

005513

28j



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

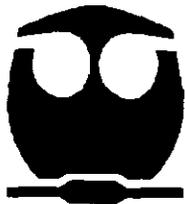
FACULTAD DE QUÍMICA

**“REMOCIÓN DE 2-CLOROFENOL,  
2,4-DICLOROFENOL Y 2,4,6-TRICLOROFENOL DEL  
AGUA CON AYUDA DE *Pseudomonas fluorescens*”**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

***I.Q. NORMA ANGÉLICA BELTRÁN ZARZA***



ASESOR

DRA. BLANCA E. JIMÉNEZ CISNEROS

México, D.F.

Febrero de 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

271495



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.

Paginación

Discontinua

## DEDICATORIAS

A Enrique

Porque con tu gran amor y ejemplo me has impulsado a seguir adelante no importando el sacrificio.

A mis padres Antonio y Elvia

Por seguir con amor todos y cada uno de los grandes pasos de mi vida.

A Claudia y al abuelo

Simplemente por formar parte de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Blanca Jiménez por permitirme trabajar en el grupo de Tratamiento y Reúso del Instituto de Ingeniería, así como por su gran apoyo y conocimientos transmitidos.

Al Dr. Luis Torres Bustillos por su apoyo, dirección y amistad.

A Maggi, Vero, Edith, Lupita y Gaby porque sin su amistad se hubiera hecho más difícil este camino. Gracias por sus consejos y animo.

A CONACyT por el apoyo brindado para la realización de los estudios de maestría.

Al Instituto de Ingeniería por el apoyo brindado para la redacción de la tesis.

Al Dr. Eduardo Bárzana, Dra. Gloria Soberón, Dr. Sergio Revah, Dr. Adalberto Noyola y Dr. Oscar Monroy por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

# Contenido

	Página
Indice de tablas	v
Indice de figuras	vii
Indice de fotos	viii
Resumen	ix
Introducción	xi
Justificación	1
Objetivo y metas	4
Premisas	5
Hipótesis	6
Capítulo 1. Fundamentos teóricos	7
1.1 Los clorofenoles en estudio	7
1.1.1 Descripción y estructura	7
1.1.2 Características fisicoquímicas	9
1.2 Mecanismos de remoción para compuestos tóxicos prioritarios	11
1.2.1 Procesos físicos	11
1.2.1.1 Desorción con aire o vapor	13
1.2.2 Procesos químicos	15
1.2.3 Procesos biológicos	16
1.2.3.1 Microorganismos degradadores de compuestos tóxicos	19
1.2.3.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
1.3 Inmovilización como alternativa en el tratamiento de aguas residuales	22
1.3.1 Tipos de inmovilización	22
1.3.2 Alginato de calcio	24
1.3.3 Características físicas de un soporte de alginato	25
1.3.3.1 Tamaño de partícula	26
1.3.3.2 Fracción de vacíos	27
1.3.3.3 Capacidad de atrapamiento	28
1.3.4 Ventajas y desventajas de la inmovilización	28

	<b>Página</b>
1.3.5 Aplicación	29
1.4 Caracterización cinética	30
1.4.1 Velocidad de reacción	31
1.4.1.1 Reacciones de orden cero	32
1.4.1.2 Reacciones de primer orden	33
1.4.1.3 Reacciones de segundo orden	34
<b>Capítulo 2. Materiales y métodos</b>	<b>36</b>
2.1 Etapa I. Caracterización microbiológica de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	36
2.2 Etapa II. Pruebas testigo	37
2.2.1 Prueba de descomposición	37
2.2.1.1 Parámetros de monitoreo	38
2.2.1.2 Técnicas analíticas	38
2.2.2 Prueba de desorción	38
2.2.2.1 Parámetros de monitoreo	39
2.2.3 Prueba de sorción	39
2.2.3.1 Parámetros de monitoreo	40
2.3 Etapa III. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias libres en un reactor agitado	41
2.3.1 Parámetros de monitoreo	42
2.3.2 Técnicas analíticas	42
2.4 Etapa IV. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias inmovilizadas usando un reactor agitado	43
2.4.1 Preparación del biocatalizador	43
2.4.1.1 Técnicas analíticas	44
2.4.2 Células inmovilizadas en suspensión	47
2.4.2.1 Parámetros de monitoreo	48
2.5 Etapa V. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias inmovilizadas usando una columna empacada	48

	<b>Página</b>
2.5.1 Parámetros de monitoreo	49
<b>Capítulo 3. Resultados y discusión</b>	<b>50</b>
3.1 Etapa I. Caracterización microbiológica de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	50
3.2 Etapa II. Pruebas testigo	51
3.2.1 Prueba de descomposición	52
3.2.2 Prueba de desorción	53
3.2.3 Prueba de sorción	58
3.3 Etapa III. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias libres en un reactor agitado	60
3.3.1 Crecimiento bacteriano	60
3.3.2 pH	61
3.3.3 Oxígeno disuelto	62
3.3.4 Cinética de la degradación	63
3.4 Etapa IV. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias inmovilizadas usando un reactor agitado	65
3.4.1 Caracterización física	65
3.4.2 Células inmovilizadas en un reactor agitado	69
3.4.2.1 pH	69
3.4.2.2 Oxígeno disuelto	69
3.4.2.3 Cinética de degradación	70
3.5 Etapa V. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias inmovilizadas usando una columna empacada	72
3.5.1 Degradación en columna empacada	72
3.5.2 Cinética de degradación	73
<b>Capítulo 4. Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>78</b>
4.1 Conclusiones	78
4.2 Recomendaciones	80

	<b>Página</b>
<b>Referencias</b>	82
<b>Anexo A. Medios utilizados en el estudio</b>	90
<b>Anexo B. Prueba de identificación API</b>	92
<b>Anexo C. Técnica de la 4-aminoantipirina</b>	94
<b>Anexo D. Preparación del biocatalizador</b>	95
<b>Anexo E. Resultados de las pruebas con células libres en reactor agitado</b>	96
<b>Anexo F. Resultados de las pruebas con células inmovilizadas en reactor agitado</b>	107
<b>Anexo G. Publicación relacionada con el proyecto</b>	118

# ***Indice de Tablas***

		<b>Página</b>
Tabla 1.	Fenoles considerados como tóxicos prioritarios por diversas instituciones	4
Tabla 2.	Industrias con descargas que contienen fenoles	5
Tabla 3.	Características físicas y químicas de los clorofenoles	10
Tabla 4.	Procesos físicos para el tratamiento de aguas residuales industriales y su aplicación	12
Tabla 5.	Mecanismos de remoción de compuestos tóxicos en un sistema de lodos activados	14
Tabla 6.	Desorción con aire de los clorofenoles en varios estudios	15
Tabla 7.	Procesos químicos para el tratamiento de aguas residuales industriales	16
Tabla 8.	Procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales industriales	17
Tabla 9.	Remoción de compuestos semivolátiles con diferentes procesos	18
Tabla 10.	Concentración de tres clorofenoles y condiciones de trabajo usadas por varios autores	19
Tabla 11.	Microrganismos degradadores de compuestos fenólicos	20
Tabla 12.	Caracterización física del biocatalizador	26
Tabla 13.	Valores de diámetro de biocatalizadores reportados por varios autores	27
Tabla 14.	Valores de la capacidad de atrapamiento reportada por algunos autores	28
Tabla 15.	Resultados de la prueba de identificación API	51
Tabla 16.	Valores de las constantes de velocidad de desorción	57

	<b>Página</b>
Tabla 17. Comparación de los resultados de desorción de algunos trabajos	58
Tabla 18. Resultados de la prueba de sorción	59
Tabla 19. Crecimiento bacteriano para el sistema de células libres en reactor agitado	60
Tabla 20. Valores de pH en el sistema de células libres en reactor agitado	61
Tabla 21. Valores de oxígeno disuelto en el sistema de células libres en reactor agitado	62
Tabla 22. Valores de las constantes cinéticas de primer orden	64
Tabla 23. Valores de diámetros obtenidos utilizando diferentes presiones de aire	66
Tabla 24. Valores de la densidad real y aparente	66
Tabla 25. Valores de pH en el sistema de células inmovilizadas en reactor agitado	69
Tabla 26. Concentración de oxígeno disuelto para el sistema de células inmovilizadas en reactor agitado	70
Tabla 27. Valores de las constantes cinéticas de primer orden	72
Tabla 28. Porcentajes de remoción alcanzados con bacterias inmovilizadas en una columna empacada	73
Tabla 29. Valores de constantes cinéticas de primer orden	76

## ***Indice de Figuras***

		<b>Página</b>
Figura 1.	Estructura del 2-clorofenol	8
Figura 2.	Estructura del 2,4-diclorofenol	8
Figura 3.	Estructura del 2,4,6-triclorofenol	9
Figura 4.	Tipos de inmovilización	23
Figura 5.	Determinación del orden de reacción	32
Figura 6.	Representación gráfica de una reacción de orden cero	33
Figura 7.	Representación gráfica del curso de una reacción de primer orden	34
Figura 8.	Representación del $\ln C$ vs tiempo	34
Figura 9.	Representación del curso de una reacción de segundo orden	35
Figura 10.	Esquema del sistema utilizado en la prueba de desorción	39
Figura 11.	Reactor de columna empacada utilizado para la prueba de sorción y para la remoción de clorofenoles	40
Figura 12.	Reactor agitado y con aireación para la remoción de clorofenoles con bacterias libres	41
Figura 13.	Equipo empleado para la elaboración de esferas de alginato de calcio	44
Figura 14.	Sistema de células inmovilizadas en un reactor agitado	47
Figura 15.	Cambio de concentración de las soluciones clorofenólicas en control sin bacterias y sin aireación	52
Figura 16.	Desorción del 2-clorofenol con aire	54
Figura 17.	Desorción del 2,4-diclorofenol con aire	54
Figura 18.	Desorción del 2,4,6-triclorofenol con aire	55
Figura 19.	Representación de los datos de desorción por medio de la ecuación de primer orden	57

		<b>Página</b>
Figura 20.	Resultados de la prueba de sorción en alginato de calcio	59
Figura 21.	Cambio de concentración de los clorofenoles con respecto al tiempo	63
Figura 22.	Representación de los datos por medio de la ecuación de primer orden	64
Figura 23.	Curva de secado	67
Figura 24.	Velocidades de secado para el biocatalizador	67
Figura 25.	Cambio de concentración de los clorofenoles con respecto al tiempo	71
Figura 26.	Representación de los datos por medio de la ecuación de reacción de primer orden	71
Figura 27.	Cinética de remoción del 2-clorofenol a diferentes concentraciones	74
Figura 28.	Cinética de remoción del 2,4-diclorofenol a diferentes concentraciones	74
Figura 29.	Cinética de remoción del 2,4,6-triclorofenol a diferentes concentraciones	75
Figura 30.	Representación de los datos obtenidos por medio de la ecuación de primer orden	76

### INDICE DE FOTOS

		<b>Página</b>
Foto 1.	Microfotografía de la cepa <i>Pseudomonas fluorescens</i>	21

# Resumen

El uso de *Pseudomonas fluorescens* tanto libres como inmovilizadas para la remoción de compuestos clorofenólicos fue caracterizado en este trabajo bajo diversas condiciones de operación.

El trabajo se dividió en cinco etapas:

- ☞ En la primera etapa del trabajo se realizó la **caracterización microbiológica** de *Pseudomonas fluorescens*.
- ☞ En la segunda, se llevó a cabo el estudio de otros mecanismos de remoción, como la desorción de los clorofenoles con aire y la sorción en alginato de calcio.
- ☞ En la tercera etapa se realizó la remoción de los clorofenoles en concentraciones desde 25 hasta 1000 mg/L. Se utilizó para ello un reactor agitado con células libres en suspensión, semejando un sistema de lodos activados. Los parámetros medidos fueron crecimiento celular, pH y oxígeno disuelto. El sistema se mantuvo aireado lo cual provocó, además la desorción de los compuestos.
- ☞ En la cuarta etapa se realizó la remoción de los clorofenoles en concentraciones desde 25 hasta 1000 mg/L en un reactor agitado con células inmovilizadas en suspensión.
- ☞ Por último, en la quinta etapa se llevó a cabo la remoción de los tres clorofenoles en concentraciones de 300, 500 y 700 mg/L, utilizando una columna empacada con el biocatalizador y en un modo de recirculación total.

Se determinó la constante de velocidad de remoción en casi todos los casos utilizando la ecuación de primer orden  $\ln C = \ln C_0 - kt$ . Las velocidades de remoción encontradas para el sistema de matraz agitado fueron del orden de  $0.2 \text{ h}^{-1}$  mientras que las de columna empacada fueron del orden de  $0.06 \text{ h}^{-1}$ .

# **Introducción**

El agua es la combinación química más abundante e importante en la superficie terrestre. De los 1400 millones de km<sup>3</sup> de agua que hay en la tierra, aproximadamente 36 millones (2.6%) son de agua dulce. El agua por ser el mejor solvente natural no se encuentra en estado puro en la naturaleza sino que contiene diferentes proporciones de sustancias (líquidas, sólidas y gaseosas) que adquiere al estar continuamente en contacto con el suelo (aguas subterráneas), con aguas de diferente calidad (aguas superficiales) o con el aire (aguas de precipitación).

Debido a lo anterior, la presencia de diversos contaminantes en los cuerpos de agua cada vez es más común. Este es el caso de los fenoles que son xenobióticos<sup>1</sup> y que se encuentran en los efluentes de diversas industrias como la de la celulosa y del papel, la del cuero y pieles y la petroquímica básica. Estos compuestos son reconocidos como tóxicos prioritarios y están normados por diversas entidades como la EPA (*Environmental Protection Agency*), la CIPR (Comisión Internacional para la Protección del Río Rhin) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) (Arévila *et al.*, 1996).

Por esta razón, se han desarrollado una gran cantidad de métodos de control y tratamiento con el fin de mejorar la calidad del agua. Uno de ellos, recientemente propuesto para el tratamiento de aguas contaminadas, es el uso de células específicas. Estas pueden encontrarse en forma libre o inmovilizada. La inmovilización es una técnica utilizada para mantener los microorganismos fijos en una superficie o atrapados dentro de un material, logrando con esto ciertas ventajas sobre otros sistemas convencionales. Esta técnica ha sido aplicada exitosamente en las áreas de alimentos y salud.

---

<sup>1</sup> Producto sintético que no es formado por procesos naturales y es una sustancia extraña (Atlas R. y R Bartha, 1946).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la remoción del 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol mediante el empleo de *Pseudomonas fluorescens* en diversas condiciones de operación (libre, inmovilizada en reactor agitado e inmovilizada en columna empacada).

El capítulo 1 comprende los fundamentos teóricos. En ellos se presentan las propiedades de cada uno de los clorofenoles que se utilizan en el estudio. Asimismo se describen los procesos de eliminación para dichos compuestos y las características generales para el uso de células inmovilizadas como parte de un proceso de tratamiento. Además, en forma general se clasifican las reacciones de acuerdo con el orden de reacción.

El segundo capítulo contiene los materiales y métodos utilizados en el desarrollo experimental, el cual está dividido en cinco etapas.

Los resultados son presentados en el capítulo tercero, donde además se analiza el efecto de los diversos mecanismos de remoción y las velocidades obtenidas para cada sistema.

Por último, las conclusiones y obtenidas a partir de los resultados de éste trabajo se presentan en el capítulo cuarto. Por otra parte, el ANEXO G contiene una publicación relacionada con el trabajo de esta tesis.

## Justificación

Los compuestos clorofenólicos han sido estudiados en diversas partes del mundo. En la Tabla 1 se listan aquellos considerados como tóxicos prioritarios del agua o del ambiente por los principales organismos internacionales encargados de controlar las descargas.

**Tabla 1. Fenoles considerados como tóxicos prioritarios por diversas instituciones.**

Tóxicos en la Industria Mexicana	EPA	OMS (ambiente)	CIPR (agua)	NIPRI (agua)
Fenol	✓	✓		✓
2-clorofenol	✓			
2,4-diclorofenol	✓		✓	✓
4,6-dinitro-o-cresol				✓
2-nitrofenol	✓			
4-nitrofenol	✓			
p-cloro-m-cresol	✓			
2,4,6-triclorofenol	✓			

EPA : *Environmental Protection Agency*. OMS : Organización Mundial de la Salud. CIPR : Comisión Internacional para la Protección del Río Rin. NIPRI : *The National Pollutant Release Inventory*.

\*Adaptado de Arévila *et al.*, (1996)

En México, las industrias que se consideran con mayor riesgo de contaminar por tóxicos prioritarios son la industria química, la petroquímica, la farmacéutica, la refinación del petróleo, la textil y las plantas de celulosa y papel (Tabla 2). Los compuestos clorofenólicos más comúnmente encontrados en las descargas de industrias en la República Mexicana son el fenol, el 2-clorofenol, el 2,4-diclorofenol, el 2,4,6-triclorofenol y el pentaclorofenol. Es por esto, que los compuestos elegidos para llevar a cabo la experimentación en el trabajo de tesis fueron 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol.

**Tabla 2. Industrias con descargas que contienen fenoles.**

Tipo de industria	Compuesto fenólico
<input type="checkbox"/> Hilado, tejido y acabado de fibras blandas	➤ Fenol
<input type="checkbox"/> Manufactura de celulosa, papel y productos	➤ Fenol
<input type="checkbox"/> Industria de cuero, pieles y productos derivados	➤ Fenol
<input type="checkbox"/> Fabricación de perfumes, cosméticos y similares	➤ Fenol
<input type="checkbox"/> Fabricación de sustancias químicas básicas (excepto petroquímica básica)	➤ 2-Clorofenol, fenol, pentaclorofenol
<input type="checkbox"/> Petroquímica básica	➤ 2,4-Diclorofenol
<input type="checkbox"/> Fabricación de productos de aserradero y carpintería (excepto muebles)	➤ 2,4,6-Triclorofenol, fenol, pentaclorofenol

\*Adaptado de Arévila *et al.* (1996).

Debido a que la cepa *Pseudomonas fluorescens* ha sido señalada como degradadora de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol por Cabello (1995), se decidió estudiar su comportamiento en un sistema de células libres y otro de células inmovilizadas bajo diversas condiciones de operación.

La aplicación de células puras inmovilizadas para el tratamiento de aguas residuales ha sido ampliamente usada. En especial Lee *et al.* (1994) estudiaron el efecto de inmovilizar células de un consorcio bacteriano en alginato de calcio para degradar fenol y clorofenoles. Los resultados obtenidos mostraron que éstas remueven mayores concentraciones comparadas con los sistemas de células libres. Con el sistema inmovilizado biodegradaron al 100% 522 mg/L de fenol en 8 días, mientras que con células libres no se alcanzó ni un 5% de remoción en el mismo tiempo. El 2-clorofenol a una concentración de 62 mg/L fue degradado al 100% por células inmovilizadas en 27 días mientras que con células libres se alcanzó apenas 75% de remoción en el mismo tiempo. Por otro lado, las células inmovilizadas degradaron al 100% el 2,4-diclorofenol a concentraciones de 42 y 90 mg/L en 5 días. Los autores concluyeron que el uso de células inmovilizadas reduce la fase lag de la biodegradación lo que incrementa la velocidad de degradación.

Por otro lado, Rosas *et al.* (1995) compararon la operación de columnas empacadas con tezontle, carbón activado y alginato de calcio, en los cuales se inmovilizó *P. fluorescens* para remover fenol y clorofenoles de una corriente acuosa. El tezontle y el alginato de calcio resultaron ser los materiales más adecuados para la inmovilización de células. Alcanzaron porcentajes de remoción de 95% y 98% para 1000 mg/L de fenol, respectivamente en 5 días. En el caso específico de alginato de calcio la biodegradación de 1000 mg/L de fenol se llevó a cabo en tan sólo 5 días. Los mecanismos de remoción diferentes a la biodegradación no fueron estudiados.

## **OBJETIVO**

Determinar la cinética de remoción del 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol en agua mediante el empleo de *Pseudomonas fluorescens* libre e inmovilizada en alginato de calcio.

## **METAS**

- ↻ Determinar los mecanismos que intervienen en la remoción.
- ↻ Caracterizar físicamente el biocatalizador.
- ↻ Determinar el comportamiento cinético de la *Pseudomonas fluorescens* libre en un reactor agitado e inmovilizada en un reactor agitado y en una columna empacada para remover 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol.

## **PREMISAS**

- 1) Ha sido demostrado que *Pseudomonas fluorescens* es capaz de remover compuestos fenólicos.
- 2) La cinética en sistemas inmovilizados por atrapamiento se ve afectada por la difusión del sustrato a través del empaque.
- 3) Los reactores con biomasa fija tienen mayores concentraciones de microorganismos, por tanto alcanzan eficiencias mayores que los de biomasa suspendida.

## **HIPÓTESIS**

La eficiencia de remoción del 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con *Pseudomonas fluorescens* depende del estado en que se encuentre (libre o inmovilizada), así como del sistema de trabajo (reactor agitado o columna empacada).

# ***CAPITULO 1***

*Fundamentos Teóricos*

# 1. Fundamentos teóricos

En este capítulo se llevará a cabo una revisión de los conceptos básicos necesarios para fundamentar el trabajo de investigación. Se describirán los clorofenoles (características físicas y químicas) y algunos de los procesos utilizados para su remoción, entre los cuales se encuentran los procesos biológicos que han sido ampliamente usados por varios autores. En efecto, diversos microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) en consorcios o cultivos puros han sido aplicados para degradar fenoles. Un caso especial de ello es el de *Pseudomonas fluorescens*.

Al final se presenta la definición, tipos y aplicación de los sistemas de bacterias inmovilizadas que han sido usados en el tratamiento de aguas residuales.

## 1.1 Los clorofenoles en estudio

Los clorofenoles son ampliamente usados como fungicidas y herbicidas para el control de hongos en los alimentos, como intermediarios en síntesis orgánicas, para la manufactura de tintas y como preservativos de madera. Como consecuencia de este uso se han encontrado en cuerpos de agua. A continuación se presenta un resumen de las características de las sustancias seleccionadas para el presente estudio.

### 1.1.1 Descripción y estructura

#### 2-Clorofenol ( $C_6H_5ClO$ )

También conocido como o-clorofenol, 2-cloro-1-hidroxibenceno, 2-hidroxiclorobenceno, 1-cloro-2-hidroxibenceno. Es de apariencia líquida y color ámbar. Causa daño por inhalación, contacto con la piel o por ingestión. Se usa principalmente como antiséptico

y como componente de los desinfectantes. La forma estructural de este compuesto se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Estructura del 2-clorofenol.

2,4-Diclorofenol (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>O)

El 2,4-diclorofenol se encuentra en forma de cristales que van del color amarillo al incoloro. Es conocido también como 4,6-diclorofenol. Se emplea principalmente como antiséptico, desinfectante y germicida. Es un intermediario en la manufactura del pesticida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4, D). La Figura 2 muestra su forma estructural.

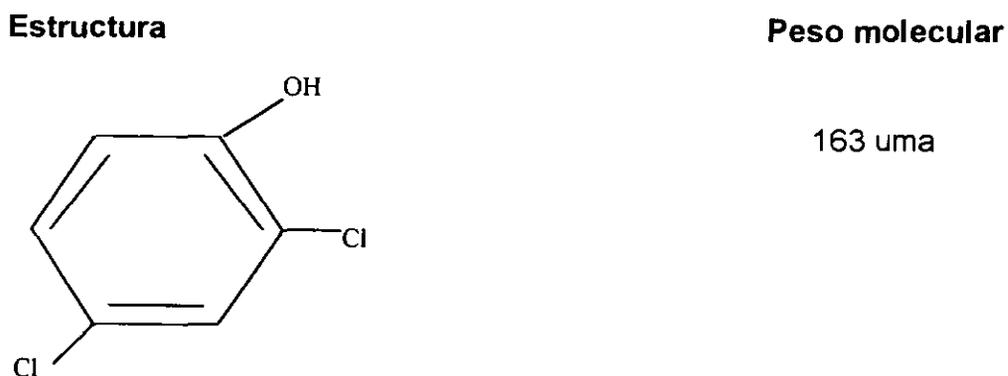
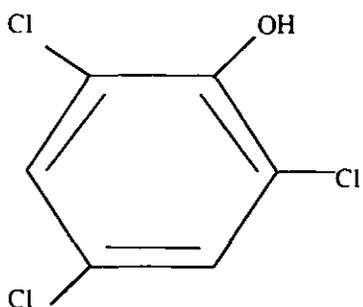


Figura 2. Estructura del 2,4-diclorofenol.

## 2,4,6-Triclorofenol ( $C_6H_3Cl_3O$ )

Compuesto conocido también como **fenaclor**. Es de apariencia sólida color amarillo con fuerte olor fenólico. Se emplea en la manufactura de fungicidas, bactericidas, antisépticos y germicidas. La estructura se muestra en la Figura 3.

**Estructura**



**Peso molecular**

197.45 uma

**Figura 3. Estructura del 2,4,6-triclorofenol.**

### **1.1.2 Características fisicoquímicas**

El comportamiento de los diversos compuestos químicos orgánicos en el ambiente se debe a sus propiedades físicas y químicas. Las propiedades más importantes son: la solubilidad en el agua, la presión de vapor, el coeficiente de partición octanol-agua y la constante de disociación en agua (Mackay *et al.*, 1992).

La **solubilidad** en el agua y la **presión de vapor** son propiedades de "saturación", es decir, son medidas de la capacidad máxima que una fase tiene para contener al compuesto químico. La presión de vapor puede ser vista como la "solubilidad en el aire". La presión de vapor y la solubilidad constituyen una estimación del coeficiente de partición aire-agua ( $K_{AW}$ ) o de la constante de la ley de Henry (H) y, por lo tanto indican

la tendencia relativa de repartición de la sustancia en el aire y en el agua (Mackay *et al.*, 1992).

El coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{OW}$ ), es una estimación de la tendencia de solvatación del compuesto del agua en un medio orgánico. Para las sustancias químicas ionizables es esencial cuantificar la proporción de su ionización en función del pH por medio de la constante de disociación (pKa) (Mackay *et al.*, 1992).

La elección de un mecanismo u otro para la remoción de compuestos tóxicos depende de estas características. Si para cada mecanismo de remoción se identifica una propiedad o característica de la molécula tóxica que la defina, entonces por medio de la valoración de esta propiedad se tendrá una idea de la tratabilidad del contaminante y de su comportamiento en el proceso comparado con otros contaminantes (Bishop, 1980). Es por esto, que se deben conocer sus propiedades fisicoquímicas, para de esta manera hacer una selección adecuada del sistema de depuración. En la Tabla 3 se presentan algunas de las características físicas y químicas de los compuestos de interés.

**Tabla 3. Características físicas y químicas de los clorofenoles.**

Propiedad	Compuesto		
	2-clorofenol	2,4-diclorofenol	2,4,6-triclorofenol
Punto de ebullición (°C)	174.9	209-210	246
Punto de fusión (°C)	9.3	42-43	69
H (atm m <sup>3</sup> / mol)	8.28 x 10 <sup>-6</sup>	6.66x10 <sup>-6</sup>	9.07x10 <sup>-8</sup>
Log K <sub>oc</sub>	2.56	2.96	3.03
pKa	8.48	7.85	7.42
Solubilidad en agua (mg/L)	28,500 <sup>a</sup>	4,600 <sup>a</sup>	420 <sup>b</sup>
Presión de vapor (mmHg)/ 25°C	1.42	0.0089	0.017

H : constante de la ley de Henry

pK<sub>a</sub> : Constante de disociación

<sup>b</sup> 20-25 °C

K<sub>oc</sub> : coeficiente de partición octanol-agua

<sup>a</sup> 20 °C

### 1.2 Mecanismos de remoción para compuestos tóxicos prioritarios

Los mecanismos para la remoción de los compuestos tóxicos prioritarios (entre ellos los fenoles) son: la biodegradación, la desorción<sup>2</sup> con aire, la sorción, la oxidación química, o bien, una combinación de éstos (Kincannon *et al.*, 1983). En cuanto a la tecnología, existe una gran cantidad de métodos disponibles para reducir los compuestos fenólicos de cualquier concentración a los niveles deseados. Tanto procesos físicos, químicos como biológicos han sido aplicados para su tratamiento con diversos porcentajes de remoción. Así, la selección de un tratamiento u otro depende de las características iniciales, las requeridas en el efluente y de los costos, pues muchos sistemas resultan prohibitivos (Sitting, 1973). Por ejemplo:

- ⇒ una descarga en un ecosistema ambientalmente sensible o en una fuente de agua para beber tendrá limitaciones más restringidas que una descarga en un lugar que ya ha sido impactado negativamente (Belhateche, 1995)
- ⇒ un proceso biológico no tiene el mismo costo que uno de membranas, siendo más caro el último.

