text{ 236 mg } \left(\frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \right) = 1.236 \text{ g microorganismos liofilizados.}$$

Se pesó 1.0 g de microorganismos liofilizados.



Tabla 15. Cinéticas de bioaumentación experimento 1

Experimento 1			
Nombre del consorcio	Cantidad extraída del reactor	Volumen de aforo (mL)	SST (mg/L)
Planta de tratamiento de aguas residuales Cerro de loa estrella.	715 mL	900 mL	5 190 PTARCE
Consorcio preservado reactivado	238 mL	300 mL	4120 RBM
Consorcio preservado original	1.0 g	300 mL	4 120 RBM

Segundo experimento

3 600 mg lodos activados PTARCE ----- 1000 mL licor mezclado PTARCE

4 100 mg lodos activados PTARCE ----- X= 1139 mL licor mezclado PTARCE

4 100 es la concentración del primer experimento de bioaumentación, cómo se puede observar la concentración de SST de la planta es de 3 600 mg/L , cantidad menor a 4 100 mg/L; por esta razón fue necesario concentrar los sólidos y también establecer una comparación en la concentración de los sólidos suspendidos totales entre uno y otro experimento.

1 139 mL licor mezclado PTARCE ----- 1000 mL volumen total.

Y=? ----- 900 mL

Y= 1025 mL de lodos activados PTARCE /900 mL volumen total.



Para reactivados:

1180 mg lodos activados reactivados----- 1000 mL lodos activados reac.

4 100 mg lodos activados reactivados----- Z=?

Z=3 474 mL de lodos activados reactivados.

3 474 mL de lodos activados reactivados ----- 1000mL volumen total

W= 1042.2 mL de lodos activados reactivados ----- 300 mL volumen total

Se centrifugaron 1 042 mL del reactor con microorganismos reactivados y se aforaron a 900 mL de volumen total.

Se pesó 1.0 g del consorcio liofilizado.

Tabla 16. Cinéticas de bioaumentación experimento 2

Experimento 2			
Nombre del consorcio	Cantidad extraída del reactor	Volumen de aforo (mL)	SST (mg/L)
Planta de tratamiento de aguas residuales Cerro de loa estrella.	1 025mL	900 mL	4 100 PTARCE
Consorcio preservado reactivado	1 042 mL	300 mL	1 180 RBM
Consorcio preservado original	1.0 g	300 mL	1 180 RBM

9.10 Análisis estadístico

Para valorar si las muestras estudiadas son significativas entre sí, se realizó una prueba de hipótesis, haciendo uso del programa estadístico *STATGRAPHICS*.



En las pruebas de significación estadística es importante tener en cuenta que siempre se plantea la hipótesis nula "H₀" en la cual no se evidencia diferencia significativa entre los datos estadísticos de las muestras comparadas, así mismo se plantea la hipótesis alternativa "H₁", en ésta si hay diferencias significativas. (Gómez et al, 2001)

En un análisis estadístico cuando se rechaza la hipótesis nula, está argumentando que los estadísticos de las muestras comparadas son diferentes entre sí, con una probabilidad mayor al 95%. (Gómez et al, 2001). No siempre es posible rechazar H₀ ($p > 0,05$), si éste es el caso, no se puede argumentar que las muestras estudiadas son iguales o diferentes debido a que la probabilidad es $<95\%$.

A) Se realizó una prueba de hipótesis para la degradación de la mezcla de fenoles totales y nitrógeno amoniacal en la cual se analizaron los 24 datos juntos (8 por consorcio).

B)

PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA FENOLES TOTALES

Análisis de una variable - Concentración (mg/L)

Datos/Variable: Concentración (mg/L)

24 valores con rango desde 5.0 a 57.5

Este procedimiento está diseñado para resumir una sola muestra de datos. Calculará varios estadísticos y gráficas. En el procedimiento también está incluida la prueba de hipótesis.