#### 1.2.1 Procesos físicos

Estos procesos producen un cambio físico en las propiedades de los contaminantes o aprovechan este tipo de propiedades para efectuar la separación. En todo caso la naturaleza química del compuesto permanece sin ser afectada (Belhateche, 1995).

Los procesos de tratamiento físico más empleados en el campo del tratamiento de las aguas residuales industriales son la separación por gravedad (sedimentación), la

---

<sup>2</sup> El término desorción se entenderá para fines de este trabajo como la cantidad de contaminante disuelto que se transfiere de la fase líquida a la fase gaseosa (Eckenfelder, 1989) y no como el movimiento del contaminante sorbido de la fase sólida (biocatalizador) a la fase líquida)

flotación, la evaporación, la filtración, la adsorción en carbón activado, la desorción con aire o vapor y la extracción líquido-líquido. En la Tabla 4 se presentan algunas de las aplicaciones de estos procesos.

**Tabla 4. Procesos físicos para el tratamiento de aguas residuales industriales y su aplicación.**

<i>Proceso</i>	<i>Aplicación</i>
Separación por gravedad	Grasa libre y sólidos suspendidos sedimentables
Flotación	Grasa emulsionada, aceite y sólidos suspendidos finos
Evaporación	Orgánicos volátiles y reducción del volumen de agua
Filtración	Sólidos suspendidos, aceite libre y emulsionado
Adsorción	Compuestos orgánicos y algunos compuestos inorgánicos
Desorción	Orgánicos volátiles y algunos orgánicos semivolátiles
Extracción	Compuestos orgánicos y algunos compuestos inorgánicos

\*Adaptado de Belhateche, (1995).

De ellos, la extracción con solventes y la desorción han mostrado ser eficientes para la remoción de compuestos fenólicos. En el primer caso, porcentajes de hasta 98% para el fenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol fueron reportados por Shuckrow *et al.* (1982). Con frecuencia, los solventes gastados y el aire contaminado deben ser sometidos a un tratamiento secundario, que generalmente es biológico para evitar de esta manera la descarga del residuo al medio ambiente.

La desorción, por su parte, por la importancia que tiene para el análisis de los resultados en esta tesis será tratada a continuación.

### 1.2.1.1 Desorción con aire o vapor

La desorción es un proceso de tratamiento físico en el cual el contaminante disuelto se transfiere de la fase líquida a la corriente gaseosa. La fuerza para la transferencia de masa es el gradiente de concentración entre las fases líquida y gaseosa. En la desorción con aire, la relación de equilibrio está dada por la ley de Henry. Por lo tanto, el proceso sólo se aplica a contaminantes volátiles bajo condiciones atmosféricas normales (Belhateche, 1995) y cuya concentración inicial no exceda 100 mg/L ya que de lo contrario se presentarían problemas de contaminación del aire (Jiménez *et al.*, 1986). Tiene amplia aplicación en el tratamiento de acuíferos contaminados con solventes (Jiménez *et al.*, 1991).

Un compuesto con una constante de Henry grande (del orden  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  atm m<sup>3</sup>/ mol) indica que el contaminante tiene baja solubilidad en agua y por tanto puede ser fácilmente removido por desorción con aire. En general las constantes de Henry aumentan con el incremento de la temperatura y disminuyen al aumentar la solubilidad (Eckenfelder, 1989).

La desorción produce una corriente de gas de salida que generalmente contiene altas concentraciones de compuestos orgánicos que son descargados a la atmósfera. Esta corriente de gas, por tanto, debe ser acompañada de algún tratamiento dependiendo de la naturaleza del contaminante y de la normatividad ambiental.

A pesar de que conceptualmente es posible diferenciar los procesos de tratamiento en físicos, químicos y biológicos, en la práctica la remoción no se da por separado. En lugar de ello, dentro de un mismo proceso se combinan para producir mejores eficiencias de remoción. Por ejemplo, Rittmann (1992) reportó que los procesos de remoción (no biológicos) que ocurren en un tratamiento biológico son la volatilización para una fase gaseosa y la adsorción para una fase sólida. En efecto, la desorción con aire es un proceso físico que puede ocurrir durante un proceso biológico por la aireación

del tanque o por el propio movimiento del agua. Compuestos con constantes de Henry (H) mayores de  $10^{-3}$  atm m<sup>3</sup>/mol, son fácilmente volatilizados cuando otro mecanismo no lo está consumiendo más rápido. En los procesos biológicos, la velocidad de volatilización se puede controlar al regular el gasto de aireación y por tanto la velocidad y el volumen de paso del aire.

Kincannon *et al.* (1983) llevaron a cabo un estudio con el objeto de determinar cuáles eran los mecanismos principales de remoción de compuestos tóxicos prioritarios en un sistema de flujo continuo completamente agitado, en un sistema por lote y en un sistema por lote con adición previa de ozono. Entre los compuestos tóxicos prioritarios con que trabajaron están el fenol y el 2,4-diclorofenol. En la Tabla 5 se muestran algunos de los mecanismos principales de remoción encontrados.

**Tabla 5. Mecanismos de remoción de compuestos tóxicos en un sistema de lodos activados.**

Compuesto	Influyente (mg/L)	Efluyente (mg/L)	% Rem	% removido por		
				Desorción	Sorción	Biodegradación
Fenol	173	≤0.01	≥99.9	0	0	100
2,4-Diclorofenol	75	3.6	95.2	0	0	100
Benceno	15.3	0.04	99.9	16	0	84

\*Adaptado de Kincannon *et al.* (1983).

Se observa que para ambos fenoles la remoción total se lleva a cabo por la acción biológica y que tanto la desorción como la sorción no tienen efecto. Cabe mencionar que la relación del flujo de aire con el volumen de agua en el reactor de flujo continuo fue de 1, lo que explica la ausencia de desorción de los compuestos. En el trabajo, los resultados fueron explicados en términos de la constante de la ley de Henry, que para el 2,4-diclorofenol y fenol son del orden de  $10^{-6}$  atm m<sup>3</sup>/ mol; es por esto, que son menos desorbibles que aquellos con constantes del orden de  $10^{-3}$  atm m<sup>3</sup>/ mol, como es el caso del benceno.

A pesar de que existe una gran cantidad de trabajos referentes a la degradación de compuestos clorofenólicos (Apajalahti y Salkinoja-Salonen, 1989; Sáez y Rittmann, 1991; Fava *et al.*, 1995 y Bae *et al.*, 1997), la información acerca de su desorción con aire es muy contradictoria. En la Tabla 6 se observan los resultados de varios trabajos.

Tabla 6. Desorción con aire de los clorofenoles en varios estudios.

Compuesto	Concentración (mg/L)	Observaciones	Referencia
<b>Reportan desorción</b>			
2-Clorofenol	25 y 50	Reactor agitado, operación por lote Oxígeno disuelto a saturación k = 0.041 % remoción por desorción = 31%.	Sáez y Rittmann (1991)
2-Clorofenol	138	Matraz agitado, operación por lote Relación aire/agua = 0.2 VVM % remoción por desorción = 23%.	Armenante <i>et al.</i> (1992)
2-Clorofenol	128	Matraz agitado Agitación 150 rpm Sin aireación % remoción por desorción = 6.5±2 %.	Kafkewitz <i>et al.</i> (1996)
<b>No reportan desorción</b>			
2-Clorofenol	2	Fermentador operación por lote Relación aire/agua = 1 VVM	Dapaah y Hill (1992)

### 1.2.2 Procesos químicos

Estos procesos manipulan las propiedades químicas de los contaminantes o los transforman facilitando de esta manera su remoción. Los productos finales del proceso químico deben ser fácilmente separables, o bien, inocuos y no producir problemas en el efluente (es el caso del dióxido de carbono o el agua). Los procesos generalmente empleados en el tratamiento de aguas residuales son la precipitación química, la coagulación-floculación, la recuperación electrolítica, el intercambio iónico, la ósmosis inversa, la oxidación y la reducción química (Belhateche, 1995). En la Tabla 7 se presentan las aplicaciones de estos procesos.

**Tabla 7. Procesos químicos para el tratamiento de aguas residuales industriales.**

<b>Proceso</b>	<b>Aplicación</b>
Precipitación química	Compuestos inorgánicos y metales
Recuperación electrolítica	Compuestos orgánicos e inorgánicos en altas concentraciones y metales
Intercambio iónico	Compuestos orgánicos e inorgánicos en bajas concentraciones y metales
Oxidación/reducción química	Compuestos orgánicos en altas concentraciones y algunos compuestos inorgánicos

\*Adaptado de Belhatche (1995).

Entre estos procesos, la coagulación-floculación ha mostrado ser eficiente para la remoción de compuestos fenólicos cuando se hallan asociados con coloides o sólidos suspendidos. Shuckrow *et al.*, (1982) alcanzaron porcentajes de remoción mayores al 90% para fenol utilizando alúmina, un 96% con una mezcla de cal-alúmina y sólo un 29% utilizando un polímero.

### 1.2.3 Procesos biológicos

Estos procesos utilizan microorganismos para producir un cambio en las propiedades tanto físicas como químicas para causar la descomposición del contaminante de interés en el agua residual. La descomposición o metabolismo de los compuestos orgánicos produce masa biológica así como la energía necesaria por los microorganismos para mantenerse vivos; en otras palabras, los contaminantes sirven de "comida". Los procesos de tratamiento biológico que generalmente se encuentran para el tratamiento de aguas residuales industriales incluyen los procesos de lodos activados, las lagunas aireadas, las lagunas de estabilización, los filtros rociadores o los reactores de película fija y los procesos anaerobios. En la Tabla 8 se presentan las aplicaciones de estos procesos.

Tabla 8. Procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales industriales.

Proceso	Aplicación
Lodos activados	Bajas concentraciones de compuestos orgánicos y algunos compuestos inorgánicos
Lagunas aireadas y de estabilización	Bajas concentraciones de compuestos orgánicos y algunos compuestos inorgánicos
Filtros rociadores y reactores de película fija	Bajas concentraciones de compuestos orgánicos y algunos compuestos inorgánicos
Degradación anaerobia	Bajas concentraciones de compuestos orgánicos, compuestos orgánicos clorados y compuestos inorgánicos

\*Adaptado de Belhateche (1995).

El éxito de la degradación y las concentraciones que puedan degradar los microorganismos involucrados en la actividad biológica depende de la existencia de otros contaminantes, de si estos contaminantes son tóxicos, así como de las condiciones de operación (Buitrón *et al.*, 1997).

En el caso específico de efluentes con concentraciones de fenoles intermedias (5 a 500 mg/L) los tratamientos biológicos son ampliamente usados. Entre estos se incluyen las lagunas, los filtros rociadores y los lodos activados. A pesar de que éstas son las concentraciones que se consideran rentables para la degradación biológica de estos compuestos se ha reportado que concentraciones mayores han sido tratadas exitosamente (Sitting, 1973).

Hanna *et al.* (1986) llevaron a cabo una comparación de cuatro sistemas biológicos para la remoción de compuestos tóxicos volátiles, semivolátiles y metales. Entre los compuestos semivolátiles (con constantes de Henry del orden de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ ) se encontraron el fenol, el 2,4-diclorofenol y el pentaclorofenol. Los tratamientos fueron lodos activados, filtros rociadores, laguna aireada y laguna facultativa. En la Tabla 9 se muestran los porcentajes de remoción alcanzados. Los porcentajes mayores se obtuvieron con el de lodos activados probablemente debido a la desorción. En todos los casos, las concentraciones de los compuestos en la alimentación del sistema son bajas (del orden de  $\mu\text{g/L}$ ).

Tabla 9. Remoción de compuestos semivolátiles con diferentes procesos.

Compuesto	Influente µg/L	% remoción			
		Lodos activados	Filtro rociador	Laguna aireada	Laguna facultativa
Fenol	126	86	50	30	86
2,4-diclorofenol	228	99	31	48	73
Pentaclorofenol	84	96	4	37	74

\*Adaptado de Hanna *et al.*, (1986).

A pesar de que los sistemas biológicos de tratamiento como los lodos activados y las lagunas aireadas principalmente, se han utilizado para la eliminación de estos compuestos tóxicos, también se ha encontrado que presentan ciertos problemas (Torres, 1994):

- ⊗ Los microorganismos tienen periodos de adaptación prolongados (entre 2 y 4 meses).
- ⊗ Existe baja especificidad frente a otras fuentes de carbono, comúnmente encontradas en aguas residuales.
- ⊗ Las concentraciones máximas admisibles del tóxico para degradar no son muy altas.
- ⊗ Generan gran cantidad de lodos residuales que contienen el tóxico en concentraciones importantes por lo que pueden constituir un residuo peligroso.

Por esta razón, se han desarrollado una gran cantidad de trabajos tanto con la aplicación de diferentes cultivos puros de microorganismos como de formas de operación en el tratamiento de aguas residuales. En la Tabla 10 se presentan los resultados de algunos de éstos para los tres compuestos considerados en el presente estudio. Nuevamente se observa que las concentraciones de trabajo son muy bajas (de 2 a 350 mg/L) en relación con las concentraciones empleadas en esta tesis.

**Tabla 10. Concentraciones de tres clorofenoles y condiciones de trabajo usadas por varios autores.**

Compuesto	Concentración (mg/L)	Condiciones	Referencia
2-Clorofenol	50	T = 23-25 °C, pH = 6.7-6.8	Sáez y Rittmann (1991)
2-Clorofenol	2	T = 30±0.2 °C, pH = 6.5-6.8, flujo aire = 0.5 L/min, V = 500 mL	Dapaah y Hill (1992)
2-Clorofenol	250-350	T = 39 °C, pH = 4.2-4.5, 400 rpm, flujo aire = 2 L/min, V = 10 L	Armenante <i>et al.</i> (1992)
2-Clorofenol	10	T = 21±1 °C, 150 rpm	Lu <i>et al.</i> (1996)
2-Clorofenol	10	T = 30 °C, 120 rpm	Bae <i>et al.</i> (1997)
2-Clorofenol	10-50		Lee <i>et al.</i> (1994)
2,4-Diclorofenol	20-40	N.E.	
2,4-Diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol	30	T = 15 °C, V= 500 mL, flujo de aire no determinado	Buitrón <i>et al.</i> (1997)
2,4-Diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol	10	T = 30 °C, 120 rpm, V= 200 mL	Bae <i>et al.</i> (1997)

N.E. : No especificadas

### 1.2.3.1 Microorganismos degradadores de compuestos tóxicos

Hay una gran cantidad de microorganismos capaces de degradar compuestos tóxicos como los fenoles y clorofenoles. Se emplean consorcios bacterianos, y cultivos puros de bacterias, hongos o levaduras para degradar estos compuestos tanto aerobia como anaerobiamente. En la mayoría de los casos ocurre una mineralización completa. Las velocidades de desaparición dependen del tipo y grado de aclimatación de la población y de las condiciones ambientales (Rochkind-Dubinsky *et al.*, 1987).

En la Tabla 11 se señalan algunos de ellos, donde se observa que el género de las *Pseudomonas* es uno de los más comunes.

Tabla. 11. Microorganismos degradadores de compuestos fenólicos.

<i>Microorganismo</i>	<i>Compuesto y concentración</i>	<i>Referencia</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol	Cabello (1995)
<i>Pseudomonas putida</i>	4-Clorofenol (50 mg/L)	Sáez y Rittmann (1991)
<i>Pseudomonas putida</i>	Fenol (90 mg/L)	Allsop <i>et al.</i> (1993)
<i>Pseudomonas putida</i>	Fenol, 2-clorofenol (2 mg/L): 3-clorofenol y 4-clorofenol (9 mg/L)	Dapaah y Hill (1992)
<i>Pseudomonas pickettii</i>	2-Clorofenol (128 mg/L) y 4-clorofenol (96 mg/L)	Kafkewitz <i>et al.</i> (1996)
<i>Pseudomonas pickettii</i>	2,4,6-Triclorofenol (99 mg/L)	Kiyohara <i>et al.</i> (1992)
<i>Pseudomonas pickettii</i>	2-Clorofenol (194 mg/L), 3-clorofenol (73 mg/L) y 4-clorofenol (96 mg/L)	Fava <i>et al.</i> (1995)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Fenol, 2-clorofenol, 3-clorofenol y 4-clorofenol (64 mg/L)	Katayama-Hirayama <i>et al.</i> (1994)
<i>Rhodococcus chlorophenolicus</i>	2,3,4-, 2,3,5-, 2,3,6-, 2,4,6-, 2,4,5- Triclorofenol (0.4-2 mg/L)	Apajalahti J.H.A. y S. Salkinoja-Salonen (1986)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2-Clorofenol	Armenante <i>et al.</i> (1992)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2,4,6-Triclorofenol (45 mg/L)	Armenante <i>et al.</i> (1994)
<i>Arthrobacter sp.</i>	Fenol (800 mg/L)	Vijayaraghavan <i>et al.</i> (1995)
<i>Rhodococcus sp.</i>	Fenol (1000 mg/L)	Pai <i>et al.</i> (1995)
Cultivo mixto	2,4,6-Triclorofenol (18.75 mg/L)	Kafkewitz <i>et al.</i> (1992)
Cultivo mixto	4-Clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol (20 mg de fenoles totales/L)	González y Buitrón (1995)

### 1.2.3.2 *Pseudomonas fluorescens*

Los miembros del género *Pseudomonas* son muy comunes en la naturaleza y pueden ser aislados de una gran cantidad de materiales. Las características morfológicas básicas para todas las especies son su forma de bastón recto y la presencia de uno o varios flagelos polares (Foto 1). Las *Pseudomonas* no producen esporas y son de reacción Gram negativo.

Entre los criterios para llevar a cabo la subdivisión del género *Pseudomonas* se encuentran la morfología (forma y tamaño), el número de flagelos, los materiales de reserva, los pigmentos, relaciones de temperatura, los requerimientos para el crecimiento y las reacciones bioquímicas.

La *Pseudomonas fluorescens* seleccionada para llevar a cabo la degradación de compuestos fenólicos tiene más de un flagelo, presenta la producción de un pigmento fluorescente y tienen reacciones positivas de desnitrificación, de oxidasa y de arginina hidrolasa. Crece a 4 °C (O'Leary, 1990).

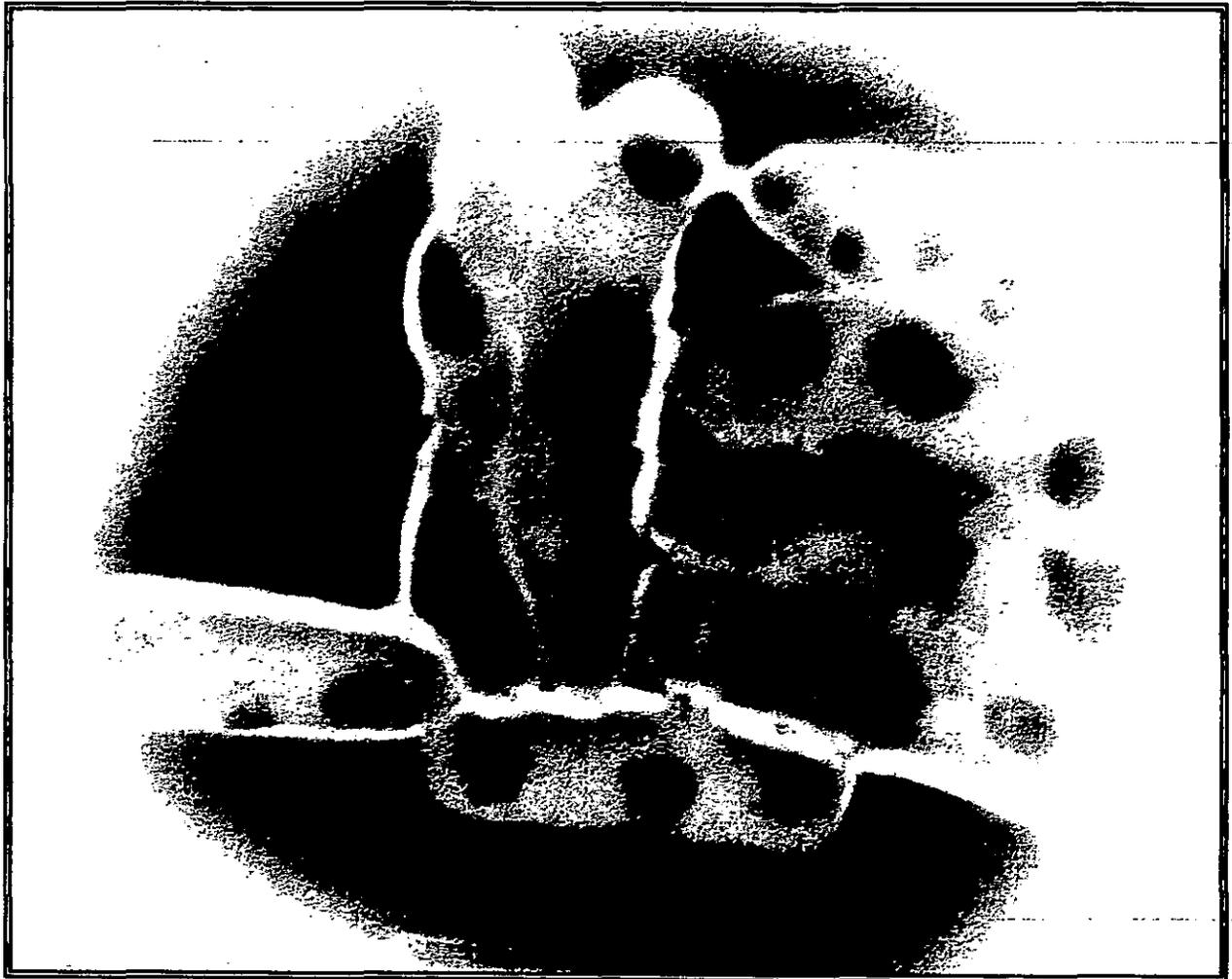


Foto 1. Microfotografía de la cepa *Pseudomonas fluorescens*.

### **1.3 Inmovilización como alternativa en el tratamiento de aguas residuales**

La tecnología de células inmovilizadas es un método en uso comercial para el atrapamiento y el funcionamiento de ciertas especies de bacterias y su aplicación ha sido exitosa en el campo de tratamiento de aguas residuales (Kennedy y Cabral, 1983).

Karel *et al.* (1985) definen a la inmovilización como el confinamiento físico o la localización de células intactas en una cierta región específica de espacio con la preservación de las actividades catalíticas deseadas. Otra definición de Skjak-Braek y Martinsen (1991) dice que es cuando una célula, microorganismo o enzima cualquiera en su estado soluble (móvil) es transferida a un estado insoluble sin pérdida de su actividad, aunque en algunos casos la célula inmovilizada pierde momentáneamente parte de su actividad y es recuperada en condiciones adecuadas de operación.

El uso de células completas en lugar de enzimas aisladas para la degradación de contaminantes en agua parece ser ventajoso, ya que las enzimas están menos protegidas de la inactivación en comparación con las células completas que cuentan con una pared celular y membrana. También de esta forma, la degradación se lleva a cabo por una serie de enzimas y co-enzimas que trabajan en conjunto o secuencialmente. Tales sistemas son difíciles de reconstruir utilizando enzimas extraídas, purificadas e inmovilizadas (Cheetham y Bucke, 1984).

#### **1.3.1 Tipos de inmovilización**

Existe una gran variedad de técnicas para llevar a cabo la inmovilización. Las cuatro principales según Karel *et al.* (1985) y Zlokarnik *et al.* (1990) se muestran en la Figura 4 y se describen a continuación.

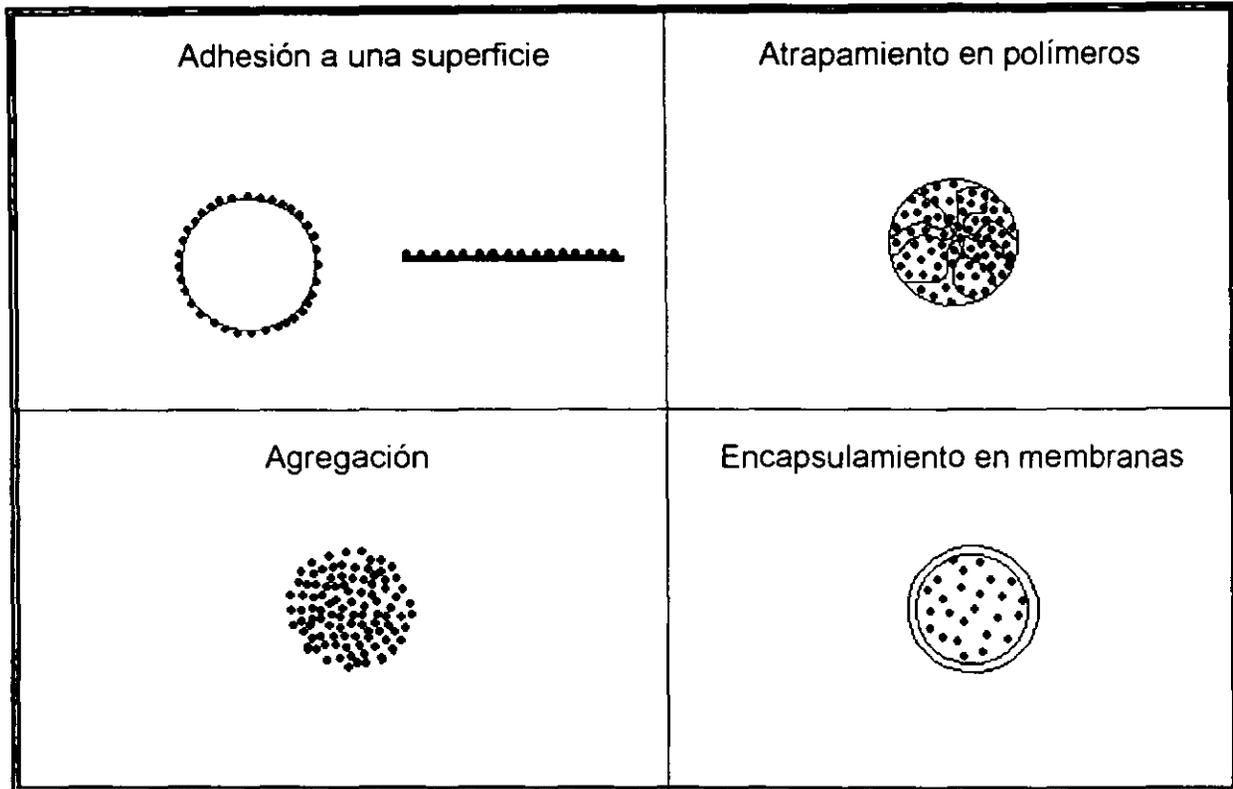


Figura 4. Tipos de inmovilización.

**a) Adhesión a una superficie (biopelícula)**

Es la forma más común en el campo del tratamiento de agua. En ésta se encuentra la adhesión en superficies o bien en los poros de arena, del vidrio, el plástico, las resinas de intercambio iónico, el carbón activado, el carbón, la lava, la cerámica y las esponjas.

**b) Atrapamiento en polímeros**

La inmovilización por atrapamiento se lleva a cabo en diversos materiales, principalmente geles como el alginato, la k-carragenina, la acrilamida o el colágeno. La aplicación de alginato de calcio es uno de los métodos más simples que ha encontrado un amplio uso en laboratorio y a gran escala, incluyendo la construcción de reactores para la degradación de contaminantes en agua (Cheetham y Bucke, 1984).

### **c) Agregación**

Este tipo de inmovilización puede ser natural o artificial. Dentro de la natural se puede mencionar la floculación de bacterias o la formación de agregados en los hongos; dentro de la artificial está el uso de un soporte formado por el entrecruzamiento de flóculos con glutaraldehído, polielectrolitos o hidróxidos de metales.

### **d) Encapsulamiento en membranas**

Puede usarse una membrana sólida o membrana líquida. Dentro de la sólida se encuentran las de fibras y la microencapsulación. En las líquidas se encuentran las microemulsiones.

A continuación se describe con mayor detalle el método de inmovilización empleado en este trabajo.

### **1.3.2 Alginato de calcio**

El alginato es un copolímero de ácidos D-manurónico y L-gulurónico en diferentes proporciones unidos con enlace 1,4, y arreglo secuencial que no tiene una unidad repetida regularmente (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990). Las propiedades del gel están fuertemente relacionadas con la proporción y longitud de los bloques contiguos del ácido L-gulurónico (bloques G) en las cadenas poliméricas y depende del organismo del cual ha sido aislado (Martinsen *et al.*, 1989).

Los alginatos son comercialmente producidos por *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* y *Ascophyllum nodosum*.

En especial, las propiedades mecánicas y de desbaratamiento de las esferas de alginato dependen de la composición, la estructura de bloque y el tamaño molecular de las moléculas de alginato. El tamaño y la esfericidad de las partículas dependen principalmente de la viscosidad de la solución de alginato de sodio y de la distancia que recorren las gotas de alginato soluble entre la jeringa de extrusión y la solución de  $\text{CaCl}_2$  (Smidsrod y Skjak-Braek, 1990).

Las células atrapadas en alginato de calcio han sido utilizadas en muchos casos. Sin embargo una de las limitaciones para el uso del alginato como matriz de inmovilización es su inestabilidad en presencia de compuestos quelantes como los fosfatos, los citratos y los lactatos o ante cationes anti-gelantes como el  $\text{Na}^+$  o el  $\text{Mg}^{+2}$ . Para contrarrestar este problema se pueden guardar las esferas en una solución que contenga milimoles de iones calcio libre, o bien, reemplazando el ión calcio por otros que tengan mayor afinidad por el alginato como el Pb, Cu y Cd (Skjak-Braek y Martinsen, 1991). A pesar de esto, se ha elegido como un agente de inmovilización para este estudio por su alta afinidad con el agua, carencia de toxicidad y rápida formación del gel en la presencia de iones calcio, además de ser un método sencillo de inmovilización.

### **1.3.3 Características físicas de un soporte de alginato**

Sánchez de la Vega (1996) llevó a cabo la caracterización física del soporte (Tabla 12) utilizado como matriz de inmovilización para las *Pseudomonas fluorescens*. El soporte utilizado se preparó con soluciones de alginato a diferentes concentraciones (desde 2% a 3%). Algunas de las características físicas determinadas fueron el tamaño de partícula, la densidad real, la densidad aparente, la humedad, la fracción de vacíos y la capacidad de atrapamiento celular.

Tabla 12. Caracterización física del biocatalizador.

Parámetro	Concentración de alginato en el soporte	
	2%	3%
Diámetro del soporte (mm)	2.38	2.38
Densidad real (g/mL)	ND	1.05 <sup>a</sup>
Densidad aparente (g/mL)	ND	0.95 <sup>a</sup>
Humedad total (%)	93	93
Fración de vacíos	0.63	0.69
Capacidad de atrapamiento (UFC/ g soporte)	$3.85 \times 10^{14}$ <sup>b</sup>	ND

a: Diámetro de 1.13 mm, b: Relación alginato/células (2%/18.77% p/v), ND: No disponible

El alginato de sodio utilizado aquí fue de diferente lote por lo que la caracterización se realizó nuevamente.

### 1.3.3.1 Tamaño de partícula

Katzbauer *et al.*, (1995) definieron al *diámetro crítico* como aquél a partir del cual las limitaciones difusionales afectan la velocidad y la degradación. En otras palabras, la partícula debe ser suficientemente pequeña para evitar las limitaciones en la transferencia de masa de tal manera que las células atrapadas (tanto internas como externas) estén expuestas a la misma concentración de sustrato y de producto.

Katzbauer *et al.* (1995) han reportado mayores velocidades de fermentación con esferas de k-carragenina de 0.5 a 1 mm que con esferas de 1 a 2 mm. También se ha reportado que los geles de alginato permiten una rápida difusión de moléculas pequeñas. En la Tabla 13 se presentan algunos de los diámetros obtenidos al usar alginato de sodio como material de inmovilización.

Tabla 13. Valores de diámetro de biocatalizadores reportados por varios autores.

<i>Diámetro de la esfera (mm)</i>	<i>Referencia</i>
0.2-3	Smidsrod y Skjak-Braek (1990)
1.9-4.5	Cheetham <i>et al.</i> (1979)
2.4	Van Ginkel <i>et al.</i> (1983)
3-4	Martinsen <i>et al.</i> (1989)
3	Keweloh <i>et al.</i> (1989)
3	Westmeier y Rehm (1985)
3	Zache y Rehm (1985)
3-4	Wu <i>et al.</i> (1994)
3.5-4.5	Martinsen <i>et al.</i> (1992)
4.1-4.6	Jang (1994)
5	Cheetham y Bucke (1984)

### 1.3.3.2 Fracción de vacíos

La fracción de vacíos representa el volumen interpartícula no ocupado por el catalizador que queda disponible para ser ocupado por el líquido de la reacción. Este valor es necesario para determinar el volumen del reactor de lecho empacado requerido (Quirasco, 1994). La cantidad de agua que puede ser sustituida por el líquido de la reacción es el agua libre de hidratación del gel y por lo tanto para determinar la fracción de vacíos se debe eliminar el agua libre de hidratación. En este tipo de curvas se observan tres periodos de secado:

- En el primero hay una alta velocidad de evaporación y la velocidad va en aumento.
- En el segundo, se presenta un equilibrio entre la velocidad de transferencia de calor y la velocidad de transferencia de masa en la superficie. La velocidad de secado es así casi constante, pues el agua libre se difunde dentro del sólido hacia la superficie en la cual se evapora a una tasa constante.

- En el tercer periodo la velocidad de secado decrece. Comienza cuando se alcanza el contenido crítico de humedad. Aquí el agua libre ya ha sido eliminada y el agua ligada comienza a evaporarse dentro de la partícula y se difunde fuera de ella hacia el gas que la rodea.

### 1.3.3.3 Capacidad de atrapamiento

En un sistema sin limitaciones difusionales, la concentración de biomasa dentro de las esferas determina la velocidad de reacción. Se busca entonces lograr altas velocidades incrementando la concentración de la biomasa en el empaque hasta un punto óptimo (Lakhwala y Sofer, 1991). Sin embargo, una alta carga celular puede afectar las propiedades mecánicas del biocatalizador (Sánchez de la Vega, 1996 y Karel *et al.*, 1985). En la Tabla 14 se presentan algunos valores empleados.

Tabla 14. Valores de la capacidad de atrapamiento reportada por algunos autores.

Concentración de alginato en la mezcla (%)	Cantidad celular en el biocatalizador (UFC/mL)	Referencia
2	$1 \times 10^5$	Keweloh <i>et al.</i> (1990)
3,4 y 5	$1 \times 10^6$ a $1 \times 10^7$	Boross <i>et al.</i> (1990)
4	$1 \times 10^7$	Chevalier y de la Noue (1988)
4	$2.5 \times 10^8$	Marwaha <i>et al.</i> (1990)
2-3	$10^{14}$	Sánchez de la Vega (1996)

### 1.3.4 Ventajas y desventajas de la inmovilización

El uso de células inmovilizadas tiene muchas ventajas (Cheetham y Bucke, 1984):

- ☞ El aumento de la actividad volumétrica del sistema.
- ☞ La capacidad de reúso de las células inmovilizadas.
- ☞ La facilidad con la cual se pueden separar las células de la mezcla de reacción.

- ☞ La capacidad para dispersar las células aún inmovilizadas de tal manera que se minimicen las restricciones difusionales en las velocidades de reacción.
- ☞ La posibilidad de obtener biocatalizadores con altas actividades que pueden ser mantenidos hasta por meses.
- ☞ La facilidad con la que las células inmovilizadas pueden ser usadas para explotar las características cinéticas de los reactores agitados continuos y empacados.
- ☞ La minimización de la inhibición por productos tóxicos (Lee *et al.*, 1994 y Keweloh *et al.*, 1989).
- ☞ La capacidad de degradar los compuestos de interés tanto a bajas como a altas concentraciones, lo que los hace adecuados para el tratamiento de agua potable, residual doméstica e industrial.
- ☞ La baja producción de lodo contaminado.

Sin embargo, estos sistemas presentan ciertas desventajas. Uno de los problemas es la transferencia de masa. Según Oyaas *et al.* (1995) la velocidad de transporte de sustrato y de productos en los biocatalizadores está influenciada por la transferencia de masa del medio a la capa de líquido que rodea la partícula y posteriormente por la transferencia de la masa en el gel. Estapé *et al.* (1992) y Scott *et al.* (1989), determinaron los coeficientes de difusión de glucosa y etanol en el alginato de calcio. Diferentes técnicas han sido utilizadas para determinar este fenómeno y algunas de ellas son citadas por Brito *et al.* (1990) y Scott *et al.* (1989), sin embargo, éstas aún son un problema en la práctica.

### 1.3.5 Aplicación

Lee *et al.* (1994) estudiaron el efecto de inmovilizar células de un consorcio bacteriano para degradar fenol y clorofenoles. Los resultados obtenidos mostraron que éstas remueven mayores concentraciones comparadas con los sistemas de células libres. Con

el sistema inmovilizado biodegradaron al 100% 522 mg/L de fenol en 8 días, mientras que con células libres no se alcanzó ni un 5% de remoción en el mismo tiempo. El 2-clorofenol a una concentración de 62 mg/L fue degradado al 100% por células inmovilizadas en 27 días mientras que con células libres se alcanzó apenas 75% de remoción en el mismo tiempo. Por otro lado, las células inmovilizadas degradaron al 100% el 2,4-diclorofenol a concentraciones de 45 y 90 mg/L en 5 días. Concluyeron que el uso de células inmovilizadas reduce la fase lag de la biodegradación lo que incrementa la velocidad de degradación.

Por otro lado, Rosas *et al.* (1995) compararon la operación de columnas empacadas con tezontle, carbón activado y alginato de calcio, en las cuales se inmovilizó *P. fluorescens* para la remoción de fenol y clorofenoles de una corriente acuosa. El tezontle y el alginato de calcio resultaron ser los materiales más adecuados para la inmovilización de células ya que alcanzaron porcentajes de remoción de 95% y 98% para 1000 mg/L de fenol, respectivamente. En el caso específico de alginato de calcio la biodegradación de 1000 mg/L de fenol se llevó a cabo en tan sólo 5 días.

### 1.4 Caracterización cinética

Todos los procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales se llevan a cabo en un volumen definido de reacción. Los cambios en la composición y en la concentración de los materiales que ocurre mientras el agua residual es retenida en el reactor son factores importantes para el tratamiento. Estos cambios son causados por un transporte hidráulico de materiales dentro y fuera del reactor así como por las reacciones que ocurren. Para definir completamente un sistema de reactores y diseñar otros similares es necesario conocer la velocidad a la cual ocurren y se llevan a cabo los cambios, así como conocer el régimen hidráulico.

### 1.4.1 Velocidades de reacción

Las velocidades de reacción pueden ser clasificadas con base en:

- ☞ El número de moléculas que reaccionan para formar el producto.
- ☞ La cinética, por el orden de reacción.

Esta última clasificación es muy útil para describir la mayoría de los procesos biológicos y dimensionar los reactores. Los diferentes órdenes de reacción pueden ocurrir debido a variaciones en los organismos, sustratos o condiciones ambientales. La relación entre la velocidad de reacción, concentración del reactante y el orden de la reacción ( $n$ ), está dada por la expresión

$$v = kC^n \quad [1.1]$$

donde

$v$  : velocidad [ $M L^{-3} t^{-1}$ ]

$C$  : concentración [ $M L^{-3}$ ]

$n$  : orden de reacción

$k$  : constante de la velocidad de reacción [ $L^{n-1} M^{1-n} t^{-1}$ ]

Si se toma el logaritmo de ambos lados de la ecuación se tiene

$$\ln v = n \ln C + \ln k \quad [1.2]$$

Con ayuda de la ecuación [1.2] los resultados experimentales pueden ser interpretados para establecer un orden de reacción y una velocidad. Para cualquier reacción de orden constante, al graficar el logaritmo de la velocidad instantánea de cambio de la concentración del reactante en cualquier momento en función del logaritmo de la

concentración en ese instante se obtiene una línea recta y la pendiente será el orden de la reacción (Figura 5).

### 1.4.1.1 Reacciones de orden cero

En estas reacciones, la velocidad es independiente de la concentración o es la misma a cualquier concentración del reactante. Las reacciones de orden cero resultarán en una línea horizontal al aplicar la ecuación [1.2] (Figura 5) y la representación gráfica de la variación del reactante con respecto al tiempo dará una respuesta lineal (Figura 6), de acuerdo a la ecuación [1.3].

$$C = C_0 - kt \quad [1.3]$$

donde

$C_0$  : concentración inicial [ $M L^{-3}$ ]

$t$  : tiempo [t]

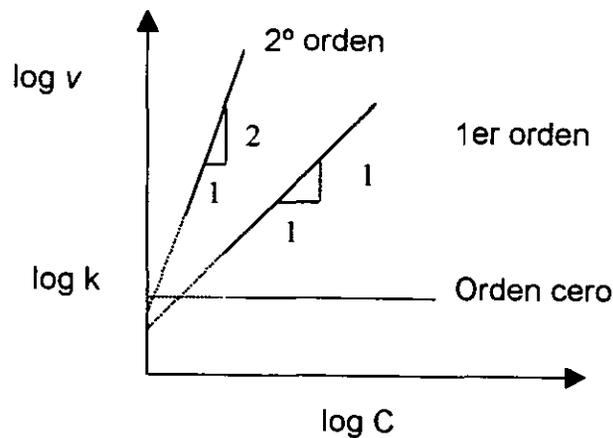


Figura 5. Determinación del orden de reacción.

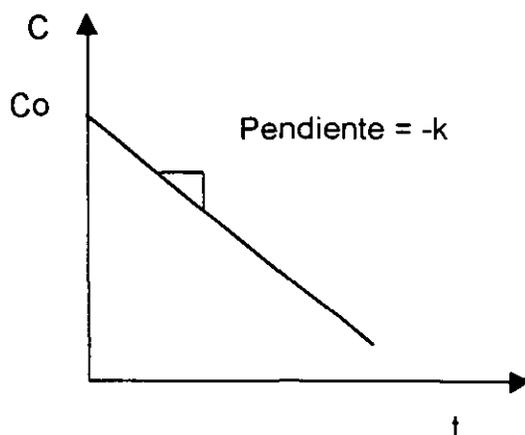


Figura 6. Representación gráfica de una reacción de orden cero.

#### 1.4.1.2 Reacciones de primer orden

Para este tipo de reacciones la velocidad es directamente proporcional a la concentración del reactante, y puesto que la velocidad de la reacción depende de la concentración del reactante y ésta a su vez cambia con el tiempo, la representación gráfica de la variación de la concentración del reactante con el tiempo no da una respuesta lineal (Figura 7). Sin embargo, la gráfica de  $\ln C$  contra tiempo dará una línea cuya pendiente será igual a  $-k$  (Figura 8), de acuerdo con la ecuación [1.5].

$$\ln\left(\frac{C_0}{C}\right) = kt \quad [1.4]$$

o en forma más familiar

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad [1.5]$$

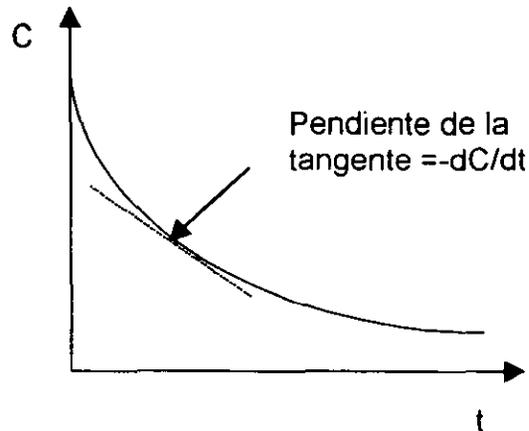


Figura 7. Representación gráfica del curso de una reacción de primer orden.

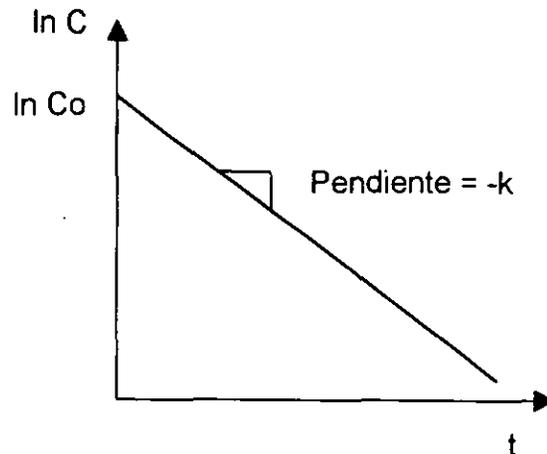


Figura 8. Representación del  $\ln C$  vs tiempo.

### 1.4.1.3 Reacciones de segundo orden

En las reacciones de segundo orden, la velocidad es proporcional a la concentración del reactante al cuadrado. Una representación gráfica de  $1/C$  contra el tiempo da un trazo lineal con una pendiente de valor  $k$  (Figura 9), de acuerdo con la ecuación

$$1/C = 1/C_0 + kt$$

[1.6]

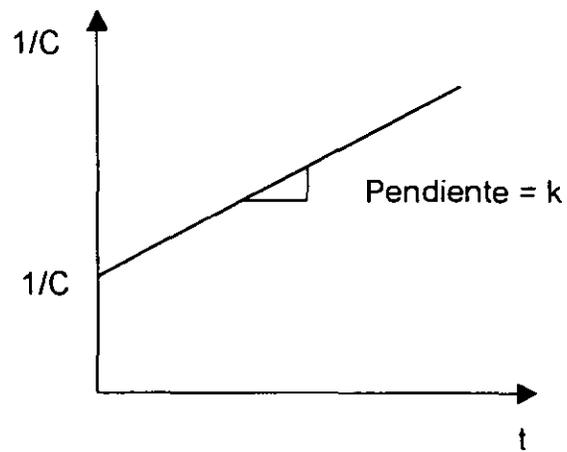


Figura 9. Representación del curso de una reacción de segundo orden.

# ***CAPITULO 2***

*Materiales y Métodos*

## 2. Materiales y métodos

El desarrollo experimental se dividió en cinco etapas. En la primera, se realizó la **caracterización microbiológica** de *Pseudomonas fluorescens*. En la segunda etapa se realizaron las pruebas testigo para determinar otros posibles mecanismos de remoción, como desorción y adsorción. En la tercera etapa se llevó a cabo la remoción de los clorofenoles utilizando un reactor agitado con células libres en suspensión, semejando un sistema de lodos activados. En la cuarta etapa se realizó la remoción de los clorofenoles en un reactor agitado con células inmovilizadas en suspensión, semejando un sistema de lodos activados modificado. Por último, en la quinta, se llevó a cabo la remoción de los tres clorofenoles utilizando una columna empacada (con el biocatalizador) en un modo de recirculación total.

### 2.1 Etapa I. Caracterización microbiológica de *Pseudomonas fluorescens*

En esta etapa se determinaron las principales características de la bacteria con el objeto de confirmar su identidad.

La cepa *Pseudomonas fluorescens* fue donada por el Instituto Cubano de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (ICIDCA) de La Habana, Cuba. Esta cepa fue extraída de sedimentos marinos y caracterizada por Cabello (1995) por su alto potencial para degradar fenol, clorofenoles, nitrofenoles y metilfenoles, y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). La cepa se recibió en *slants* y se transfirió para su conservación a cajas Petri con medio YPG-agar, conservándose en refrigeración a 10°C. La composición de los medios utilizados se encuentra en el ANEXO A.

La caracterización microbiológica se llevó a cabo al inicio y al final de la experimentación, para de esta manera asegurar la pureza de la cepa así como la

conservación de sus características. Esto se realizó por medio del uso del sistema API. La descripción general del procedimiento se encuentra en el ANEXO B.

### **2.2 Etapa II. Pruebas testigo**

Estos experimentos se llevaron a cabo con el objeto de determinar otros mecanismos de remoción existentes en los sistemas utilizados en la experimentación (células libres en reactor agitado tipo lodos activados, células inmovilizadas en reactor agitado tipo lodos activados modificado y el sistema de columna empacada). Se realizó la prueba de descomposición, la prueba de desorción y la prueba de adsorción.

#### **2.2.1 Prueba de descomposición**

Esta prueba se realizó con el propósito de determinar un posible mecanismo de remoción en las soluciones clorofenólicas expuestas al ambiente y a la luz solar.

Estos experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer conteniendo 200 mL de cada solución clorofenólica, sin bacterias y sin aplicación de aire. Los matraces permanecieron abiertos durante el tiempo de experimentación a temperatura ambiente ( $19 \pm 2$  °C). Las concentraciones utilizadas para el 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol fueron de cerca de 1000 mg/L y la concentración de 2,4,6-triclorofenol fue de aproximadamente 300 mg/L. La concentración de los clorofenoles fue monitoreada durante 97 horas.

### **2.2.1.1 Parámetros de monitoreo**

Para esta etapa se midió la concentración de clorofenoles, periódicamente durante 97 horas.

### **2.2.1.2 Técnicas analíticas**

Para evaluar los clorofenoles se utilizó la técnica colorimétrica de la 4-aminoantipirina de los Métodos Estándar (APHA, AWWA, WPCF, 1995). El límite de detección de esta técnica es de 0.01 mg/L de fenol. La presencia de bacterias, sustancias reductoras o valores de pH alcalino son algunas de las interferencias en la aplicación de esta técnica. En el ANEXO C se describe el método.

### **2.2.2 Prueba de desorción**

Estas pruebas se realizaron con el objeto de medir el efecto de desorción con aire de los compuestos clorofenólicos. La prueba se realizó en un sistema como el mostrado en la Figura 10.

La prueba de desorción se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL que contenían 200 mL de la solución clorofenólica en un matraz y el mismo volumen de agua en el otro. La temperatura se mantuvo a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , la agitación fue de 200 rpm y el oxígeno fue suministrado por medio de compresores de aire con un flujo de  $1.9\pm 0.72$  L/min.

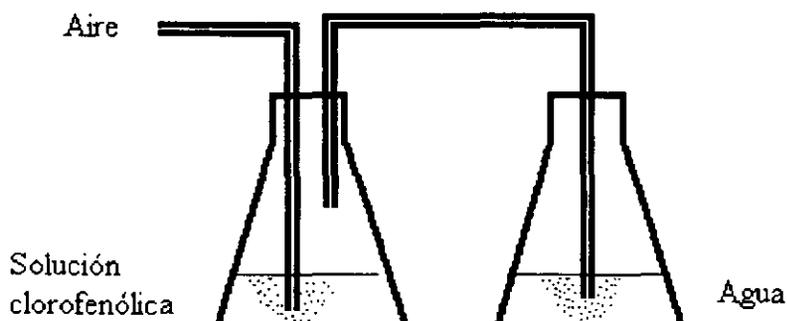


Figura 10. Esquema del sistema utilizado en la prueba de desorción.

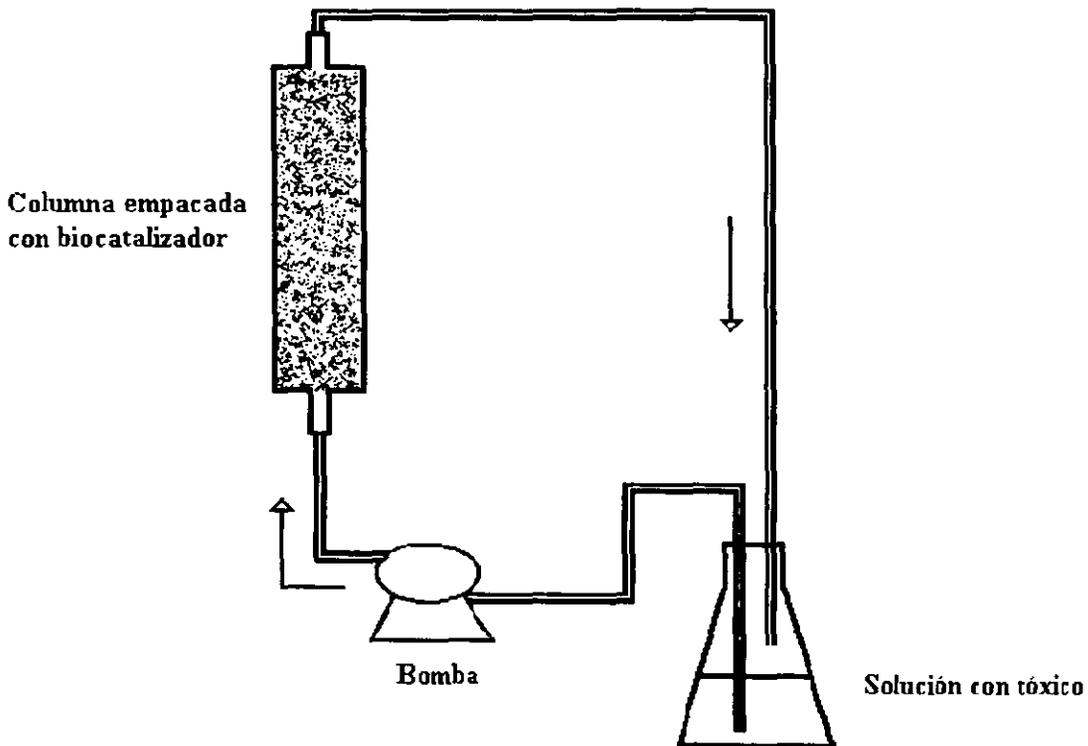
### 2.2.2.1 Parámetros de monitoreo

El parámetro monitoreado en esta etapa fue la concentración de clorofenoles, cada hora durante 6 horas.

### 2.2.3 Prueba de sorción

Esta se realizó con el objeto de determinar el grado de sorción de los clorofenoles en el alginato de calcio.

La prueba de sorción se realizó utilizando el sistema mostrado en la Figura 11, la temperatura fue controlada a 28°C por medio de recirculación de agua a través de una chaqueta externa.



**Figura 11. Reactor de columna empacada utilizado para la prueba de sorción y para la remoción de clorofenoles.**

La columna fue empacada con aproximadamente 44 g de alginato de calcio (sin bacterias). Se hizo circular una solución de cada compuesto clorofenólico a diferentes concentraciones (2-clorofenol y 2,4-diclorofenol a 500 mg/L, 2,4,6-triclorofenol a 300 mg/L).

### **2.2.3.1 Parámetros de monitoreo**

El parámetro evaluado en esta etapa fue la concentración de clorofenoles, periódicamente durante 24 horas.

### 2.3 Etapa III. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias libres en un reactor agitado

En esta etapa se realizó la remoción de los clorofenoles en concentraciones desde 25 hasta 1000 mg/L en un reactor agitado con células libres en suspensión y con el sistema aireado. Esto con el objeto de determinar las constantes cinéticas de remoción en un sistema que semeja uno de **lodos activados**.

El reactor utilizado para esta prueba tenía un volumen total de 500 mL y un volumen de trabajo de 150 mL. La temperatura se mantuvo a  $28\pm 1^\circ\text{C}$ , el pH no fue controlado y la agitación de 200 rpm. El oxígeno fue suministrado por medio de compresores de aire con un flujo de  $1.9\pm 0.72$  L/min. La *Pseudomonas fluorescens* se hizo crecer por incubación a  $35^\circ\text{C}$  en un agitador orbital a 200 rpm en medio YPG (50 mL) por 16 h. Después de este periodo el cultivo fue centrifugado a 4500 rpm y resuspendido con solución salina (1 g KCl / L) para obtener las células limpias (sin carbono biodegradable).

El esquema utilizado en esta etapa se muestra en la Figura 12.

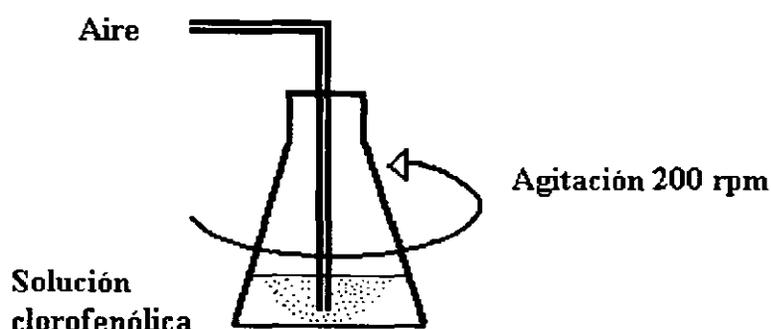


Figura 12. Reactor agitado y con aireación para la remoción de clorofenoles con bacterias libres.

Las concentraciones usadas en todos los experimentos para el 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol fueron 25, 50, 70, 100, 300, 500, 700 y 1000 mg/L. Las pruebas realizadas para cada concentración se llevaron a cabo por duplicado.