Tabla 17. Prueba de Hipótesis para la concentración (mg/L)

Parámetro	Valor
Media Muestral	21.8542
Mediana Muestral	12.5
Desviación Estándar de la Muestra	18.507

Prueba t

Hipótesis Nula: media = 0

Alternativa: no igual



Estadístico $t = 5.78499$

Valor-P = **0.00000680749**

Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.

Los valores anteriores muestran los resultados de las pruebas relativas a la población de la cual procede la muestra de concentración (mg/L). La prueba-t evalúa la hipótesis de que la media de Concentración (mg/L) es igual a 0.0 versus la hipótesis alterna de que la media de concentración (mg/L) es no igual a 0.0. Debido a que el valor-P para esta prueba es menor que 0.05, se puede rechazar la hipótesis nula con un 95.0% de confianza.

C) PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA NITRÓGENO AMONIAICAL $N-NH_4^+$

Análisis de una variable - concentración (mg/L)

Datos/Variable: Concentración (mg/L)

24 valores con rango desde 91.5 a 293.0

Tabla 18. Prueba de Hipótesis para Concentración (mg/L)

Parámetro	Valor
Media Muestral	244.5
Mediana Muestral	290.0
Desviación Estándar de la Muestra	73.2964

Prueba t

Hipótesis Nula: $\text{media} = 0$

Alternativa: no igual

Estadístico $t = 16.3419$

Valor-P = **0**

Se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0.05$.



Se presentan los resultados de las pruebas relativas a la población de la cual procede la muestra de concentración (mg/L). La prueba-t evalúa la hipótesis de que la media de Concentración (mg/L) es igual a 0.0 versus la hipótesis alterna de que la media de Concentración (mg/L) es no igual a 0.0. Debido a que el valor-P para esta prueba es menor que 0.05, se puede rechazar la hipótesis nula con un 95.0% de confianza.

- 2) Se realizó la prueba de hipótesis para la degradación de la mezcla de fenoles totales y nitrógeno amoniacal en la cual se analizaron las muestras por separado.

COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES.

Comparación de los tres consorcios

Muestra 1: Preservado original (8 valores en el rango de 5.0 a 57.5)

Muestra 2: Preservado reactivado (8 valores en el rango de 5.0 a 57.5)

Muestra 3: PTAR CE (8 valores en el rango de 7.5 a 57.5)

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Tabla 19. ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	93.7708	2	46.8854	0.13	0.8818
Intra grupos	7783.97	21	370.665		
Total (Corr.)	7877.74	23			



La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0.12649, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 20. Pruebas de Múltiple Rangos

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PTAR CE	8	19.0625	X
Preservado original	8	23.125	X
Preservado reactivado	8	23.375	X

Tabla 21. Diferencia significativa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Preservado original - Preservado reactivado		-0.25	20.0191
Preservado original - PTAR CE		4.0625	20.0191
Preservado reactivado - PTAR CE		4.3125	20.0191

* indica una diferencia significativa.

La tabla 9.7 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO AMONICAL.



Comparación de los tres consorcios

Muestra 1: PTAR CE (8 valores en el rango de 287.0 a 293.0)

Muestra 2: Preservado original (8 valores en el rango de 91.5 a 293.0)

Muestra 3: Preservado reactivado (8 valores en el rango de 92.0 a 293.0)

Este procedimiento compara los datos en 3 columnas del archivo de datos actual. Realiza varias pruebas estadísticas y gráficas para comparar las muestras. La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Tabla 22. ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	25819.9	2	12910.0	2.77	0.0853
Intra grupos	97744.6	21	4654.5		
Total (Corr.)	123565.	23			

La tabla 9.8 ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 2.77365, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables con un nivel del 95.0% de confianza.



Tabla 23. Pruebas de Múltiple Rangos

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Preservado reactivado	8	220.438	X
Preservado original	8	222.188	X
PTAR CE	8	290.875	X

Tabla 24. Diferencia significativa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PTAR CE - Preservado original		68.6875	70.9399
PTAR CE - Preservado reactivado		70.4375	70.9399
Preservado original - Preservado reactivado		1.75	70.9399

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla 9.10 se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. No hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.