Los datos obtenidos de la evaluación de las concentraciones de los tres compuestos se utilizaron para determinar la cinética de remoción. Los datos fueron modelados con una ecuación de primer orden del tipo  $\ln C = \ln C_0 - kt$ . Los parámetros  $C_0$  y  $k$  fueron calculados.

### **2.3.1 Parámetros de monitoreo**

Los parámetros medidos en esta etapa fueron

- La concentración de clorofenoles, evaluada cada 15 minutos durante las primeras 2 horas y cada 30 minutos durante las dos horas restantes
- El crecimiento bacteriano, determinado cada 2 horas
- El pH, medido al inicio y al final
- La concentración de oxígeno disuelto, medida al inicio y al final.

### **2.3.2 Técnicas analíticas**

El crecimiento bacteriano en suspensión fue determinado en forma indirecta por medio de la medición de la densidad óptica. Para ello se empleó una alícuota de 1 mL que se diluyó a 10 mL con agua destilada. La absorbancia de la muestra se midió contra un blanco de agua destilada a 610 nm en un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 210.

El pH fue medido directamente de la muestra utilizando un medidor y controlador de pH Cole Parmer y el oxígeno disuelto se midió con un electrodo medidor de oxígeno disuelto YSI 5739 Field Probe.

### **2.4 Etapa IV. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias inmovilizadas usando un reactor agitado**

El objetivo de esta etapa fue determinar algunas características físicas del biocatalizador y llevar a cabo la remoción de los clorofenoles por medio de un sistema de células inmovilizadas en un reactor agitado, simulando un sistema de **lodos activados modificado**.

Por lo tanto, esta etapa comprendió dos estudios experimentales. En el primero se llevó a cabo la preparación y caracterización física del biocatalizador. En el segundo se realizó la remoción de los clorofenoles en concentraciones desde 25 a 1000 mg/L utilizando un reactor agitado con células inmovilizadas en suspensión.

#### **2.4.1 Preparación del biocatalizador**

El biocatalizador se preparó en un sistema como el mostrado en la Figura 13 con el procedimiento detallado por Sánchez de la Vega *et al.*, (1995) que se encuentra en el ANEXO D.

Una vez preparado el biocatalizador, se caracterizó físicamente determinando parámetros como el tamaño de partícula, la densidad aparente y real, la humedad, la fracción de vacíos y la capacidad de atrapamiento celular.

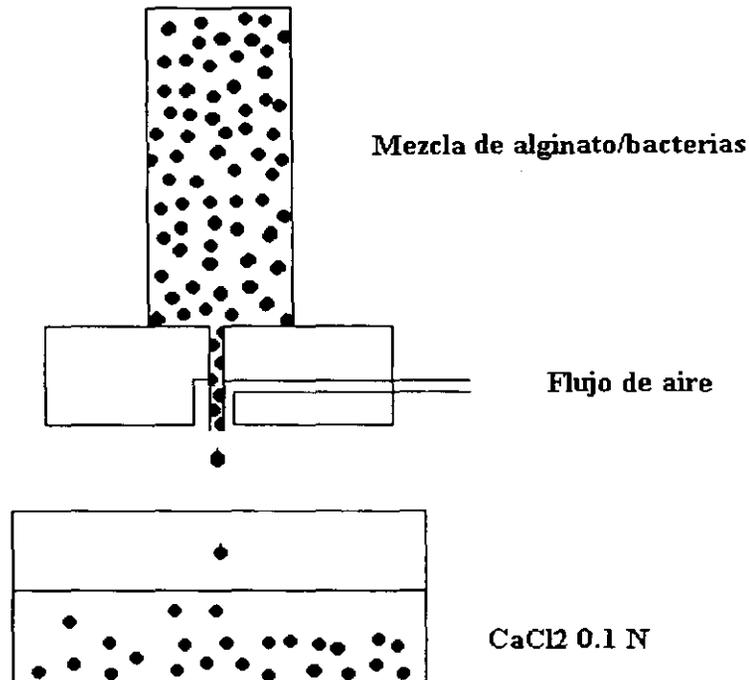


Figura 13. Equipo empleado para la elaboración de esferas de alginato de calcio.

#### 2.4.1.1 Técnicas analíticas

##### *Tamaño de partícula.*

El tamaño de partícula se determinó manualmente midiendo el diámetro de la esfera con un vernier. Se tomó una muestra representativa de 50 esferas determinándose el promedio y la desviación estándar.

##### *Densidad aparente y real.*

La densidad aparente ( $D_a$ ) se determinó dentro de una probeta colocando una cantidad conocida de esferas de alginato de calcio (retirando antes el exceso de agua). Posteriormente, se agregó un volumen conocido de agua y se midió el volumen desplazado. Se aplicó la siguiente expresión para calcular la densidad aparente.

$$D_a = \frac{P}{V} \quad [2.1]$$

donde

$D_a$  : densidad aparente [ $M L^{-3}$ ]

$P$  : peso del material [M]

$V$  : volumen desplazado [ $L^{-3}$ ]

La densidad real ( $D_r$ ) se determinó dentro de un matraz aforado colocando una cantidad conocida de esferas de alginato de calcio (retirando antes el exceso de agua), se aforó con agua y se pesó. Posteriormente se aplicaron las siguientes ecuaciones.

$$P_a = P_f - P_m - P \quad [2.2]$$

$$V_w = \frac{P_a}{\rho_a} \quad [2.3]$$

$$V_m = V_a - V_w \quad [2.4]$$

$$D_r = \frac{P}{V_m} \quad [2.5]$$

donde

$P_a$  : peso del agua [M]

$P_f$  : peso final [M]

$P_m$  : peso del matraz [M]

$V_w$  : peso del agua [M]

$\rho_a$  : densidad del agua [ $M L^{-3}$ ]

$V_m$  : volumen de la muestra [ $L^{-3}$ ]

$V_a$  : volumen aforado [ $L^{-3}$ ]

$D_r$  : densidad real [ $M L^{-3}$ ]

### *Humedad y fracción de vacíos.*

La humedad se determinó utilizando una termobalanza (Ohaus). Las determinaciones en la termobalanza se realizaron a una potencia de 1 Watt. El tiempo de secado fue de aproximadamente 1 hora, ya que la velocidad de secado debe ser lenta para evitar la formación de una capa dura en la superficie de las esferas. Se determinó la pérdida de humedad a intervalos de 1 minuto.

La fracción de vacíos ( $\epsilon$ ) es la relación del volumen intrapartícula (vacío) e interpartícula, entre el volumen total que ocupa el biocatalizador y representa la fracción vacía disponible para la reacción. Para su determinación se utilizará el método de desplazamiento de un volumen de líquido por las partículas del biocatalizador (Buchholz, 1979).

Para su medición se tomó un volumen conocido de esferas y se secaron hasta alcanzar la humedad crítica. Posteriormente, se vaciaron en 20 mL de una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.1 N. Se permitió que las esferas recuperaran su volumen original y se midió el volumen desplazado, lo cual corresponde al volumen que ocupa la matriz del catalizador. El volumen total menos el volumen desplazado comprende el volumen vacío.

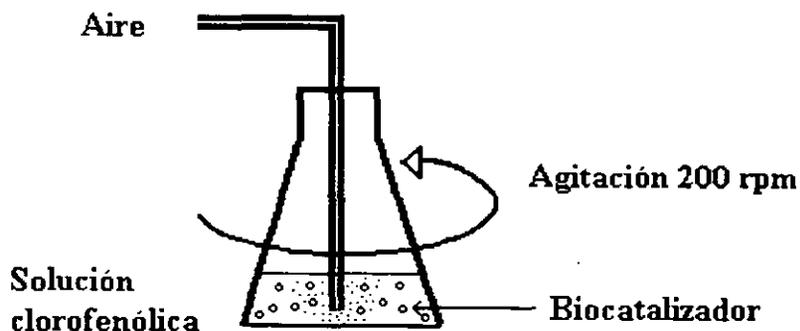
### *Determinación de la capacidad de atrapamiento celular.*

La capacidad de atrapamiento celular se determinó cada vez que se realizaban las pruebas con células inmovilizadas. Para ello se tomaba una esfera y se colocaba en papel secante, se maceraba y disolvía en 10 mL de agua destilada que contenía 2 g/L de EDTA y 20 g/L de NaCl. Se realizaron diluciones a diferentes niveles y tres diluciones fueron sembradas en cajas de YPG-agar y King B-agar para cuenta total a las 24 h.

### 2.4.2 Células inmobilizadas en suspensión

El objetivo de este experimento fue determinar la cinética de degradación en un sistema de células inmobilizadas en un reactor agitado, simulando un sistema de lodos activados modificado.

El reactor utilizado en esta sección es el mostrado en la Figura 14.



**Figura 14. Sistema de células inmobilizadas en un reactor agitado.**

Para llevar a cabo esta experiencia se utilizaron 10 g del biocatalizador, el cual fue adicionado a la solución clorofenólica.

Los datos obtenidos de la evaluación de las concentraciones de los tres compuestos se utilizaron para determinar la cinética de degradación. Los datos fueron modelados con una ecuación de primer orden del tipo  $\ln C = \ln C_0 - kt$ . Los parámetros  $C_0$  y  $k$  fueron calculados.

### 2.4.2.1 Parámetros de monitoreo

Los parámetros evaluados en esta etapa fueron:

- La concentración de clorofenoles, evaluada cada 15 minutos durante las primeras 2 horas y cada 30 minutos durante las dos horas restantes
- El pH, medido al inicio y al final
- La concentración de oxígeno disuelto, medida al inicio y al final.

### 2.5 Etapa V. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias inmovilizadas usando una columna empacada

Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar la cinética de remoción en un sistema de bacterias inmovilizadas en una columna empacada. Este sistema simula un proceso de **filtros sumergidos**.

La prueba se realizó utilizando una columna de vidrio con un volumen de trabajo de 0.054 L, la temperatura fue controlada a 28°C por medio de recirculación de agua a través de una chaqueta externa (Figura 11).

La columna fue empacada con aproximadamente 44 g de esferas de alginato de calcio /bacterias. Se hizo circular 200 mL de una solución de cada compuesto clorofenólico a diferentes concentraciones (300, 500 y 700 para 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol y 300 y 500 para 2,4,6-triclorofenol) por medio de una bomba peristáltica de velocidad variable.

El tiempo de la corrida fue el suficiente para alcanzar un porcentaje de remoción de 95%, determinando el cambio de la concentración de los clorofenoles periódicamente.

### **2.5.1 Parámetros de monitoreo**

Los parámetros evaluados en esta etapa fueron

- La concentración de clorofenoles, evaluada cada hora durante 4 horas y después cada 2 horas
- El pH, medido al inicio y al final
- La concentración de oxígeno disuelto, medida al inicio y al final.

# ***CAPITULO 3***

*Resultados y Discusión*

## **3.Resultados y discusión**

### **3.1 Etapa I. Caracterización microbiológica de *Pseudomonas fluorescens***

De acuerdo con la caracterización llevada a cabo por Cabello (1995), la bacteria degradadora fue identificada como *Pseudomonas fluorescens*. Las pruebas de degradabilidad mostraron que la bacteria era capaz de degradar fenol y clorofenoles.

La lectura de los resultados según el manual del API indica que la bacteria fue identificada como *Pseudomonas fluorescens* en las dos pruebas efectuadas. Con estos resultados se descartó la posibilidad de que se hubiera contaminado durante el transcurso de la experimentación. Los resultados de la prueba API se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados de la prueba de identificación API.

SUSTRATO	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADO	API <i>P. fluorescens</i>
Ortonitrofenolgalactosido	$\beta$ -galactosidasa	-	-
Arginina	Arginina dehidrolasa	+	+
Lisina	Lisina descarboxilasa	-	-
Ornitina	Ornitina descarboxilasa	-	-
Citrato sódico	Utilización del citrato	+	+
Tiosulfato sódico	Producción de H <sub>2</sub> S	-	-
Uréa	Ureasa	-	-
Triptófano	Triptófano desaminasa	-	-
Triptofano	Producción de indol	-	-
Piruvato sódico	Producción de acetoína	+	+
Gelatina de Kohn	Gelatinasa	+	+
Glucosa	Fermentación/oxidación	-	-
Manitol	Fermentación/oxidación	-	-
Inosito	Fermentación/oxidación	-	-
Sorbitol	Fermentación/oxidación	-	-
Ramnosa	Fermentación/oxidación	-	-
Sacarosa	Fermentación/oxidación	-	-
Melibiosa	Fermentación/oxidación	-	-
Amigdalina	Fermentación/oxidación	-	-
Arabinosa	Fermentación/oxidación	-	-
Sobre papel filtro	Citocromo oxidasa	+	+

### 3.2 Etapa II. Pruebas testigo

Se realizaron tres pruebas testigo con el objeto de determinar otros factores alternos que intervinieran en la remoción de los clorofenoles, éstas y sus resultados se listan a continuación.

### 3.2.1 Prueba de descomposición

En esta prueba se llevó a cabo la determinación del cambio de concentración en matraces abiertos sin bacterias y sin aireación. Los resultados obtenidos de este experimento muestran que la concentración de los compuestos clorofenólicos con respecto al tiempo no disminuye significativamente durante 8 h (Figura 15). Después de este tiempo se observó una disminución sólo en el 2-clorofenol (35%) y el 2,4-diclorofenol (17%). La concentración del 2,4,6-triclorofenol permaneció constante durante las 96.5 horas de la prueba.

Debido a los resultados obtenidos y a las condiciones de experimentación es posible que el mecanismo que produce la disminución en la concentración de las soluciones clorofenólicas sea la **fotoólisis** ya que en otros trabajos se ha reportado este mecanismo como eficiente en la remoción de clorofenoles.

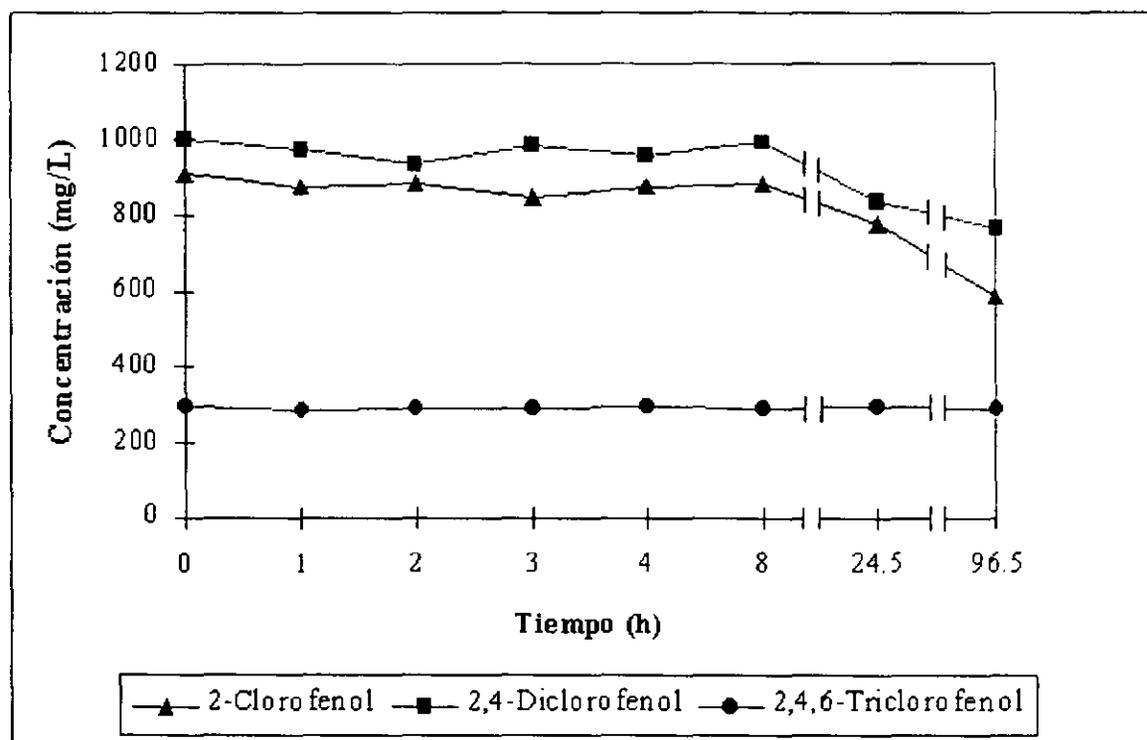


Figura 15. Cambio de concentración de las soluciones clorofenólicas en control sin bacterias y sin aireación.

#### 3.2.2 Prueba de desorción

Debido a que los valores de las constantes de Henry para cada uno de los compuestos clorofenólicos propuestos los clasifica como "semivolátiles", se planteó el llevar a cabo una corrida testigo para determinar su remoción por desorción con aire. La relación de volumen de aire con volumen de medio fue de 9.5 L/L min, que fue la empleada en los estudios de biodegradación.

Al término de dicha experimentación, la concentración del 2-clorofenol había disminuido de una concentración inicial de 494 mg a 90 mg (remoción del 82%), mientras que el matraz que contenía sólo agua aumentó la concentración a 153 mg (recuperación del 38%). En el caso del 2,4-diclorofenol la concentración inicial disminuyó de 475 mg a 278 mg (remoción del 42%, es decir 197 mg), mientras que la concentración final en el matraz que contenía agua fue de 114 mg (recuperación del 58%).

En la Figura 16,17 y 18 se observa claramente que la concentración del 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol en el matraz de la solución disminuía mientras que en el matraz que contenía agua iba en aumento. Comprobando con esto que se lleva a cabo un arrastre del compuesto por efecto del aire y la agitación. Para el caso del 2,4,6-triclorofenol esto no fue observado, debido a que su constante de Henry ( $9.07 \times 10^{-8} \text{ atm m}^3/\text{mol}$ ) es más pequeña en comparación con el 2-clorofenol ( $8.28 \times 10^{-6} \text{ atm m}^3/\text{mol}$ ) y el 2,4-diclorofenol ( $6.66 \times 10^{-6} \text{ atm m}^3/\text{mol}$ ), haciéndolo difícil de ser desorbido.

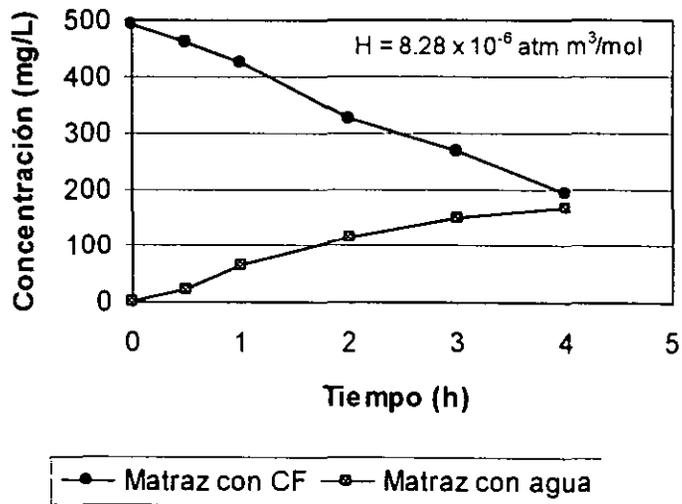


Figura 16. Desorción del 2-clorofenol con aire.

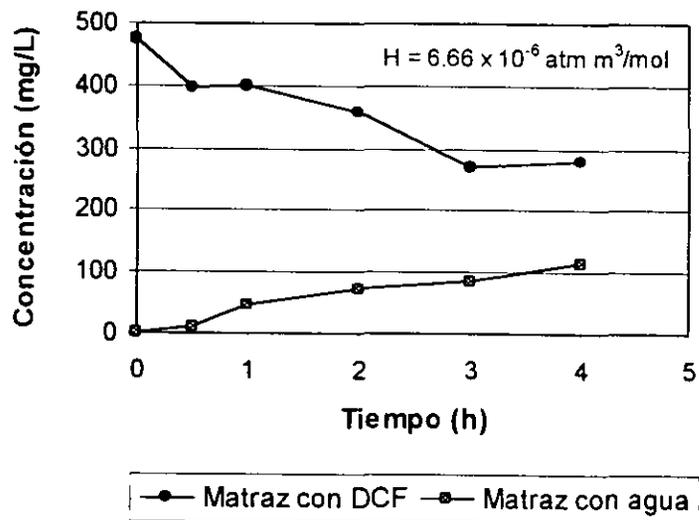


Figura 17. Desorción del 2,4-diclorofenol con aire.

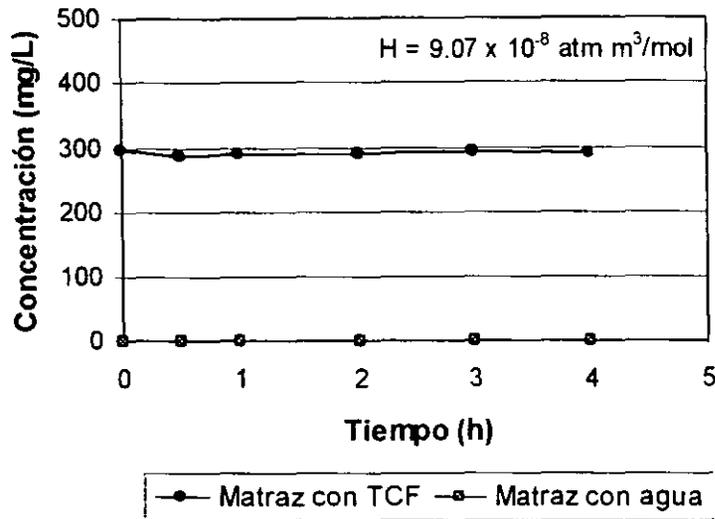


Figura 18. Desorción del 2,4,6-triclorofenol con aire.

La eliminación de compuestos por arrastre (desorción) se produce cuando un gas (normalmente aire) queda atrapado temporalmente en el agua residual, o cuando se introduce de manera expresa para conseguir determinados objetivos de tratamiento. Cuando se introduce un gas en el agua residual, se produce la transferencia de estos compuestos del agua residual al gas. Una de las fuerzas que gobiernan la transferencia de moléculas entre las dos fases es el gradiente de concentración entre cada una de estas (Metcalf y Eddy, 1996).

Por lo tanto, el cambio de la concentración de los clorofenoles con respecto al tiempo esta dado por una fuerza motriz (diferencia de concentraciones) y por un factor relacionado con el flujo de aire. La ecuación [3.1] fue propuesta para describir la cinética de desorción

$$-\frac{dC}{dt} = SC \tag{3.1}$$

De acuerdo con Weber y Smith (1986) el factor de desorción está dado por

$$S = k \left( \frac{Q_g}{55.55 V} \right) \quad [3.2]$$

donde

k: constante de velocidad de desorción ( $h^{-1}$ )

$Q_g$ : tasa molar del gas [moles/h]

55.55: moles de agua por litro [moles/L]

V : Volumen de trabajo (L)

sustituyendo en la ecuación [3.1] queda

$$-\frac{dC}{dt} = k \left( \frac{Q_g}{55.55 V} \right) C \quad [3.3]$$

$$-\frac{dC}{C} = k \left( \frac{Q_g}{55.55 V} \right) dt \quad [3.4]$$

al integrar la ecuación [3.4] queda

$$-\ln C = k \left( \frac{Q_g}{55.55 V} \right) t \quad [3.5]$$

evaluando entre  $t_f=t$ ,  $t_i=0$  y  $C_f=C$ ,  $C_i= C_0$  queda

$$-\ln C - \ln C_0 = k \left( \frac{Q_g}{55.55 V} \right) (t - 0) \quad [3.6]$$

rearrreglando términos

$$\ln C = \ln C_0 - k \left( \frac{Q_g}{55.55 V} \right) t \quad [3.7]$$

La disminución de la concentración del 2-clorofenol y el 2,4-diclorofenol se representó por medio de la ecuación [3.7] (Figura 19) y se determinó la constante de velocidad de desorción en función de la relación de tasa molar de aire con moles de trabajo, los resultados para las condiciones de trabajo de este estudio se muestran en la Tabla 16.

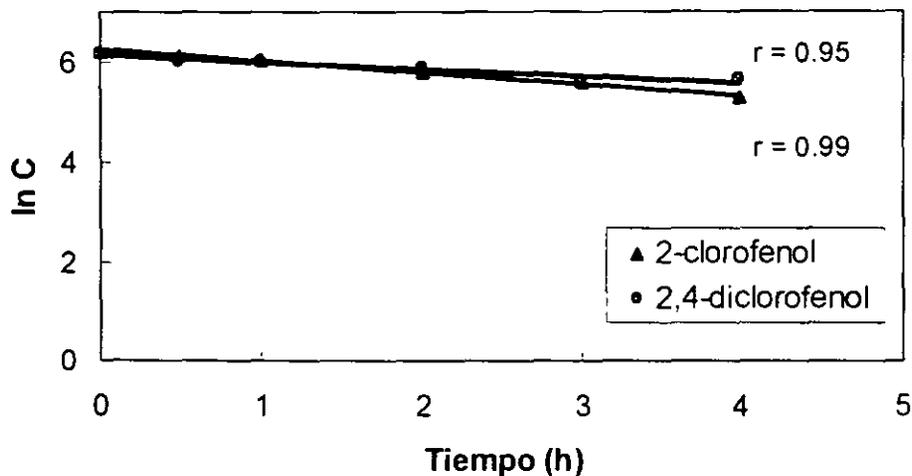


Figura 19. Representación de los datos de desorción por medio de la ecuación de primer orden.

Tabla 16. Valores de las constantes de velocidad de desorción.

Compuesto	$k(h^{-1})$	$C_0$ (mg/L)
2-Clorofenol	0.51	516.77
2,4-Diclorofenol	0.138	451.83

Existe una gran diversidad de resultados con respecto a la desorción de los clorofenoles con aire. En la Tabla 17 se muestra la comparación de algunos trabajos.

Se observa que mientras menor es el gradiente de concentraciones entre la fase líquida y la gaseosa, el fenómeno de desorción no se presenta.

**Tabla 17. Comparación de los resultados de desorción de algunos trabajos.**

Compuesto	Concentración (mg/L)	VVM (L/L min)	Desorción	Referencia
2-Clorofenol 2,4-Diclorofenol	500	9.5	SI	Este trabajo
2-Clorofenol	250	0.2	SI	Armenante <i>et al.</i> (1992)
Varios clorofenoles	100	1	NO	Dapaah y Hill (1992)
2,4-Diclorofenol	75	0.67	NO	Kincannon <i>et al.</i> (1983)

La desorción con aire puede ser un método efectivo para la remoción de estos compuestos, pero se puede aplicar sólo en aquellos caso en los que las concentraciones no excedan a 100 ppm ya que de lo contrario se puede tener problemas de contaminación del aire (Jiménez *et al.*, 1986). Por tal razón, la eliminación vía biológica ha sido una alternativa en la eliminación de estos compuestos.

#### 3.2.3 Prueba de sorción

La adsorción es la concentración de un componente en la superficie externa en una interfase mientras que la absorción se considera como aquella que describe el movimiento de algo en el interior de una matriz. Pero debido a las dificultades que representa discernir los límites entre las interfases sólido-agua, se utiliza el término sorción, que ha sido adoptado para describir en forma general tanto la adsorción como la absorción. En la práctica, la sorción generalmente indica el movimiento de una fase libre o móvil (gas o líquido) al interior o a la superficie de una fase fija (Dieterich, 1993).

Esta prueba se realizó con el objeto de determinar la capacidad del alginato de calcio para sorber los clorofenoles y de esta manera determinar la disponibilidad del

compuesto a las bacterias inmovilizadas en el soporte. En la Figura 20 se muestran los resultados.

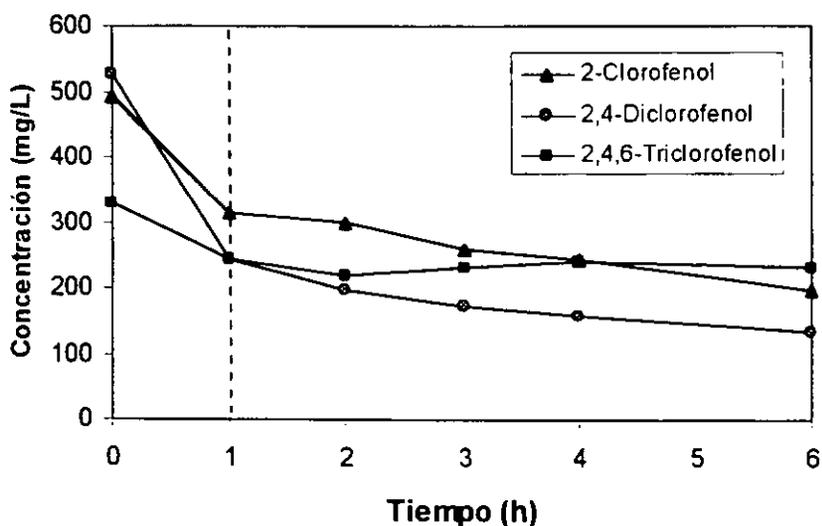


Figura 20. Resultados de la prueba de sorción en alginato de calcio.

El análisis de la cantidad de clorofenoles sorbida se hizo con base en la cantidad de alginato de calcio en las esferas (2.5% p/v). Los datos obtenidos con el experimento se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados de la prueba de sorción.

COMPUESTO	g de clorofenol sorbidos/g alginato
2-Clorofenol	0.02
2,4-Diclorofenol	0.04
2,4,6-Triclorofenol	0.006

Pai *et al.* (1995) determinaron la isoterma de adsorción del fenol en un biocatalizador de alginato de calcio al 4% con un diámetro de 3 mm y encontraron que durante el inicio de la experimentación (casi 25 días) el fenol se adsorbió continuamente al soporte a pesar de haberlo saturado antes de iniciar la corrida.

### 3.3 Etapa III. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias libres en un reactor agitado

Las experiencias de remoción de los compuestos clorofenólicos se efectuaron por duplicado y los parámetros medidos fueron crecimiento bacteriano (como densidad óptica), pH y oxígeno disuelto. Los resultados para cada uno de éstos se presentan a continuación

#### 3.3.1 Crecimiento bacteriano

Debido a que la densidad óptica es una medición indirecta del crecimiento celular y un indicativo de que la bacteria está utilizando los clorofenoles como sustrato, se esperaba observar un aumento en la densidad óptica durante el tiempo de experimentación.

Los valores de densidad óptica se midieron al tiempo 0, 2 y 4 h. Según se observa en la Tabla 19, para los tres compuestos a diferentes concentraciones, la densidad óptica no varió significativamente con el paso del tiempo.

**Tabla 19. Crecimiento bacteriano para el sistema de células libres en reactor agitado.**

Compuesto	Tiempo (h)	Densidad óptica promedio	Desviación estándar
2-Clorofenol	0	0.034	0.003
	2	0.034	0.004
	4	0.033	0.004
2,4-Diclorofenol	0	0.035	0.004
	2	0.036	0.004
	4	0.036	0.004
2,4,6-Triclorofenol	0	0.033	0.004
	2	0.033	0.003
	4	0.030	0.005

Debe considerarse que en la preparación de las bacterias se eliminó toda la dextrosa restante del medio de cultivo, es decir, que las bacterias fueron puestas directamente en la solución clorofenólica. La razón de no encontrar gran diferencia en la medición de la densidad óptica es el pequeño tiempo de seguimiento durante el cual las bacterias no han logrado adaptarse al medio y por lo tanto no presentan crecimiento apreciable. El tiempo fue establecido con base en las velocidades de remoción de los compuestos observadas en un experimento preliminar, durante el cual se observaba una velocidad mayor durante las primeras 4 horas y posteriormente tendía a disminuir.

#### 3.3.2 pH

El pH se midió para los sistemas de células libres al inicio y al final del proceso; en la Tabla 20 se muestran los valores para los tres compuestos.

**Tabla 20. Valores de pH en el sistema de células libres en reactor agitado.**

Compuesto	Tiempo (h)	pH promedio	Desviación estándar
2-Clorofenol	0	6.31	0.25
	4	6.71	0.35
2,4-Diclorofenol	0	6.05	0.35
	4	7.02	0.29
2,4,6-Triclorofenol	0	8.04	1.51
	4	7.94	0.40

De la tabla se puede observar que el pH se ve incrementado para el caso del 2-clorofenol y el 2,4-diclorofenol. En el caso específico del 2,4,6-triclorofenol se puede decir que permaneció constante.

La pequeña variación en los valores de pH en el transcurso de la experimentación indica que éste no es un parámetro limitante.

### 3.3.3 Oxígeno disuelto

Bajo las condiciones ambientales de la experimentación (temperatura de 28 °C y presión atmosférica de 654 mmHg), la concentración de oxígeno disuelto máxima que se puede alcanzar es aproximadamente de 6 mg/L. El oxígeno disuelto se midió al inicio y al final del experimento y en la Tabla 21 se muestran los valores obtenidos.

**Tabla 21. Valores de oxígeno disuelto en el sistema de células libres en reactor agitado.**

Compuesto	Tiempo (h)	Oxígeno disuelto promedio (mg/L)	Desviación estándar
2-Clorofenol	0	3.060	0.406
	4	4.160	0.340
2,4-Diclorofenol	0	3.430	0.383
	4	3.926	0.536
2,4,6-Triclorofenol	0	2.901	0.318
	4	3.613	0.587

De los datos obtenidos, se puede observar una tendencia a aumentar la concentración de oxígeno disuelto entre la hora 0 y la 4. Esto se debió a la continua agitación y suministro de aire, lo que hace que la concentración de oxígeno aumente en el medio. Sin embargo, este aumento no es significativo, es por esto, que la concentración de oxígeno disuelto no se considera un parámetro limitante.

La aireación, aún en reactores con operación por lote, puede ser vista como un proceso continuo. La velocidad de acumulación de oxígeno en el medio esta dada por

$$dC_o/dt = \text{velocidad de transferencia de } O_2 \text{ en el reactor} - \text{velocidad de consumo de } O_2$$

Sin embargo la transferencia de oxígeno y el consumo de oxígeno son procesos muy rápidos y la concentración de oxígeno disuelto rápidamente alcanzará un estado

estacionario aparente o temporal. Por lo tanto en el estado estacionario  $dC_0/dt = 0$  y la velocidad de transferencia será igual a la velocidad de consumo de oxígeno.

#### 3.3.4 Cinética de la degradación

Los datos obtenidos de la evaluación de la concentración de los clorofenoles fueron graficados en función del tiempo (ANEXO E).

La representación del cambio de concentración con respecto al tiempo de las concentraciones de 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol (500 mg/L) y 2,4,6-triclorofenol (300 mg/L) se presenta en la Figura 21. En el caso específico del 2,4,6-triclorofenol no se observó una disminución significativa de la concentración con respecto al tiempo.

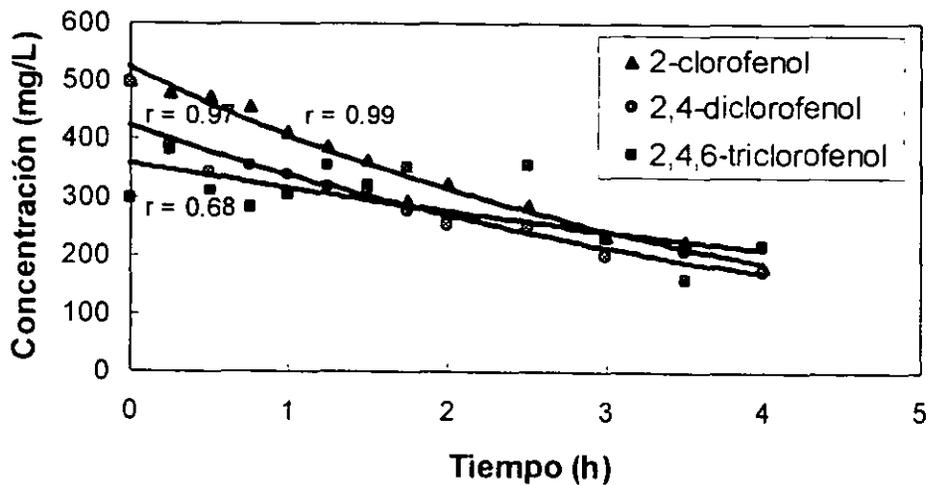


Figura 21. Cambio de concentración de los clorofenoles con respecto al tiempo.

De acuerdo a Burton y Tchobanoglous (1991) se realizó la determinación de la constante de la velocidad ( $k$ ) para cada compuesto por medio de la ecuación de primer orden  $\ln C = \ln C_0 - kt$ , utilizando los datos obtenidos para el 2-clorofenol y el 2,4-

diclorofenol a 500 mg/L y para el 2,4,6-triclorofenol a 300 mg/L. Para el caso específico del 2,4,6-triclorofenol, no se representaron los datos por medio de la ecuación de primer orden, ya que como se observa en la Figura 21 el cambio en la concentración es despreciable. En la Figura 22 se observa el comportamiento de los resultados y en la Tabla 22 se presentan los valores de  $k$  para cada compuesto así como los valores de  $C_0$  y  $r$ .

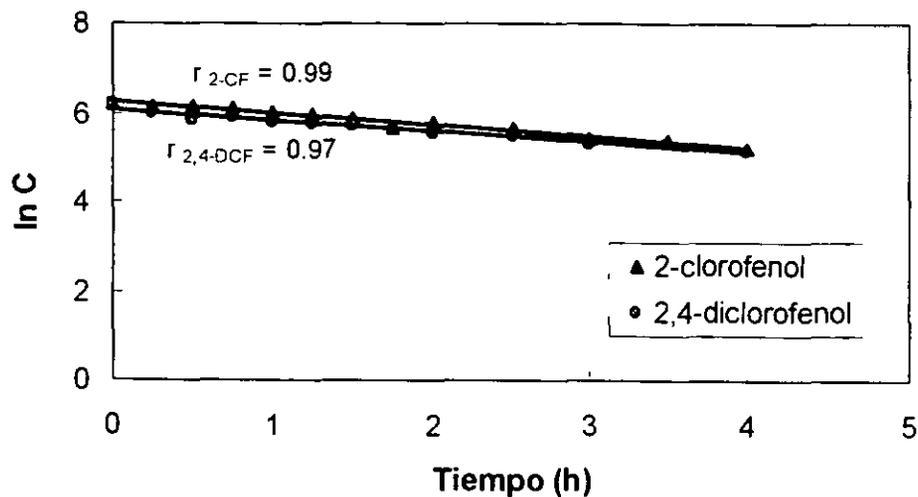


Figura 22. Representación de los datos por medio de la ecuación de primer orden.

Tabla 22. Valores de las constantes cinéticas de primer orden.

Compuesto	$k$ ( $h^{-1}$ )	$C_0$ (mg/L)
2-Clorofenol	0.258	523.11
2,4-Diclorofenol	0.229	423.22

Las constantes de velocidad encontradas en este experimento fueron comparadas con las constantes obtenidas en el experimento de desorción.

Se pudo observar que para el caso del 2-clorofenol, la constante de velocidad de desorción ( $k = 0.510$ ) fue mucho mayor que la obtenida en este experimento ( $k =$

0.258), es decir, que el fenómeno de desorción se da más rápido que cualquier otro mecanismo de remoción.

Sin embargo, para el caso del 2,4-diclorofenol el valor de la constante obtenida con bacterias libres ( $k = 0.229$ ) es mayor que la obtenida en el experimento de desorción ( $k = 0.138$ ), lo que indica que puede existir otro mecanismo alternativo a la desorción, posiblemente biodegradación o sorción en las células.

#### ***3.4 Etapa IV. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias inmovilizadas usando un reactor agitado***

##### ***3.4.1 Caracterización física***

A pesar de que este trabajo está basado en el estudio realizado por Sánchez de la Vega (1995), las características físicas determinadas por este autor no nos fueron de utilidad, debido a que el alginato de sodio usado fue de diferente lote y por lo tanto el biocatalizador diferente.

Por esta razón, se hicieron varias pruebas para determinar la concentración de alginato de sodio y la presión de aire necesarias para obtener un soporte de calidad similar al preparado por Sánchez de la Vega. Después de las pruebas se determinó que la concentración óptima era 2.5% de alginato de sodio y la presión óptima de 1.5 kg/cm<sup>2</sup>.

##### ***☞ Tamaño de partícula***

De acuerdo con Sánchez de la Vega (1995) el diámetro es función de la presión de aire aplicada al preparar el biocatalizador. En la Tabla 23 se presentan los valores del diámetro de las esferas en función de la presión aplicada.

Tabla 23. Valores de diámetros obtenidos utilizando diferentes presiones de aire.

Presión de aire (kg/cm <sup>2</sup> )	Diámetro <sup>a</sup> (mm)	Diámetro <sup>b</sup> (mm)
0	3.35	3.00 ± 0.12
1	2.38	2.22 ± 0.19
2	1.41	1.73 ± 0.14
3	1.13	1.27 ± 0.12

a más frecuente en el cribado  
b medido con vernier

El tamaño de partícula que se obtuvo en este trabajo bajo las condiciones establecidas con anterioridad (concentración de alginato 2.5% y presión de 1.5 kg/cm<sup>2</sup>) fue de 2.46 ± 0.24. Con este tamaño de partícula se trabajó durante la experimentación realizada con las células inmovilizadas.

#### ☞ *Densidad aparente y real*

Los valores obtenidos de la densidad tanto real como aparente para el biocatalizador preparado al 2.5% y con un diámetro de 2.46 mm se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24. Valores de la densidad real y aparente.

	g/mL
Densidad real	1.09
Densidad aparente	0.69

#### ☞ *Humedad y fracción de vacíos*

La humedad y fracción de vacíos se determinó usando el biocatalizador con concentración de alginato de sodio al 2.5% y diámetro de 2.46 mm. Las curvas obtenidas al llevar a sequedad el biocatalizador se muestran en la Figura 23.

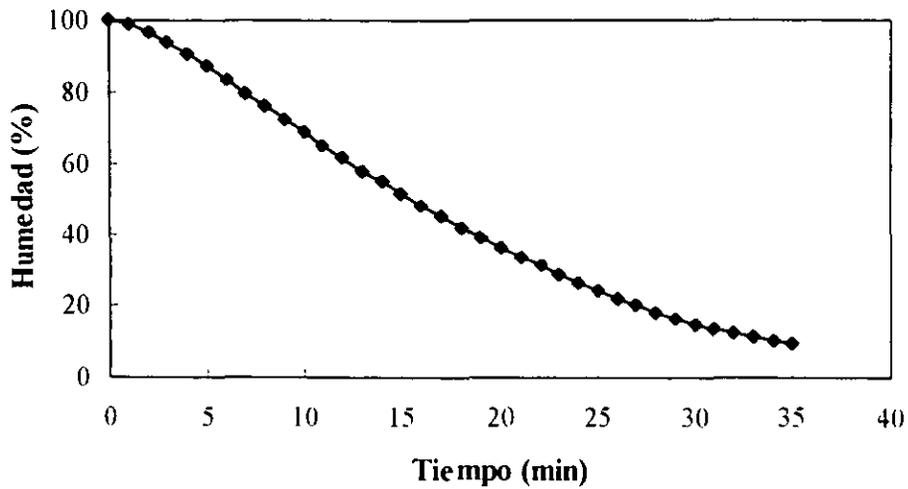


Figura 23. Curva de secado.

La curva que se obtuvo durante la prueba realizada para determinar la fracción de vacíos, se muestra en la Figura 24. De acuerdo a Quirasco (1994) y determinando las tres etapas de secado, el porcentaje de humedad alcanzado al inicio de la tercera etapa fue de 49%. En este punto es donde se determina la fracción de vacíos.

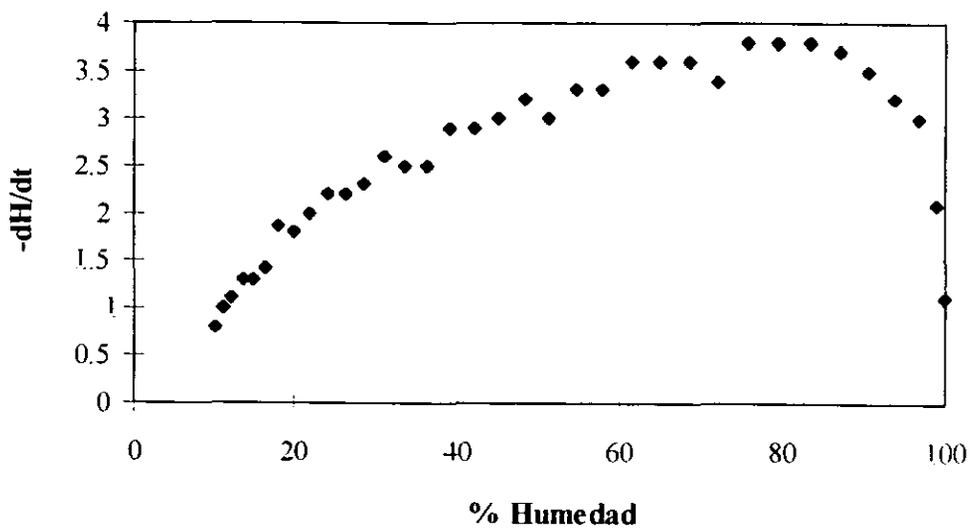


Figura 24. Velocidades de secado para el biocatalizador.

En este tipo de curvas se observan tres periodos de secado:

- En el primero hay una alta velocidad de evaporación y la velocidad va en aumento.
- En el segundo, se presenta un equilibrio entre la velocidad de transferencia de calor y la velocidad de transferencia de masa en la superficie. La velocidad de secado es así casi constante, pues el agua libre se difunde dentro del sólido hacia la superficie en la cual se evapora a una tasa constante.
- En el tercer periodo la velocidad de secado decrece. Comienza cuando se alcanza el contenido crítico de humedad. Aquí el agua libre ya ha sido eliminada y el agua ligada comienza a evaporarse dentro de la partícula y se difunde fuera de ella hacia el gas que la rodea.

La fracción de vacíos determinada de acuerdo con el método propuesto por Buchholz (1979) fue de 0.47, cuyo valor es más pequeño al determinado por Quirasco (1994) de 0.58 y por Sánchez de la Vega (1995) de 0.63 a 0.68. En otras palabras, éste biocatalizador es menos eficiente en términos del volumen de reactor requerido.

#### ☞ **Capacidad de atrapamiento**

Los resultados obtenidos en este estudio fueron de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/mL, con lo cual la capacidad de atrapamiento del biocatalizador es comparable a los valores obtenidos por Chevalier y de la Noue (1988) de  $10^7$ , Keweloh *et al.* (1990) de  $10^5$  y Boross *et al.* (1990) de  $10^6$  a  $10^7$ .

### 3.4.2 Células inmovilizadas en reactor agitado

Utilizando el sistema de reactor agitado se realizó la prueba de degradación de los tres compuestos usando las células inmovilizadas. El pH, concentración de oxígeno disuelto y concentración de clorofenoles fueron evaluados, obteniéndose los siguientes resultados.

#### 3.4.2.1 pH

El pH fue medido al igual que los sistemas de células libres al inicio y al final del proceso y en la Tabla 25 se muestran los valores de pH para los tres compuestos.

**Tabla 25. Valores de pH en el sistema de células inmovilizadas en reactor agitado.**

Compuesto	Tiempo (h)	pH promedio	Desviación estándar
2-Clorofenol	0	6.16	0.41
	4	6.51	0.31
2,4-Diclorofenol	0	5.73	0.35
	4	6.80	0.14
2,4,6-Triclorofenol	0	8.50	1.46
	4	7.66	0.52

De la tabla se observa que el pH se ve incrementado para el 2-clorofenol y el 2,4-diclorofenol. El cambio de pH aunque no es muy significativo, se debe a la acción de la solución amortiguadora de fosfatos que para el 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol tiende a aumentar un poco y en el caso del 2,4,6-triclorofenol con valores de pH entre 8 y 9 tiende a disminuirlo durante la experimentación.

#### 3.4.2.2 Oxígeno disuelto

La concentración de oxígeno disuelto se midió al inicio y al final del experimento. En la Tabla 26 se muestran los valores de oxígeno disuelto en mg/L.

**Tabla 26. Concentración de oxígeno disuelto para el sistema de células inmovilizadas en reactor agitado.**

Compuesto	Tiempo (h)	Oxígeno disuelto promedio (mg/L)	Desviación estándar
2-Clorofenol	0	3.900	0.319
	4	4.000	0.420
2,4-Diclorofenol	0	3.870	0.371
	4	3.840	0.399
2,4,6-Triclorofenol	0	3.959	0.552
	4	3.806	0.250

En general se puede observar que para células inmovilizadas la concentración de oxígeno disuelto prácticamente permaneció constante así que se considera que la concentración de oxígeno disuelto en el medio no es un parámetro limitante de la reacción.

#### **3.4.2.3 Cinética de la degradación**

Los datos de cambio de concentración con respecto al tiempo del 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con todas las concentraciones trabajadas fueron graficados, las representaciones se muestran en el ANEXO F. La gráfica de los cambios de concentración de los compuestos clorofenólicos con respecto al tiempo se presenta en la Figura 25.

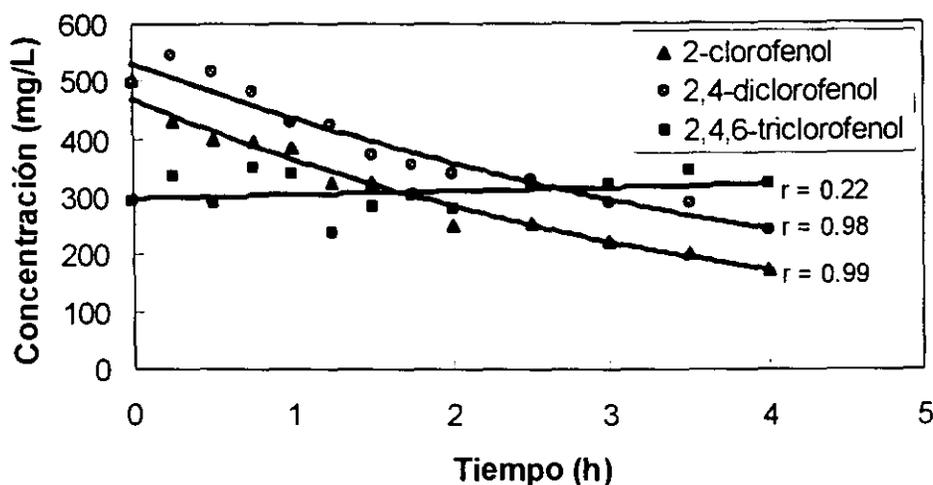


Figura 25. Cambio de concentración de los clorofenoles con respecto al tiempo.

Se determinaron las constantes cinéticas para una cinética de primer orden de acuerdo con Burton y Tchobanoglous (1991) utilizando los datos obtenidos para la concentración de 500 mg/L para el 2-clorofenol y el 2,4-diclorofenol, la gráfica se muestra en la Figura 26 y los datos obtenidos de las constantes cinéticas se muestran en la Tabla 27. La determinación del 2,4,6-triclorofenol no se realizó debido a que los resultados obtenidos no muestran disminución en la concentración de este compuesto.

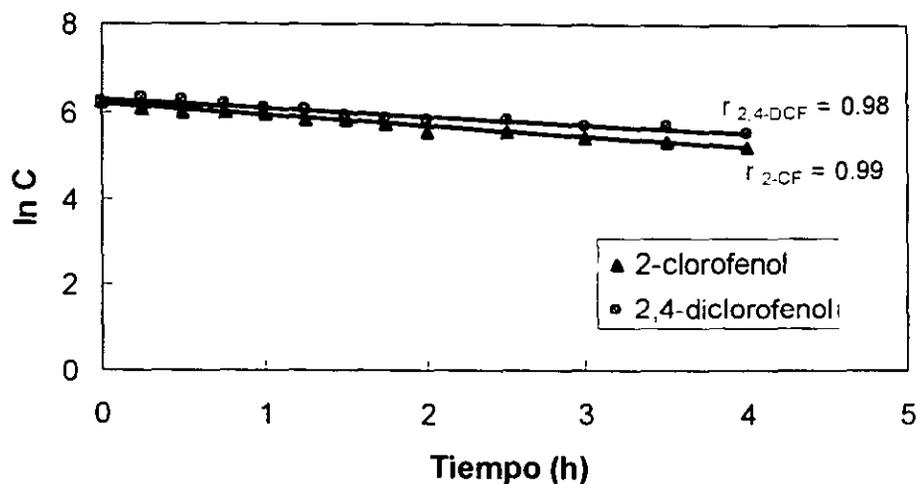


Figura 26. Representación de los datos por medio de la ecuación de reacción de primer orden.

Tabla 27. Valores de las constantes cinéticas de primer orden.

Compuesto	k (h <sup>-1</sup> )	Co (mg/L)
2-Clorofenol	0.250	468.67
2,4-Diclorofenol	0.197	530.17

Comparando las constantes de velocidad obtenidas con las bacterias inmovilizadas con las constantes de desorción, se puede observar nuevamente que para el 2-clorofenol la velocidad de desorción es mayor ( $k = 0.510$ ) que la observada en el experimento con las bacterias inmovilizadas ( $k = 0.250$ ).

En el caso del 2,4-diclorofenol, la velocidad de desorción ( $k = 0.138$ ) es menor a la encontrada con bacterias inmovilizadas, debido probablemente, a que existan otros mecanismos alternos que intervengan en la remoción de este compuesto. La biodegradación y la sorción son algunos de los mecanismos de remoción que pudieran haberse presentado en estos experimentos, sin embargo, esto no fue comprobado ni cuantificado.

### **3.5 Etapa V. Remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol con bacterias inmovilizadas usando una columna empacada**

#### **3.5.1 Degradación en columna empacada**

En esta etapa se realizó la remoción de 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol (300, 500 y 700 mg/L) y 2,4,6-triclorofenol (300 y 500 mg/L) utilizando una columna empacada totalmente sellada y sin aplicación de flujo de aire, con el objeto de eliminar el efecto de la desorción y determinar la cantidad biodegradada para cada compuesto, los resultados son los siguientes.

La remoción del 2-clorofenol y el 2,4-diclorofenol se llevó a cabo hasta que se alcanzó por lo menos un 90%, lo cual no ocurrió para el caso del 2,4,6-triclorofenol que no alcanzó el porcentaje de remoción establecido como límite a pesar de dejar transcurrir hasta cerca de 170 horas. En la Tabla 28 se presentan los porcentajes de remoción de los tres compuestos y el tiempo necesario para alcanzarlos.

**Tabla 28. Porcentajes de remoción alcanzados con bacterias inmovilizadas en una columna empacada.**

Compuesto	Concentración (mg/L)	Tiempo del proceso (h)	% Remoción
2-Clorofenol	300	95	99
	500	57	90
	700	48	99
2,4-Diclorofenol	300	32	94
	500	49	98
	700	47	99
2,4,6-Triclorofenol	300	72	52
	500	170	43

Para el 2-clorofenol se observa una tendencia general a disminuir el tiempo de la prueba mientras mayor es la concentración del compuesto para alcanzar un porcentaje de remoción cercano al 90%. Para el caso del 2,4,6-triclorofenol no se observa esto puesto que los porcentajes máximos alcanzados con este compuesto fueron cercanos al 50% y el tiempo de las corridas cercano a 100 horas.

#### 3.5.2 Cinética de degradación

La cinética de remoción de los compuestos se muestra en las Figuras 27, 28 y 29.

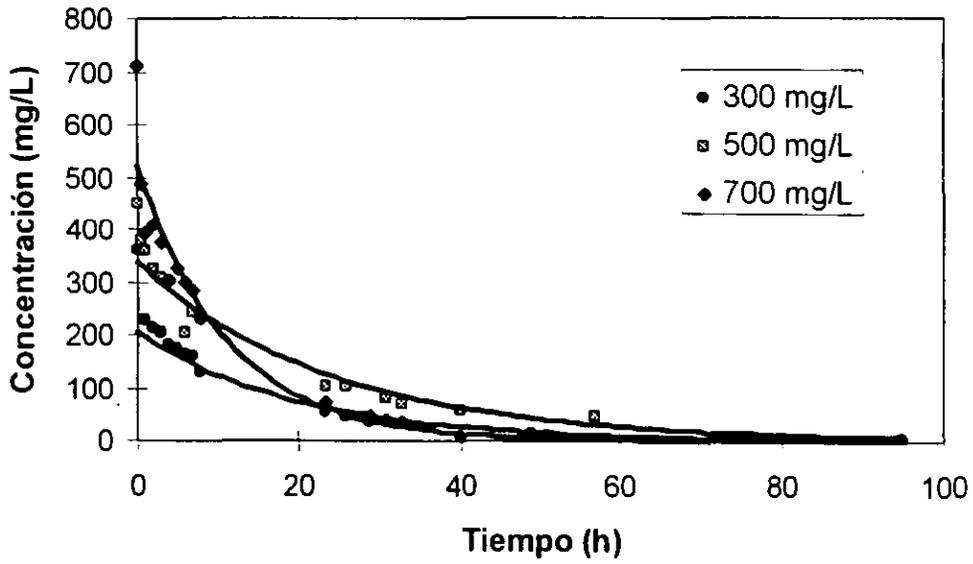


Figura 27. Cinética de remoción del 2-clorofenol a diferentes concentraciones.

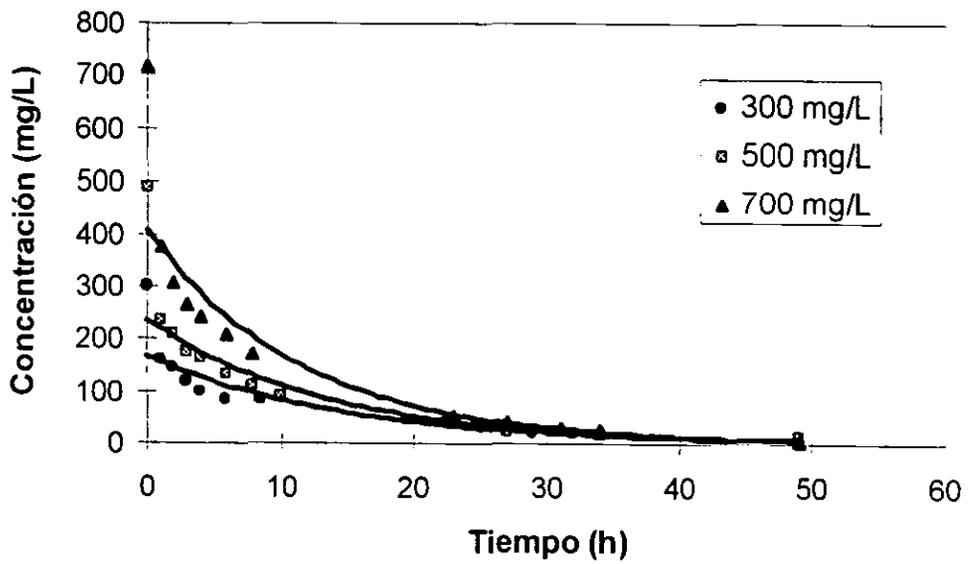
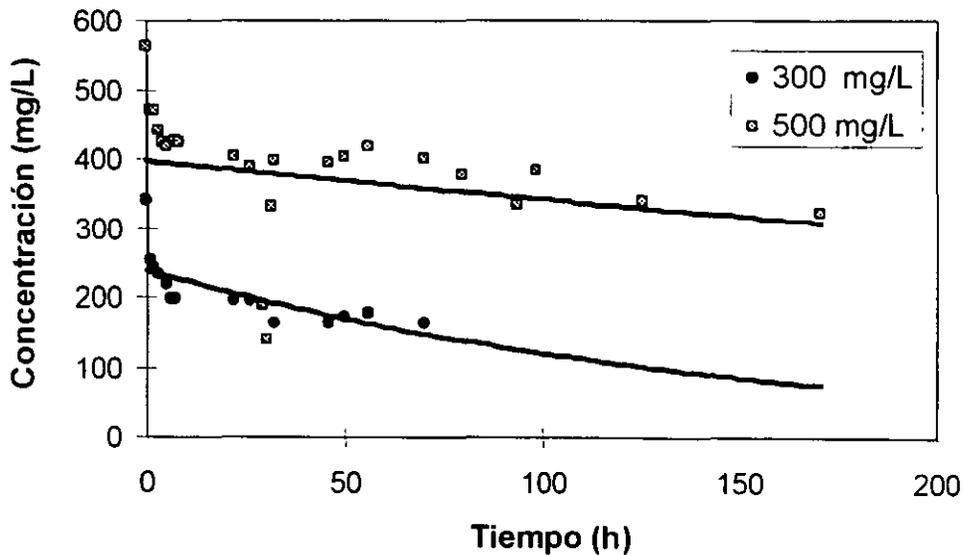


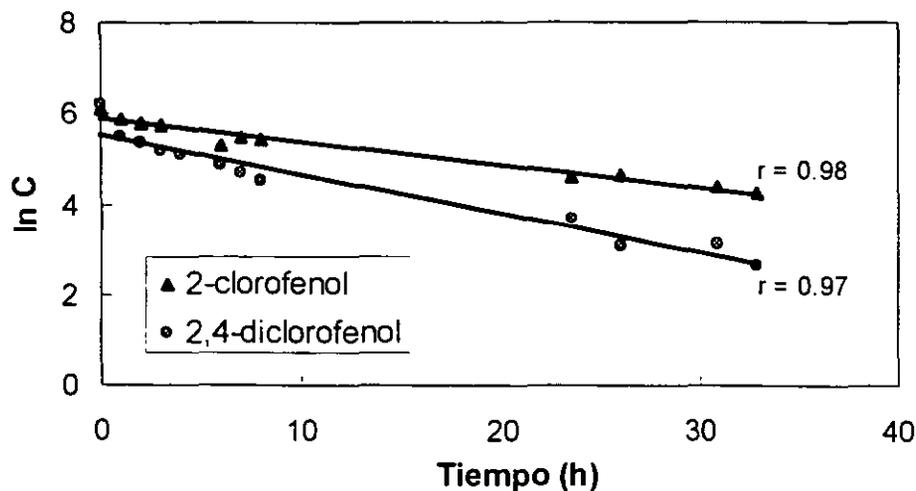
Figura 28. Cinética de remoción del 2,4-diclorofenol a diferentes concentraciones.



**Figura 29. Cinética de remoción del 2,4,6-triclorofenol a diferentes concentraciones.**

De acuerdo a Burton y Tchobanoglous (1991) se determinó la cinética de remoción para el 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol a 500 mg/L. Los datos obtenidos fueron representados por la ecuación  $\ln C = \ln C_0 - kt$  y las constantes cinéticas  $C_0$  y  $k$  para cada compuesto y concentración fueron determinados (Figura 30).

Para el caso del 2,4,6-triclorofenol nuevamente no se determinó la cinética de remoción, ya que la variación en la concentración no fue significativa y no se pudieron ajustar los datos a ningún orden de reacción.



**Figura 30. Representación de los datos obtenidos por medio de la ecuación de primer orden.**

En la Tabla 29 se presentan los valores de  $C_0$ ,  $k$  y  $r$ . La ecuación empleada representa adecuadamente los datos obtenidos para el 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol con coeficientes de correlación mayores a 0.96.

**Tabla 29. Valores de las constantes cinéticas de primer orden.**

Compuesto	$k$ ( $h^{-1}$ )	$C_0$ (mg/L)
2-Clorofenol	0.051	358.78
2,4-Diclorofenol	0.087	251.89

Sin embargo, considerando el efecto de sorción en el biocatalizador, se encontró que para 44 g de biocatalizador presente en la columna, se sorben 880 mg de 2-clorofenol y 1760 mg de 2,4-diclorofenol. Por lo tanto la remoción de los clorofenoles que se observó durante el tiempo de la experimentación es debida a la sorción de los clorofenoles en el biocatalizador y las constantes de velocidad encontradas son

constantes de velocidad de sorción. Así también, debido a los largos tiempos de experimentación, es probable que parte de la remoción sea debida a la fotólisis. No se descarta la existencia de biodegradación en el proceso, sin embargo, para que se pueda cuantificar se debe emplear una técnica analítica más precisa.

# ***CAPITULO 4***

*Conclusiones y Recomendaciones*

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

✗ La bacteria con la cual se trabajó fue identificada como *Pseudomonas fluorescens*, de acuerdo con los resultados obtenidos utilizando el sistema de identificación API.

De los resultados de las pruebas testigos se concluye lo siguiente.

✗ Se detectó 15% de disminución de 2-clorofenol y 17 % de disminución de 2,4-diclorofenol a las 24.5 h en la prueba de descomposición sin aireación. La disminución pudo haber sido provocada por fotólisis.

✗ Por otro lado, se propuso una ecuación que representara la remoción de los clorofenoles por efecto de la aplicación de aire, la ecuación incluye dos fuerzas motrices

- La relación de flujo molar de aire con las moles de trabajo
- El gradiente de concentración

✗ La sorción de los compuestos clorofenólicos en el alginato de calcio fue un mecanismo importante en la remoción, alcanzándose porcentajes de remoción hasta del 90%. La cantidad de clorofenoles que pueden ser sorbidas por el alginato fueron 0.02 g de 2-clorofenol/g alginato y 0.04 g de 2,4-diclorofenol/g alginato.

De la comparación de los tres sistemas empleados, es decir, para las pruebas en matraz agitado utilizando bacterias libres e inmovilizadas y para el sistema de columna empacada se puede concluir lo siguiente

- ✘ Los parámetros medidos como pH, oxígeno disuelto y crecimiento bacteriano durante la prueba de remoción de los clorofenoles utilizando células libres e inmovilizadas en un reactor agitado no son parámetros limitantes en la cinética de remoción, debido a que los cambios en sus valores son mínimos.
- ✘ A pesar de que Cabello (1995) y Sánchez de la Vega (1995) reportaron que la bacteria *Pseudomonas fluorescens* es degradadora de fenoles, con los resultados obtenidos de las pruebas de este trabajo, se demostró que no pudo degradar el 2,4,6-triclorofenol bajo las condiciones de operación específicas de este trabajo. Tanto en la prueba de matraces agitados como en la prueba de columna empacada no se observó remoción de dicho compuesto. En otros trabajos como el de Kiyojara *et al.* (1992) se ha reportado a la *Pseudomonas pickettii* como degradadora de 2,4,6-triclorofenol y a *Rhodococcus chlorophenolicus* por degradar 2,3,4-, 2,3,5-, 2,3,6-, 2,4,6- y 2,4,5-triclorofenol (Apajalahti y Salkinoja-Salonen, 1986). Sin embargo, con la bacteria usada en este trabajo no se obtuvieron resultados positivos.
- ✘ La cinética de remoción en los tres sistemas empleados se ajustó a una ecuación de primer orden para el 2-clorofenol y 2,4-diclorofenol, presentando velocidades de remoción del orden de  $0.2 \text{ h}^{-1}$  para los sistemas de matraz agitado y del orden de  $0.06 \text{ h}^{-1}$  para la columna empacada.
- ✘ Para el caso de los sistemas de matraces agitados, específicamente para el 2-clorofenol, se observó que la velocidad de remoción por desorción ( $0.51 \text{ h}^{-1}$ ) fue mayor a la velocidad de remoción por otros mecanismos ( $0.2 \text{ h}^{-1}$ ). Con estos resultados no se puede descartar la posibilidad de que exista biodegradación, sin embargo no se pudo cuantificar bajo las condiciones de este experimento.
- ✘ A pesar de que se ha reportado que los sistemas de bacterias inmovilizadas han sido exitosos en el tratamiento de efluentes con compuestos clorofenólicos, en este

estudio no se pudo observar lo mismo, debido a que existieron diversos mecanismos alternos en la remoción.

- ✎ La eficiencia de remoción de los compuestos clorofenólicos estuvo en función del estado en que encontraban las células, así como del tipo de reactor. Se observó una menor eficiencia en los sistemas de células inmovilizadas debido esto a los fenómenos de transferencia en el alginato.

### 4.2 Recomendaciones

- ✎ La relación del flujo de aire en el sistema de reactor agitado y bajo las condiciones particulares de trabajo, provocó desorción de los compuestos clorofenólicos con constantes de velocidad de  $0.510 \text{ h}^{-1}$  para el 2-clorofenol y  $0.138 \text{ h}^{-1}$  para el 2,4-diclorofenol. Es por esto, que se concluye que para el diseño de un sistema de tratamiento se debe considerar

- a) La dilución previa de oxígeno, o bien,
- b) Las emisiones atmosféricas y su tratamiento

- ✎ A pesar de que no fue demostrado, el fenómeno de sorción puede considerarse como una ventaja ya que facilita la disponibilidad del sustrato a las bacterias. Es por esto, que se recomienda realizar pruebas posteriores con el objeto de demostrarlo.

- ✎ Una alternativa para demostrar si *Pseudomonas fluorescens* degrada 2,4,6-triclorofenol es disminuir las concentraciones de trabajo y aclimatar previamente las bacterias a los clorofenoles, así como aumentar el tiempo de experimentación. El cambio de la técnica analítica para determinar clorofenoles sería necesario para cuantificar de manera más precisa el grado de biodegradación.

## **4. Conclusiones y recomendaciones**

- ✎ Para el caso de los experimentos en matraz agitado, se recomienda por tanto cambiar las condiciones del experimento, especialmente la relación del flujo de aire y las concentraciones de trabajo (más bajas), así como cambiar la técnica analítica para detectar clorofenoles.
- ✎ Basado en los resultados con las células inmovilizadas, se recomienda probar otros tipos de inmovilización donde la transferencia no sea un factor limitante.

# ***REFERENCIAS***

## Referencias

Allsop P., Y. Chisti, M. Moo-Young Y G. Sullivan (1993) Dynamics of Phenol Degradation by *Pseudomona putida*. **Biotechnology and Bioengineering**. **41** : 572-580.

Apajalahti J.H.A. y M. S. Salkinoja-Salonen (1986) Degradation of Polychlorinated Phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. **Applied Microbiology Biotechnology**. **25** : 62-67.

Arévila A., J. Ramos Y B. Jiménez (1996) Identificación de Tóxicos Prioritarios en México. **XXV Congreso Internacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental . AIDIS. México D.F.**

APHA, AWWA, WPCF (1995) Standard Methods ffor the Examination of Water and Wastewater. 19th.Edit. Washington, D.C. USA.

Armenante P.M., G. Lewandowsky y I.U. Haq (1992) Mineralization of 2-Chlorophenol by *P. chrysosporium* Using Different Reactor Designs. **Hazardous Waste and Hazardous Materials**. **9(3)** : 213-229.

Armenante P.M., N. Pal and G. Lewandowsky (1994) Role of Mycelium and Extracellular Protein in the Biodegradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Phenerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. **60(6)** : 1711-1718.

Atlas R. y R. Bartha (1946) Microbial Ecology. Fundamental and Applications. Third Edition. USA.

Belhatche D. (1995) Choose Appropriate Wastewater Treatment Technologies. **Chemical Engineering Progress**. **32-51U**.

Bishop D. (1980) Toxics in Municipal and Industrial Wastewater. Municipal Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 45268, USA.

Boross L., P. Papp y B. Szaj (1990) Determination of the Growth of Gel Entrapped Microbial Cells at Various Depths of the Alginate Gel. Physiology of Immobilized Cells. **Proceedings of an International Symposium. Wageningen, The Netherlands.**

Brito E., J. Domínguez y L. Casas (1990) Difussion Coefficients of Carbohydrates in Modified K-Carrageenan Gels with and without *Escherichia coli* Immobilized. **Journal of Fermentation and Bioengineering. 69(2) : 135-137.**

Buchholz K. (1979) Characterization of Immobilized Biocatalysts. Ed. Dechema. Frankfurt, Alemania. **84 : 73-94.**

Buitrón G., A. González y L. López-Marín (1997) Biodegradation of Phenolic Compounds by an Acclimated Activated Sludge and Isolated Bacteria. **Proceedings Second International Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes. Berkeley, California, USA. July 21-23.**

Busto M., N. Ortega y M. Perez-Mateos (1995) Studies on Microbial  $\beta$ -D-Glucosidase Immobilized in Alginate Gel Beads. **Process Biochemistry. 30(5) : 421-426.**

Cabello M. (1995) Biodegradación Aerobia de Fenol y Clorofenoles por Medio de *Pseudomonas*. **Tesis De Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.**

Cheetham P.S.J. K.M. Blunt y C. Bucke (1979) Physical Studies on Cell Immobilization Using Calcium Alginate Gels. Cell Immobilization in Alginate Gels. **Biotechnology and Bioengineering. 21 : 2155-2168.**

Cheetham P.S.J. y C. Bucke (1984) Immobilisation of Microbial Cells and Their Use in Wastewater Treatment. **Microbiological Methods for Environmental Biotechnology. 219-234.**

Dapaah S.Y. y G.A. Hill (1992). Biodegradation of Chlorophenol Mixtures by *Pseudomonas putida*. **Biotechnology and Bioengineering. 40 : 1353-1358.**

Dieterich L. (1993) Bio-Anaerobic Reduction and Re-Oxidation (BARR). BARR for Decontamination of Soil and Groundwater. **Vol. 2 : 1.**

Eckenfelder W.W. (1989) Industrial Water Pollution Control. 2ª Edición. **Mc Graw Hill. 136-147.**

Estepé D., F. Godia Y C. Sola (1992) Determination of Glucosa and Ethanol Effective Diffusion Coefficients in Ca-Alginate Gel. **Enzyme Microb Technol. 14 : 396-401.**

Fava F., P.M. Armenante y D. Kafkewitz (1995) Aerobic Degradation and Dechlorination of 2-Chlorophenol, 3-Chlorophenol and 4-Chlorophenol by *Pseudomonas pickettii* Strain. **Letters in Applied Microbiology. 21 : 307-312.**

González A. y G. Buitrón (1995) Estudio de la Dinámica de Poblaciones de los Lodos Activados en un Proceso Biológico Utilizado para el Tratamiento de Efluentes Contaminados con Compuestos Fenólicos. **Memorias del VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Ixtapa, Guerrero : 107.**

Hanna S.A., B.M. Austern, A.E. Eralp y R.H. Wise (1986) Comparative Removal of Toxic Pollutants by Six Wastewater Treatment Processes. **Journal WPCF. 58(1) : 27-34.**

Jang L.K. (1994) Diffusivity of  $\text{Cu}^{+2}$  in Calcium Alginate Gel Beads. **Biotechnology and Bioengineering. 43 : 183-185.**

- Jiménez C. B., E. Becerril, I. Navarro, A. Silva, E. Vega, J. Ramos y J.A. Zuñiga (1991) Tratamiento No Convencional para la Remoción de Contaminantes Tóxicos Prioritarios Presentes en las Aguas Residuales. **Informe del Instituto de Ingeniería de la UNAM para la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación Ambiental : 70-77.**
- Jiménez B., I. Navarro y J. Ramos (1994) Tratamiento de los Tóxicos Prioritarios y su Presencia en Efluentes Industriales. **XXIV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. AIDIS. Buenos Aires, Argentina. Tomo I : 1-20.**
- Katzbauer B., Narodoslowsky M. y A. Moser (1995) Classification System for Immobilization Techniques. **Bioprocess Engineering. 12 : 173-179.**
- Kafkewitz D., P.M. Armenante, G. Lewandowsky y C. Kung (1992) Dehalogenation and Mineralization of 2,4,6-Trichlorophenol by the Sequential Activity of Anaerobic and Aerobic Microbial Population. **Biotechnology Letters. 14 (2) : 143-148.**
- Kafkewitz D., F. Fava y M. Armenante (1996) Effect of Vitamins on the Aerobic Degradation of 2-Chlorophenol, 4-Chlorophenol and 4-Chlorobiphenyl. **Appl. Microbiol. Biotechnol. 46 : 414-421.**
- Karel S.F., S.B. Libicki y C.R. Robertson (1985) The Immobilization of Whole Cells: Engineering Principles. **Chemical Engineering Science. 40(8) : 1321-1354.**
- Katayama-Hirayama K., S. Tobita y K. Hirayama (1994) Biodegradation of Phenols and Monochlorophenols by Yeast *Rhodotorula glutinis*. **Wat. Sci. Tech. 30(9) : 59-66.**
- Kennedy J.F. y Cabral (1983) Immobilized Living Cells Application. **Appl. Biochem. Bioeng. 4 : 189-280.**

Keweloh H., H.J. Herpieper y H.J. Rehm (1989) Protection of Bacteria Against Toxicity of Phenol by Immobilization in Calcium Alginate. **App Microbiol Biotechnol.** **31**: 383-389.

Kincannon D.F., E.L. Stover, V. Nichols y D. Medley (1983) Removal Mechanisms for Toxic Priority Compounds. **Journal WPCF.** **55(2)** : 157-163.

Kiyohara H., T. Hatta, Y. Ogawa, T. Kakuda, H. Yokoyama y N. Takizawa (1992) Isolation of *Pseudomonas pickettii* that Degrade 2,4,6-Trichlorophenol and their Dechlorination of Chlorophenols. **Applied and Environmental Microbiology.** **1276-1283.**

Lakhwala F. y S. Sofer (1991). Design Considerations for an Immobilized Cell Bioreactor Operating in Batch Recirculation Mode. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** **52**: 499-509.

Lee C. M., C.J. Lu y M.S. Chuang (1994) Effects of Immobilized Cells on the Biodegradation of Chlorinated Phenols. **Wat. Sci. Tech.** **30(9)** : 87-90.

Mackay D., W.Y. Shiu y K. C. Ma (1992) Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Polynuclear Aromatics, Hydrocarbons, Polychlorinated Dioxins and Dibenzofurans. **Editorial Lewis Publishers** : 3-8.

Magbanua B.S., P.A. Hoover, P.J. Campbell y A.R. Bowers (1994) The Effect of Cosubstrates on Phenol Degradation Kinetics. **Wat. Sci. Tech.** **30(9)** : 67-77.

Martinsen A., G. Skjak-Braek y O Smidsrod (1989) Alginate as Immobilization Material: I. Correlation Between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads. **Biotechnology and Bioengineering.** **33** : 79-89.

Martinsen A., I. Storro y G. Skjak-Braek (1992) Alginate as Immobilization Material. III Diffusional Properties. **Biotechnology and Bioengineering.** **39** :186-194.

Metcalf y Eddy (1996) Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, Vertido y Reutilización. **Tomo 1. Mc Graw Hill. : 327-333.**

O'leary W. (1990) Handbook of Microbiology. **CRC Press. EUA. 55-66.**

Oyaas J., I. Storro, H. Svendsen y D. Levine (1995) The Effective Diffusion Coefficient and the Distribution Constant for Small Molecules in Calcium-Alginate Beads. **Biotechnology and Bioengineering. 47 : 492-500.**

Pai S., Y. Hsu, N. Chong, C. Sheu y C. Chen (1995) Continuous Degradation of Phenol by *Rhodococcus sp.* Immobilized on Granular Activated Carbon and in Calcium Alginate. **Bioresource Technology. 51: 37-42.**

Quail B. y G. Hill (1991). A Packed-Column Bioreactor for Phenol Degradation: Model and Experimental Verification. **J. Chem. Tech. Biotechnol. 25: 545-557.**

Quirasco B. M. (1994) Producción y Caracterización de un Biocatalizador con Actividad Glucosiltransferasa. **Tesis De Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.**

Rittmann B.E. (1992) Innovations in Biological Processes for Pollution Control. **Environmental Microbiology. 265-286.**

Rochkind-Dubinsky M., Sayler G. S. y J. W. Blackburn (1987) Microbiological Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds. Marcel Dekker, Inc. New York And Basel. 95-101.

Rosas D., A. Sánchez de la Vega. L. Torres y B. Jiménez (1995) Inmovilización de *Pseudomonas* en Cuatro Matrices para la Remoción de Clorofenoles en Agua. **Memorias del VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Ixtapa Zihuatanejo : 97.**

- Sáez P.B. y B.E. Rittmann (1991) Biodegradation Kinetics of 4-Chlorophenol an Inhibitory Co-Metabolite. **Research Journal WPCF. 63(6) : 838-847.**
- Sánchez de la Vega A. (1996) Diseño de un Biocatalizador para la Remoción de Clorofenoles en Agua. **Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.**
- Scott C., C. Woodward y J. Thompson (1989) Solute Diffusion in Biocatalyst Gel Beads Containing Biocatalysis and Other Additives. **Enzyme Microb Technol. 11 : 258-263.**
- Shuckrow A., A. Pajak y C. Touchill (1982) Hazardous Waste Leachate Management Manual. **Noyes Data Corporation, New Jersey, USA.**
- Singh N y G. Hill (1986). Air-Stripping Effects on Cell Growth with Volatile Substrates. **Biotechnol. and Bioeng. XXX: 521-527.**
- Sitting Marshall (1973). Pollutant Removal Handbook. Noyes Data Corporation. 409-422.
- Skjak-Braek G. y A. Martinsen (1991) Applications of Some Algal Polysaccharides in Biotechnology. **En: Seaweed Resources in Europe: Uses And Potential. Guiry M.D. and G. Blunden (Edit). John Wiley & Sons Ltd, England. 219-257.**
- Smidsrod O. y G. Skjak-Braek (1990). Alginates for Cell Immobilization. **Trends in Biotechnology . 8(3) : 71-78.**
- Torres L.G. (1994) Eliminación de Fenoles y Clorofenoles en Agua por Medio de Microorganismos Inmovilizados. **Biotecnología. 4(2) : 49-65.**

Van Ginkel C.G., J. Tramper, K. Luyben y A. Klapwijk (1983) Characterization of *Nitrosomona europaea* Immobilized in Calcium Alginate. **Enzyme Microbiology Technology. 5 : 297-303.**

Vijayaraghavan S., T. Srinivasaraghavan, S. Musti, S. Kar, T. Swaminathan y A. Baradarajan (1995) Biodegradation of Phenol by *Arthrobacter* and Modelling of Kinetics. **Bioprocess Engineering. 12 : 227-229.**

Weber W. Y Smith E. (1986) Removing Dissolved Organic Contaminants from Water. **Environmental Science Technology. 20(10) : 970-979.**

Westmeier F. y H.J. Rehm (1985) Biodegradation of 4-Chlorophenol by *Entrapped Alcaligenes sp A 7-2*. **Applied Microbiology and Biotechnology. 22 :301-305.**

Wu W., Sikhoun y G.B. Delancey (1994) Difussion of Acetophenone and Phenethyl Alcohol in the Calcium-Alginate-Bakers' Yeast-Hexane System. **Biotechnology and Bioengineering. 44 :1217-1227.**

Zache G. y H.J. Rehm (1989) Degradation of Phenol by a Coimmobilized Entrapped Mixed Culture. **Applied Microbiology and Biotechnology. 30:426-432.**

Zlokarnik M. (1990) Trends and Needs in Bioprocess Engineering. **Chemical Engineering Progress. 62-67.**

# ***ANEXO A***

*Medios utilizados en el estudio*

### **Medios utilizados**

Los medios utilizados para llevar a cabo el crecimiento de la bacteria así como las pruebas de degradación se presentan en las tablas siguientes

**Tabla A.1 Medio de crecimiento (YPG)**

COMPONENTE	g/L
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	10
Dextrosa anhidra	10
Agar-agar (para medio sólido)	18

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

**Tabla A.2 Medio para Pseudomonas (King-B)**

COMPONENTE	g/L
Polipeptona	20
Glicerol	10
Sulfato de magnesio	1.5
Fosfato de potasio monobásico	0.9
Fosfato de potasio dibásico	0.9
Agar-agar (para medio sólido)	15

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

**Tabla A.3 Medio mineral diluido (Adaptado de Dapaah y Hill, 1992)**

COMPONENTE	g/L
Fosfato de potasio monobásico	0.084
Fosfato de potasio dibásico	0.075
Sulfato de amonio	0.488
Cloruro de sodio	0.06
Cloruro de calcio	0.6
Sulfato de magnesio	0.06
Cloruro ferroso	0.0006

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

# ***ANEXO B***

*Prueba de identificación API*

### **Identificación y aislamiento**

La prueba de identificación del API fue utilizada para la identificación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* en la etapa I de este trabajo. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. Se preparó agar base sangre (40 g/L), se esterilizó y se prepararon cajas Petri, las cuales se metieron a prueba de esterilidad por 24 h.
2. Las cajas Petri fueron sembradas con una asada de la muestra original, quemando el asa cada vez que se realiza el estriado. Las cajas se metieron a incubación a 37°C por 24 h.
3. Una vez que la cepa creció, se procedió a hacer la prueba del API.
4. Se humedeció la base de las cajas con agua destilada, retirando el exceso y colocando encima la tira de pruebas bioquímicas.
5. Se tomó con un palillo un poco del crecimiento bacteriano de la caja y se transfirió a un tubo con 5 mL de solución de NaCl al 0.85% estéril. La turbiedad de la solución del tubo debe ser similar a la última de la escala de Mc Farland. Esto con el objeto de que las reacciones no sean demasiado rápidas ni lentas.
6. Con una pipeta Paster estéril se tomó una muestra del tubo y se llenaron los pozos de la tira, procurando poner la punta de la pipeta sobre un borde, evitando de esta manera la formación de burbujas dentro del pozo.
7. Los lugares con la leyenda en recuadro se llenaron totalmente con la muestra. Los pozos con leyenda subrayada se terminaron de llenar con aceite mineral.
8. Una vez que se terminó el llenado, se tapó la tira y se metió a la incubadora a 37°C por 24 h.
9. Después de 24 h en la incubadora, se procedió a comparar los colores de la prueba con los colores indicados en el manual, para de esta manera determinar cuales eran las reacciones positivas y las negativas.

10. Se realizó la suma de los puntos que resultaron positivos y una vez que se obtuvo el código de números, se buscó el correspondiente en el catálogo para saber de esta manera de que microorganismo se trataba.

# **ANEXO C**

*Técnica de la 4-aminoantipirina*

### ***Técnica de la 4-aminoantipirina***

El método colorimétrico de la 4-aminoantipirina determina fenol orto y meta sustituido y bajo condiciones adecuadas de pH meta sustituidos. Ofrece una evaluación general de algunas especies fenólicas. La técnica analítica es la siguiente:

1. Tomar una alícuota de 100  $\mu$ L de la solución problema y llevarla a 10 mL con agua destilada.
2. Agregar 250 L de hidróxido de amonio 0.5 N.
3. Agregar 150 L de una solución buffer de fosfatos (pH 6.8).
4. Agregar 100 L de 4-aminoantipirina al 2% y agitar bien.
5. Agregar 100 L de ferricianuro de potasio al 8% y agitar bien,
6. Esperar 15 minutos para que desarrolle el color.
7. Leer en el espectrofotómetro contra el blanco a 500 nm.
8. Determinar la concentración usando la curva de calibración.

Curva de calibración.

1. Preparar soluciones de clorofenoles a concentraciones conocidas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L).
2. Seguir los pasos del procedimiento anterior hasta el paso 7.
3. Determinar la curva de calibración con los datos obtenidos.

# ***ANEXO D***

*Preparación del biocatalizador*

### **Preparación del biocatalizador**

El biocatalizador se preparó de acuerdo con Sánchez de la Vega *et al.*, (1995), el procedimiento es el siguiente:

- ↻ Hacer crecer la *Pseudomonas fluorescens* por incubación a 35 °C en un agitador orbital a 200 rpm en medio YPG (50 mL) por 16 h. Después de este periodo el cultivo fue centrifugado a 4500 rpm y resuspendido con solución salina (1 g KCl / L) para obtener las células limpias.
- ↻ Preparar la solución de alginato al 2.5%, utilizando un agitador Lightnin de velocidad variable. El alginato en polvo se adicionó poco a poco en el agua destilada para evitar la formación de grumos.
- ↻ Poner las bacterias en la solución y seguir agitando para lograr una homogeneización completa.
- ↻ Pasar la solución alginato/bacterias a través de una aguja extrusora aplicando un flujo axial a una presión de 1.5 kg/cm<sup>2</sup>, como se muestra en el esquema (Figura 12 del capítulo de material y métodos).
- ↻ Hacer caer las gotas en una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 N, dejándolas macerar por 1 hora.

# ***ANEXO E***

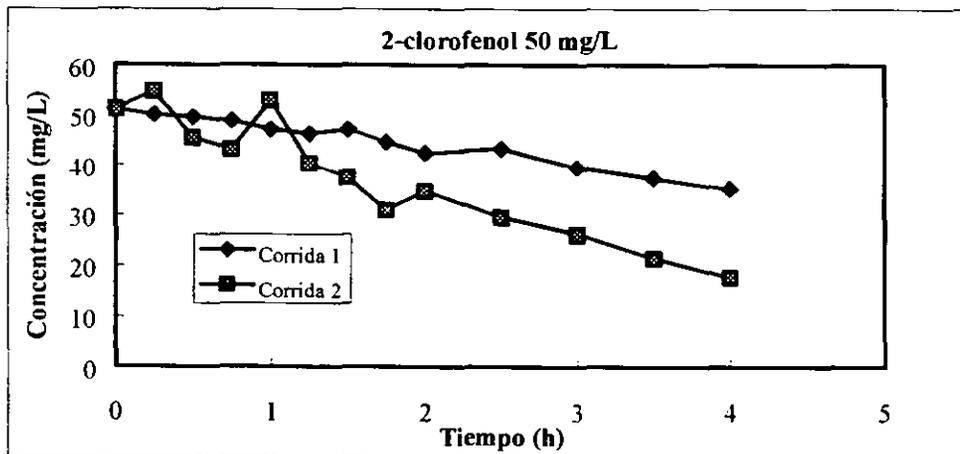
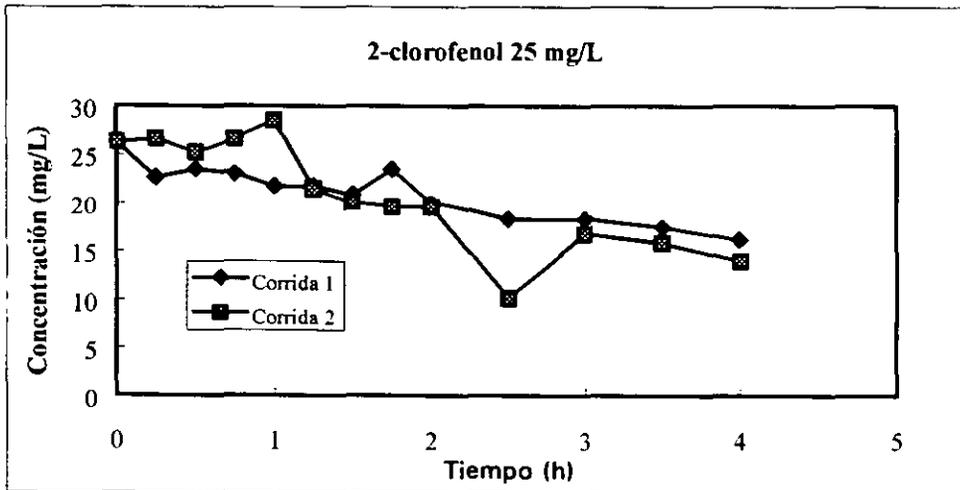
*Resultados de las pruebas con  
células libres en reactor agitado*

2-clorofenol 25 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	26.24	26.24
0.25	22.55	26.58
0.5	23.41	25.17
0.75	22.98	26.58
1	21.7	28.46
1.25	21.7	21.41
1.5	20.84	20
1.75	23.41	19.53
2	19.98	19.53
2.5	18.26	10.13
3	18.26	16.72
3.5	17.41	15.78
4	16.12	13.9

2-clorofenol 50 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	51.12	51.12
0.25	50	54.75
0.5	49.57	45.36
0.75	48.72	43.01
1	47	52.87
1.25	46.14	40.19
1.5	47.06	37.38
1.75	44.43	30.8
2	42.28	34.56
2.5	43.14	29.39
3	39.28	26.11
3.5	37.14	21.41
4	34.99	17.66

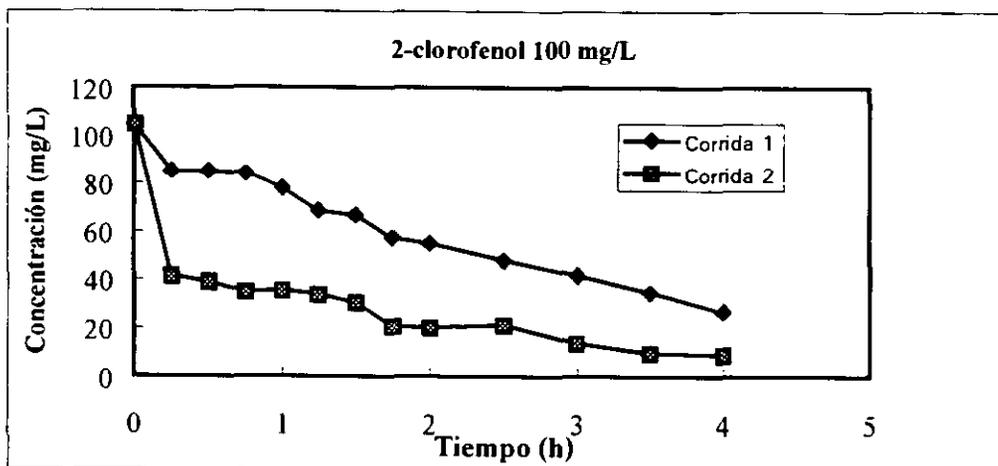
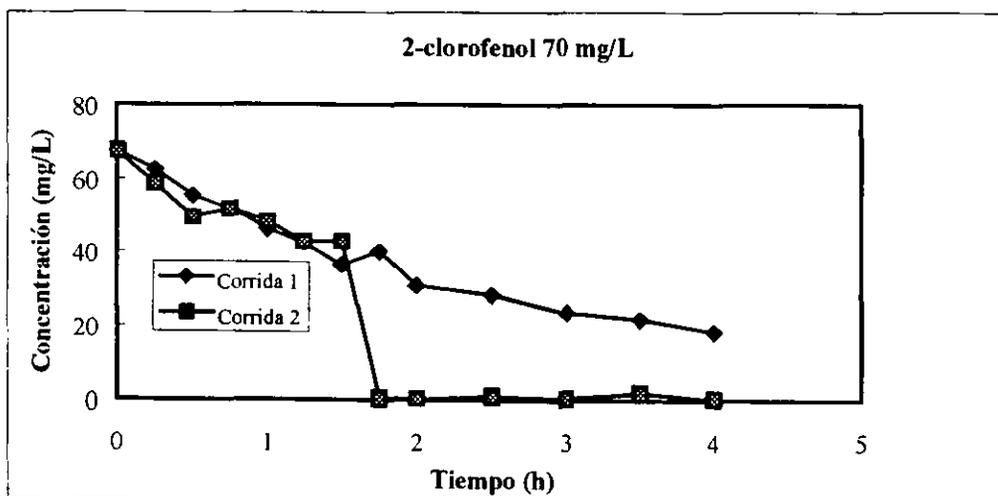


2-clorofenol 70 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	67.4	67.4
0.25	62.26	58.5
0.5	55.22	49.11
0.75	51.46	51.46
1	45.83	47.7
1.25	42.07	42.54
1.5	35.97	42.54
1.75	39.72	0.29
2	30.33	0
2.5	27.99	0.76
3	23.29	0.29
3.5	21.41	1.69
4	18.13	0.29

2-clorofenol 100 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	104.3	104.3
0.25	84.79	41.23
0.5	84.79	38.76
0.75	83.85	34.79
1	77.75	35.29
1.25	68.36	33.8
1.5	66.48	30.33
1.75	57.09	20.42
2	54.75	19.93
2.5	47.7	20.92
3	41.6	13.48
3.5	34.56	9.52
4	26.58	8.88

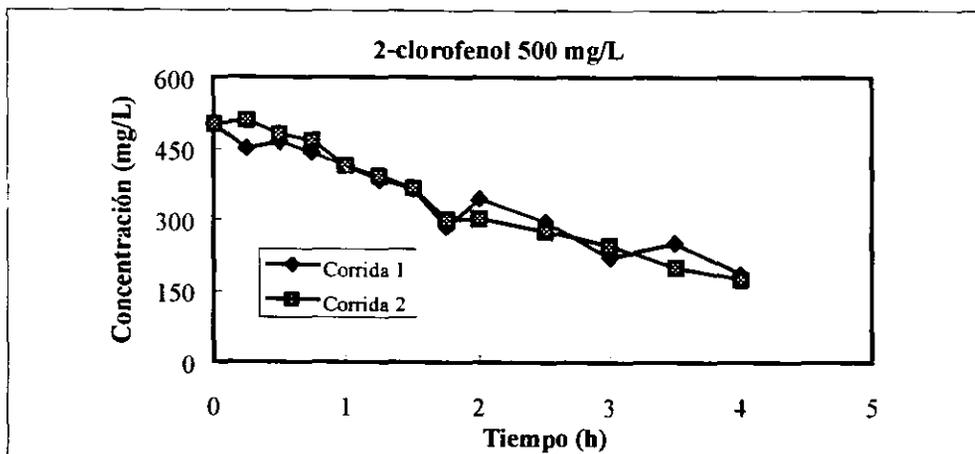
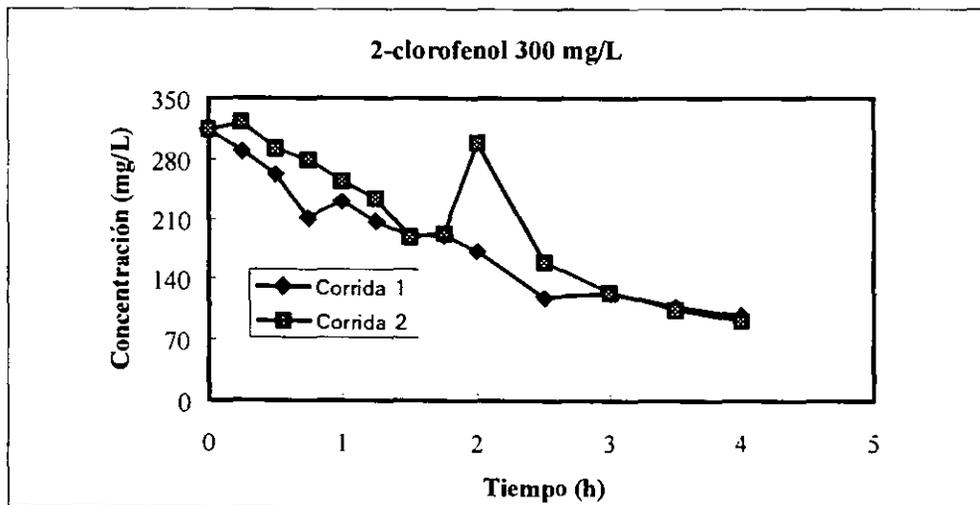


**2-clorofenol 300 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	313.6	313.6
0.25	288.62	322.31
0.5	261.86	291.59
0.75	210.32	278.71
1	230.14	253.93
1.25	206.36	233.12
1.5	189.51	188.52
1.75	190.5	192.48
2	171.67	298.53
2.5	118.15	158.78
3	123.11	124.1
3.5	107.25	104.28
4	97.34	91.39

**2-clorofenol 500 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	501.4	501.4
0.25	450.16	508.64
0.5	464.04	479.89
0.75	442.23	467.01
1	412.5	413.49
1.25	382.77	390.7
1.5	363.94	365.92
1.75	283.66	298.53
2	343.13	301.5
2.5	295.55	274.74
3	220.23	245.01
3.5	249.96	199.42
4	185.54	174.64

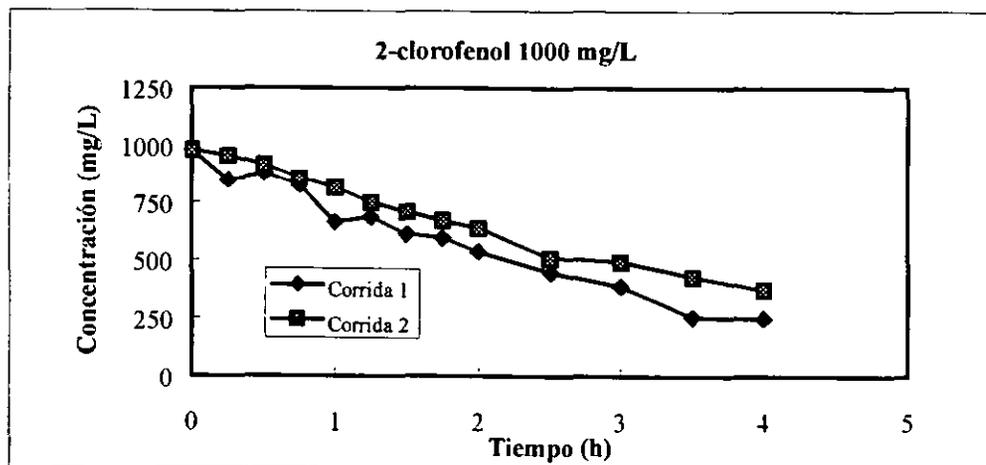
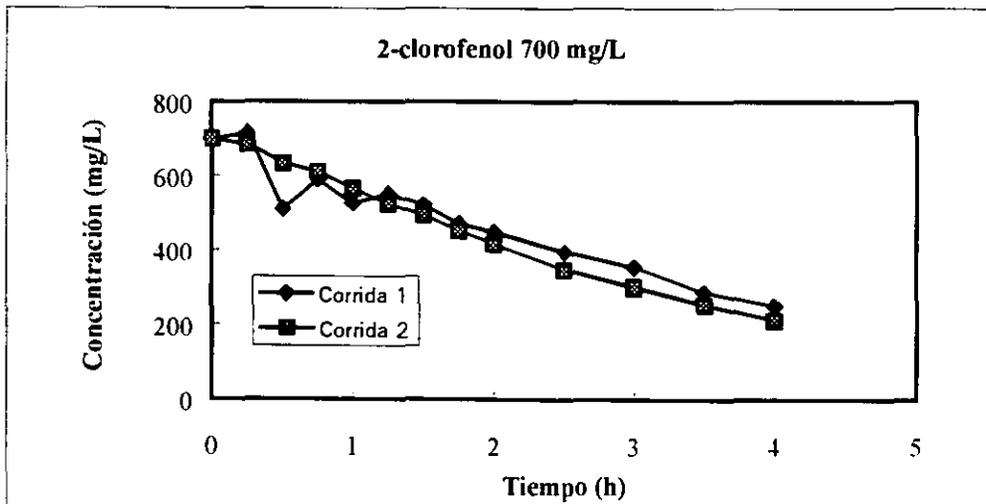


**2-clorofenol 700 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	698.7	698.7
0.25	713.79	684.06
0.5	507.65	631.53
0.75	588.91	609.73
1	523.5	564.14
1.25	549.27	521.52
1.5	518.55	491.79
1.75	468	449.17
2	445.21	413.49
2.5	392.68	344.12
3	351.05	298.53
3.5	284.65	252.94
4	247.98	210.32

**2-clorofenol 1000 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	976.6	976.6
0.25	842.63	949.67
0.5	874.34	912.01
0.75	820.83	852.54
1	662.25	812.9
1.25	684.06	747.49
1.5	609.73	705.86
1.75	591.89	668.2
2	533.41	635.49
2.5	443.22	506.65
3	384.75	489.81
3.5	252.94	426.38
4	246	370.88

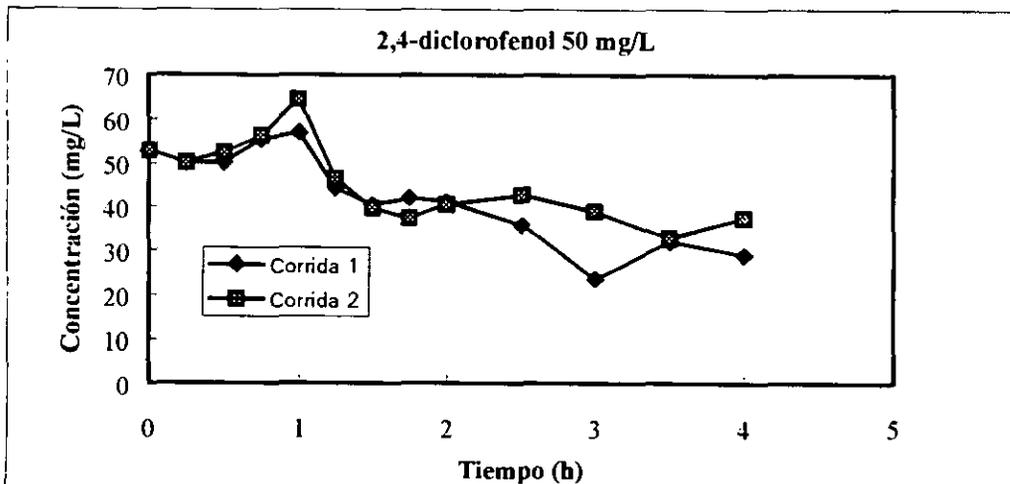
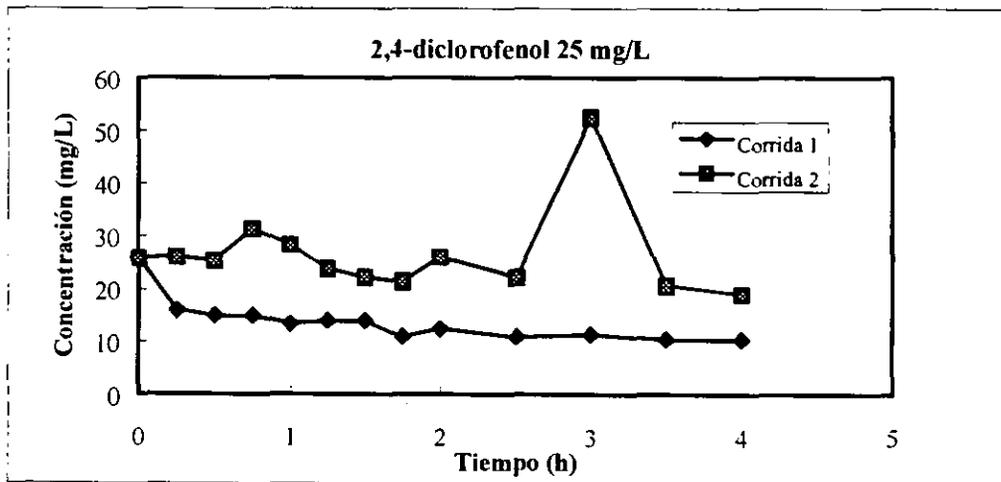


2,4-diclorofenol 25 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	25.6	25.6
0.25	15.82	25.83
0.5	14.81	25.07
0.75	14.81	31.13
1	13.3	28.1
1.25	13.81	23.56
1.5	13.81	22.04
1.75	10.79	21.28
2	12.3	25.83
2.5	10.79	22.04
3	11.29	52.35
3.5	10.29	20.53
4	10.29	19.01

2,4-diclorofenol 50 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	52.75	52.75
0.25	50.08	50.08
0.5	50.08	52.35
0.75	55.38	56.14
1	56.9	64.48
1.25	44.02	46.29
1.5	40.23	39.47
1.75	41.74	37.2
2	40.99	40.23
2.5	35.68	42.5
3	23.56	38.71
3.5	31.89	32.65
4	28.86	37.2

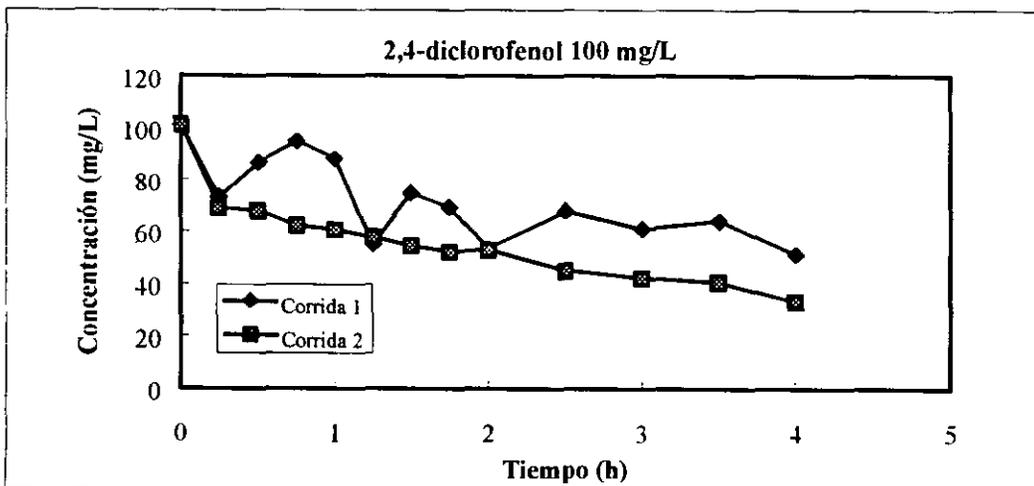
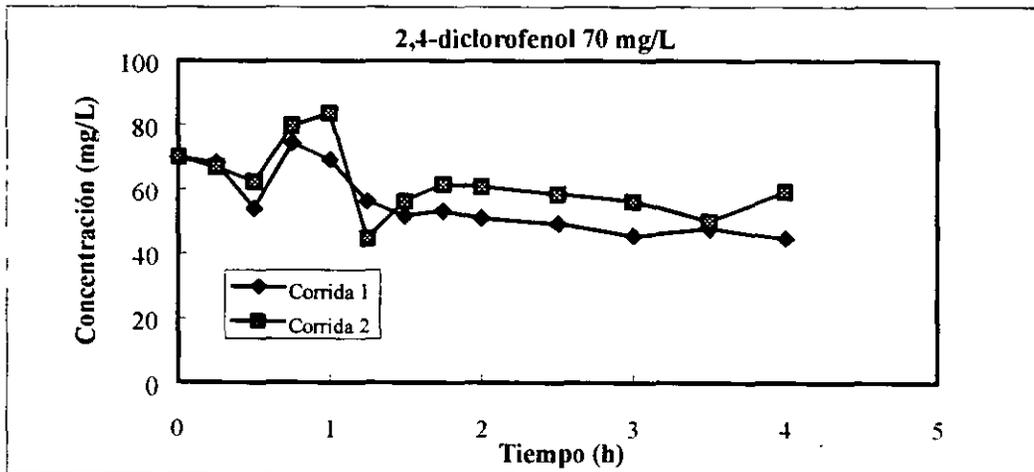


2,4-diclorofenol 70 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	69.84	69.84
0.25	68.26	66.75
0.5	53.87	62.2
0.75	74.33	79.63
1	69.02	83.42
1.25	56.14	44.77
1.5	51.59	56.14
1.75	53.11	61.44
2	50.84	60.69
2.5	49.32	58.41
3	45.53	56.14
3.5	47.81	50
4	44.77	59.17

2,4-diclorofenol 100 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	101	101
0.25	72.81	68.59
0.5	86.45	67.49
0.75	94.79	61.96
1	87.97	60.31
1.25	54.62	57.55
1.5	74.33	54.23
1.75	69.02	52.03
2	53.11	52.58
2.5	67.51	44.85
3	60.69	42.09
3.5	63.72	40.43
4	50.84	33.25

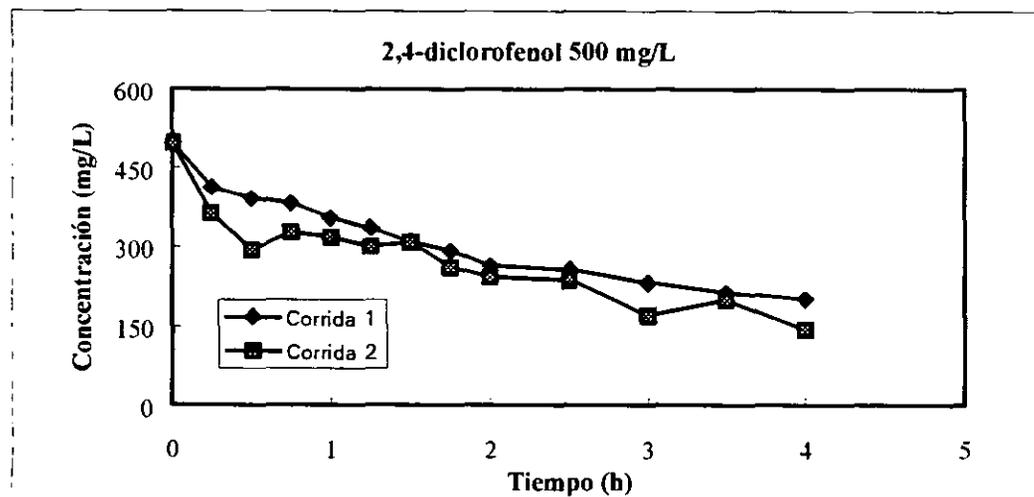
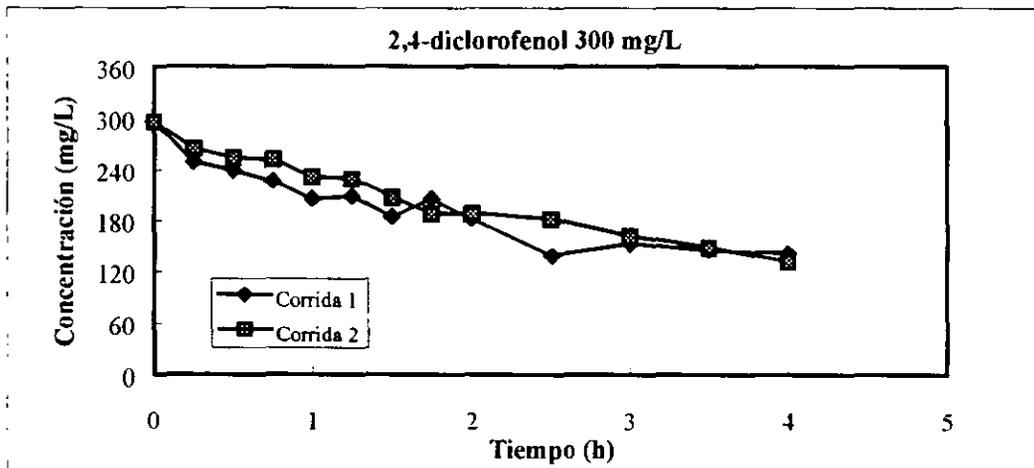


**2,4-diclorofenol 300 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	295.01	295.01
0.25	248.71	264.17
0.5	238.77	254.23
0.75	225.52	252.02
1	204.54	231.04
1.25	207.85	228.84
1.5	183.56	206.75
1.75	204.54	187.98
2	181.35	187.98
2.5	138.29	181.35
3	152.64	161.48
3.5	144.91	148.23
4	141.6	131.66

**2,4-diclorofenol 500 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	497	497
0.25	411.04	361.34
0.5	390.05	292.88
0.75	380.12	326.01
1	352.51	316.07
1.25	333.74	299.51
1.5	308.34	307.24
1.75	290.67	259.75
2	261.96	240.98
2.5	255.34	235.46
3	229.94	169.21
3.5	212.27	197.92
4	200.13	142.7

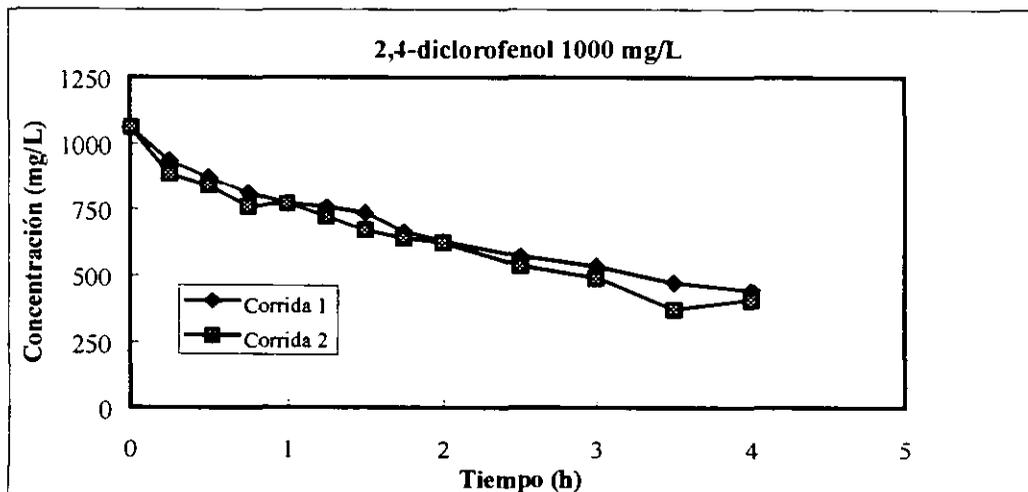
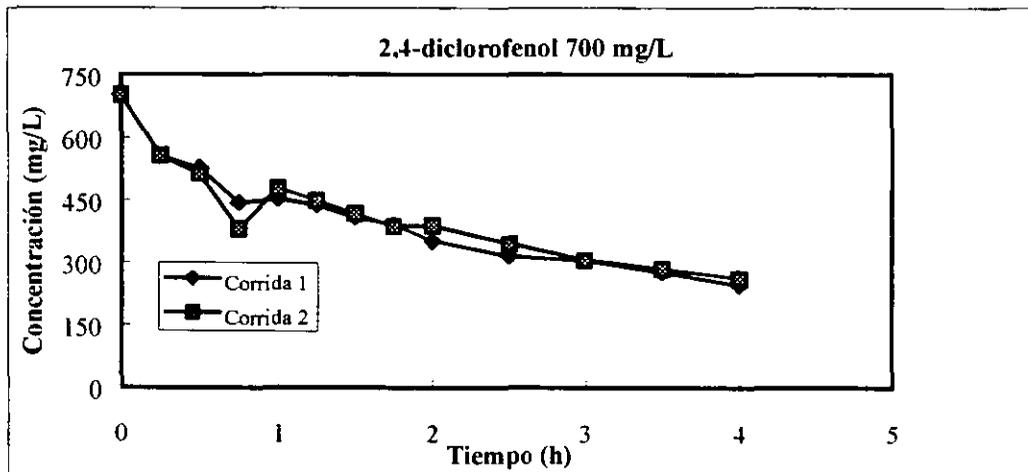


**2,4-diclorofenol 700 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	701.1	701.1
0.25	555.69	556.79
0.5	528.08	512.63
0.75	443.06	380.12
1	451.89	477.29
1.25	436.43	447.48
1.5	407.72	416.56
1.75	390.05	385.64
2	350.3	387.85
2.5	314.97	344.78
3	303.92	305.03
3.5	276.32	284.05
4	246.5	261.96

**2,4-diclorofenol 1000 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	1059	1059
0.25	934.45	883.65
0.5	872.61	839.48
0.75	811.87	757.77
1	768.81	768.81
1.25	755.56	719.12
1.5	732.37	668.32
1.75	661.7	638.51
2	626.36	620.84
2.5	571.15	534.71
3	533.61	489.44
3.5	471.77	372.39
4	443.06	406.62

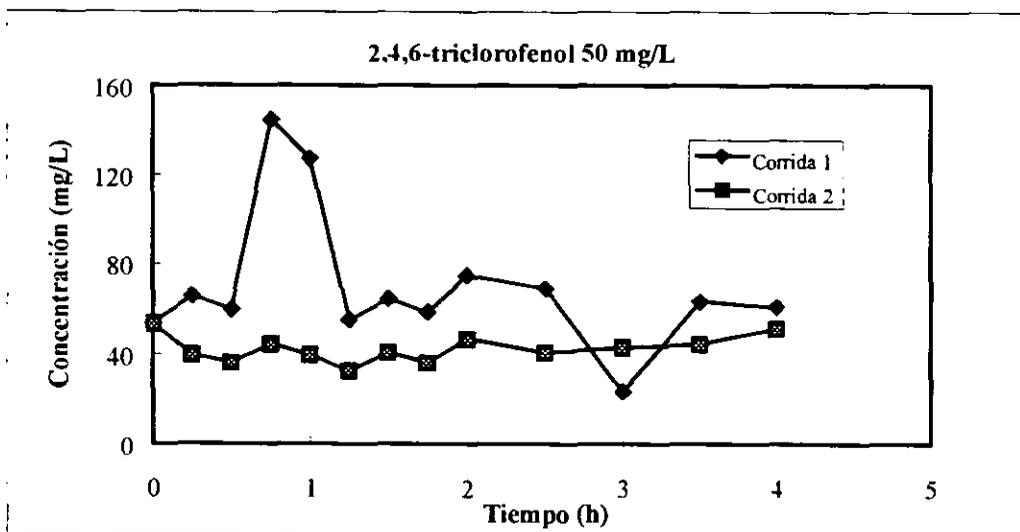
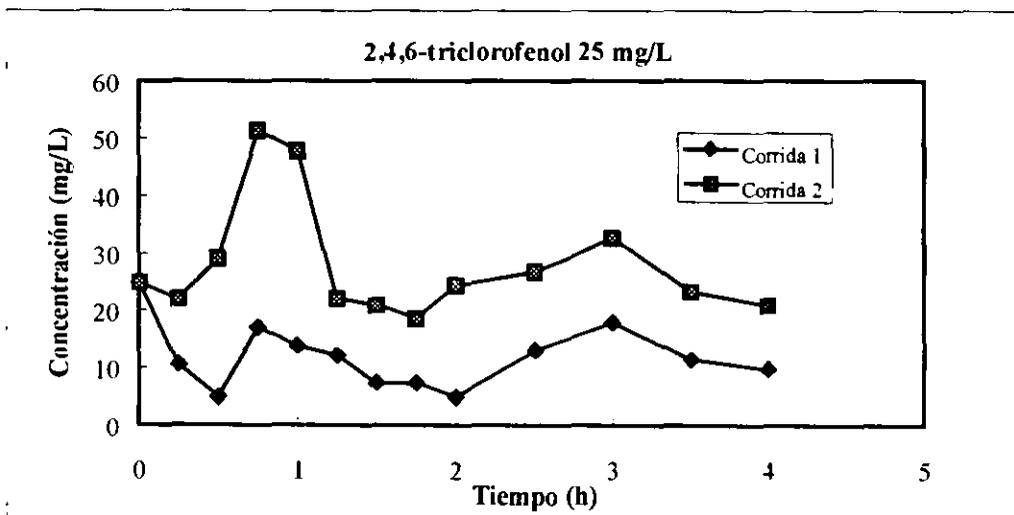


**2,4,6-triclorofenol 25 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	24.8	24.8
0.25	10.47	21.96
0.5	4.83	28.97
0.75	16.92	51.16
1	13.7	47.66
1.25	12.08	21.96
1.5	7.25	20.79
1.75	7.25	18.45
2	4.83	24.29
2.5	12.89	26.63
3	17.73	32.47
3.5	11.28	23.13
4	9.67	20.79

**2,4,6-triclorofenol 50 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	53.19	53.19
0.25	65.18	39.48
0.5	59.34	35.98
0.75	144.62	44.15
1	127.1	39.48
1.25	54.67	32.47
1.5	64.01	40.65
1.75	58.17	35.98
2	74.53	46.49
2.5	68.69	40.65
3	23.13	42.99
3.5	62.85	44.15
4	60.51	51.16

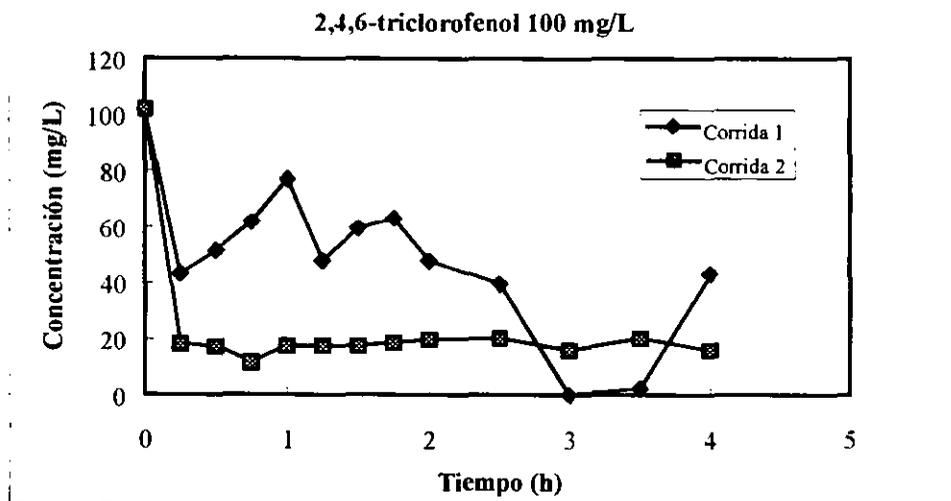
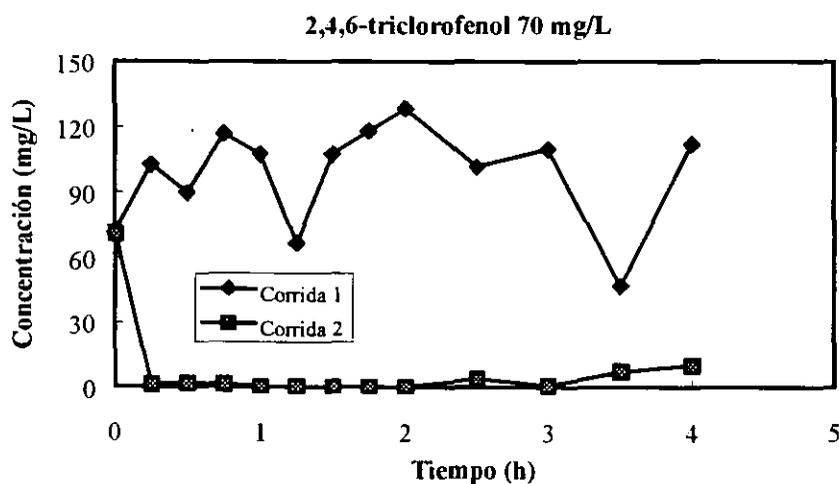


**2,4,6-triclorofenol 70 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	70.9	70.9
0.25	102.57	1.278
0.5	89.71	1.82
0.75	116.58	1.278
1	107.24	0
1.25	66.35	0.19
1.5	107.24	0
1.75	117.75	0
2	128.27	0
2.5	101.4	3.99
3	109.57	0.73
3.5	46.49	7.25
4	111.91	9.97

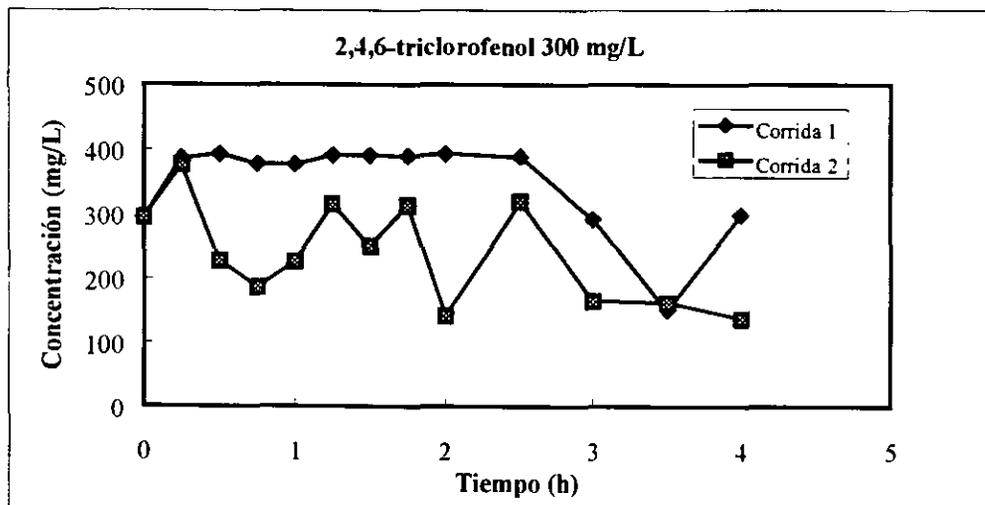
**2,4,6-triclorofenol 100 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	101.54	101.54
0.25	42.99	18.11
0.5	51.16	17.03
0.75	61.68	11.59
1	76.86	17.57
1.25	47.66	17.57
1.5	59.34	17.57
1.75	62.85	18.66
2	47.66	19.74
2.5	39.48	20.29
3	0	15.94
3.5	2.1	20.29
4	42.99	15.94



2,4,6-triclorofenol 300 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	293.35	293.35
0.25	386	375.22
0.5	392.6	226.37
0.75	377.39	186.11
1	376.3	225.28
1.25	390.43	314.37
1.5	390.43	249.18
1.75	389.34	312.2
2	392.6	141.62
2.5	388.25	318.72
3	291.56	165.52
3.5	150.31	162.26
4	298.08	137.28



# ***ANEXO F***

*Resultados de las pruebas con  
células inmovilizadas en reactor agitado*

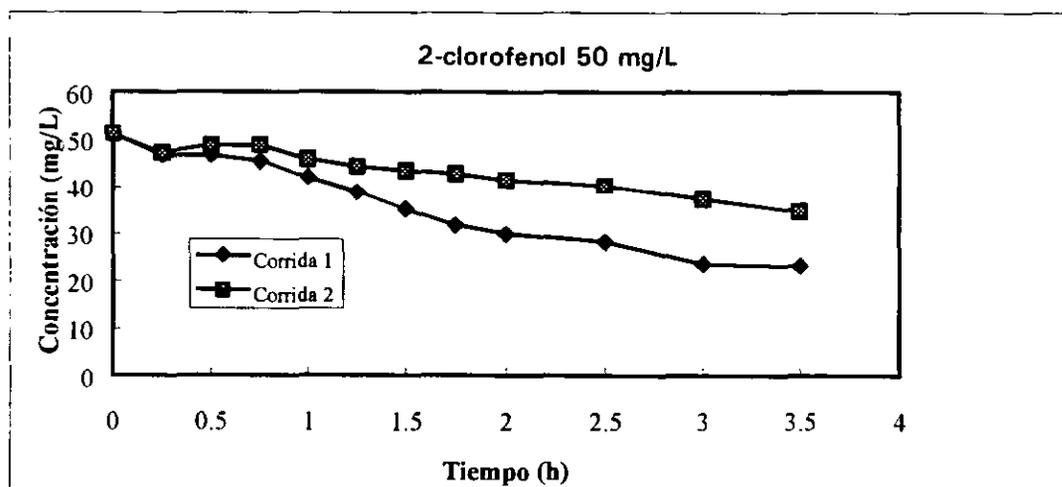
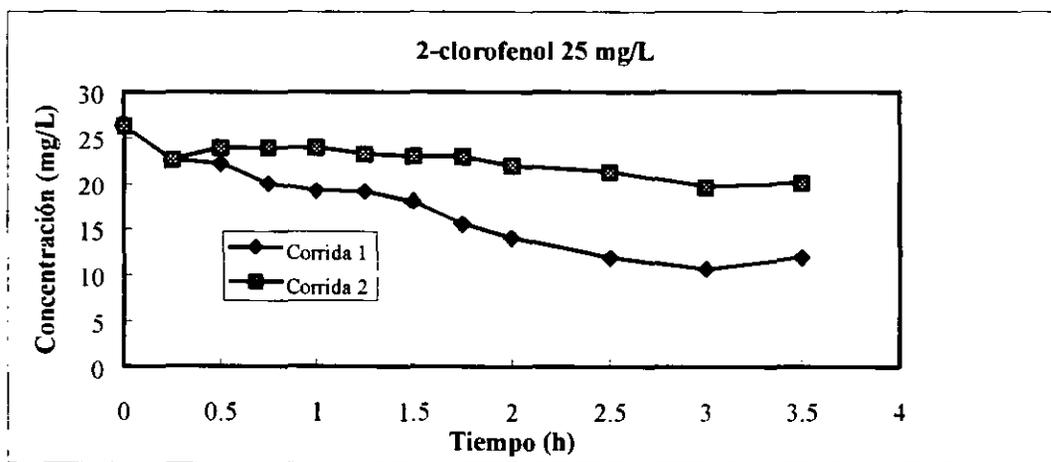
**ANEXO F**  
**Bacterias inmovilizadas en reactor agitado**

2-clorofenol 25 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	26.24	26.24
0.25	22.55	22.55
0.5	22.12	23.84
0.75	19.98	23.84
1	19.12	23.84
1.25	19.03	23.15
1.5	17.93	22.95
1.75	15.45	22.9
2	13.98	21.93
2.5	11.83	21.27
3	10.54	19.55
3.5	11.83	19.98

2-clorofenol 50 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	51.12	51.12
0.25	46.57	47
0.5	46.57	48.7
0.75	45.28	48.7
1	41.85	45.71
1.25	38.7	44.16
1.5	35.03	43.28
1.75	31.65	42.58
2	29.75	41.35
2.5	28.13	40.14
3	23.41	37.14
3.5	22.98	34.56



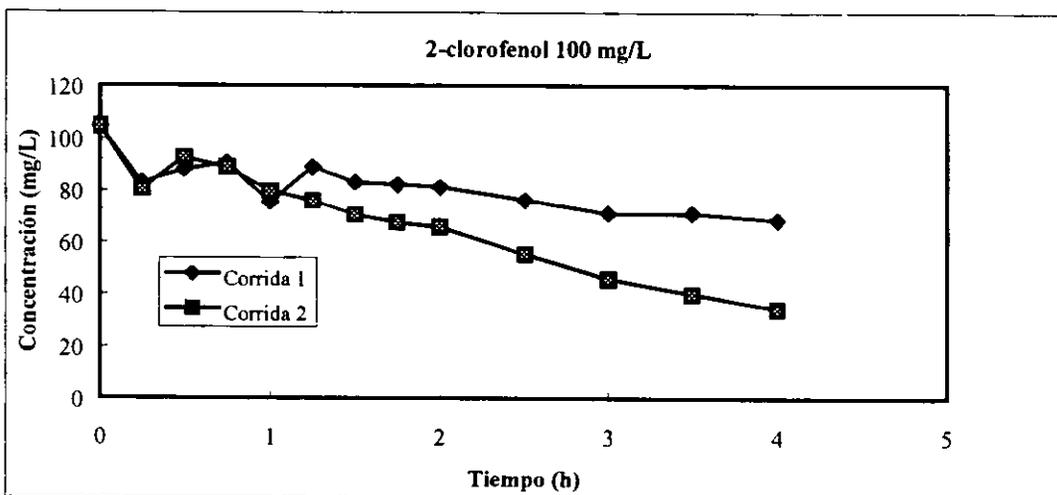
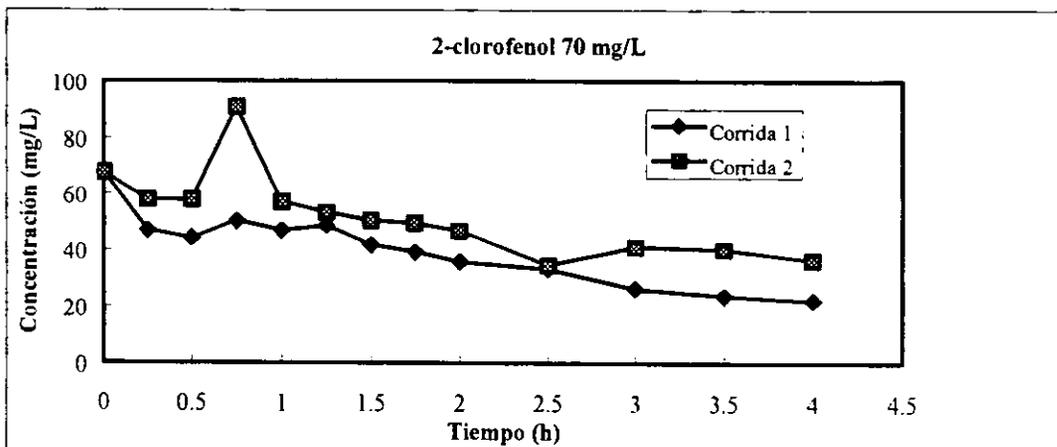
**ANEXO F**  
**Bacterias inmovilizadas en reactor agitado**

**2-clorofenol 70 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	67.4	67.4
0.25	46.83	57.85
0.5	44.25	57.85
0.75	50.26	90.72
1	46.83	56.92
1.25	48.54	53.16
1.5	41.68	50.34
1.75	39.11	49.4
2	35.68	46.59
2.5	33.1	34.38
3	26.24	40.95
3.5	23.67	40.01
4	21.95	36.26

**2-clorofenol 100 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	104.3	104.3
0.25	82.85	80.39
0.5	88	92.6
0.75	90.57	88.84
1	75.13	79.45
1.25	88.8	75.69
1.5	82.85	70.06
1.75	82	67.24
2	81.14	65.37
2.5	75.99	55.04
3	70.84	45.65
3.5	70.84	40.01
4	68.27	34.38



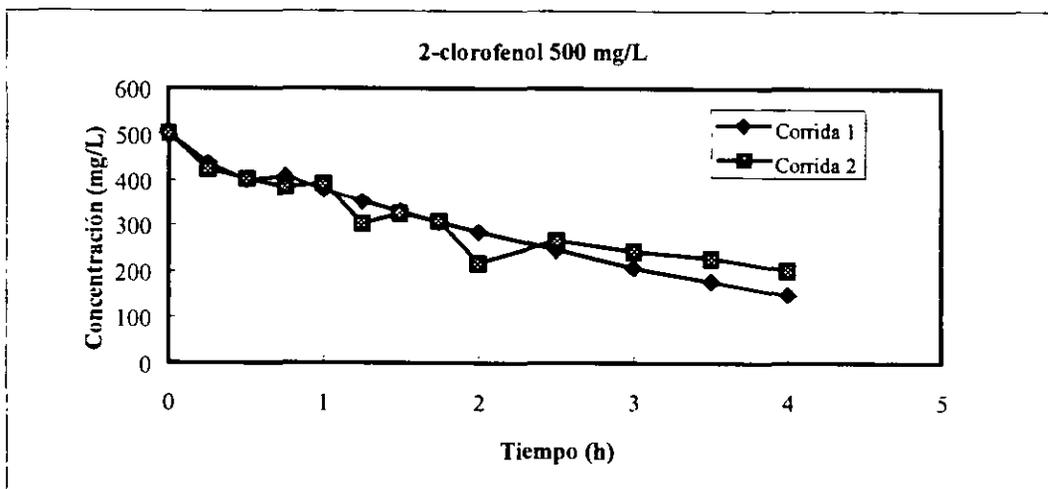
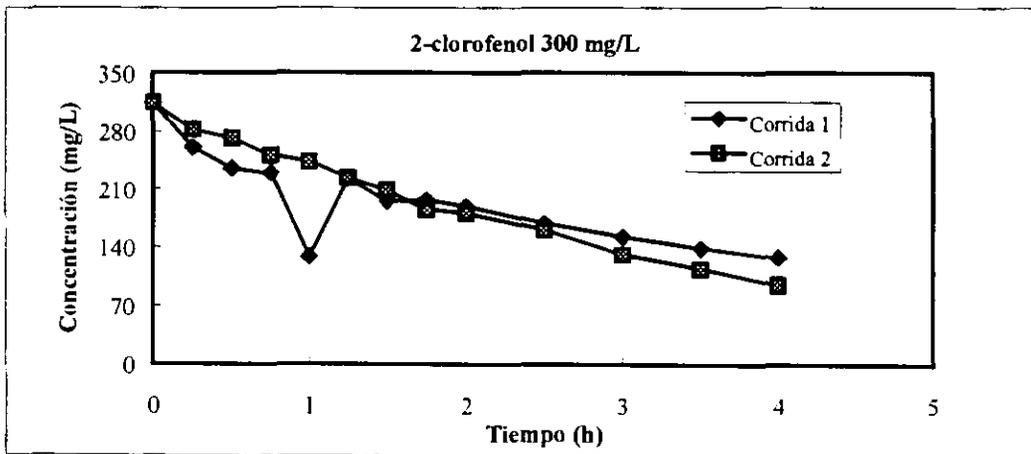
**ANEXO F**  
**Bacterias inmovilizadas en reactor agitado**

**2-clorofenol 300 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	313.6	313.6
0.25	260.41	281.33
0.5	234.68	271
0.75	229.53	250.34
1	127.46	242.83
1.25	221.81	223.11
1.5	194.36	207.97
1.75	196.08	184.61
2	188.36	179.92
2.5	167.77	160.2
3	151.48	130.15
3.5	137.75	113.25
4	126.6	94.47

**2-clorofenol 500 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	501.4	501.4
0.25	437.2	424
0.5	398.7	402.46
0.75	407.15	382.74
1	377.1	391.19
1.25	350.81	301.99
1.5	328.2	324.52
1.75	304.8	306.68
2	283.21	215.6
2.5	244.71	264.43
3	205.27	240.95
3.5	177.1	226.87
4	148	200.58



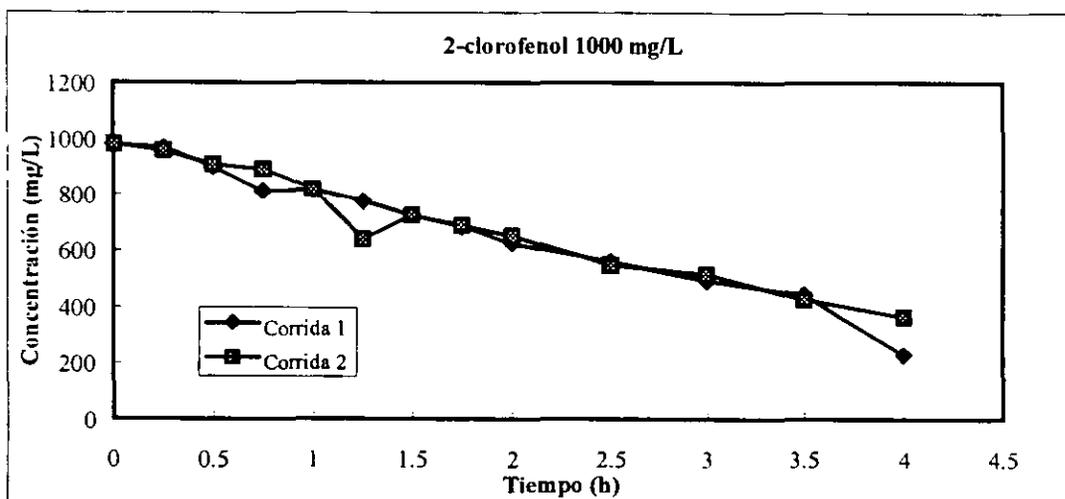
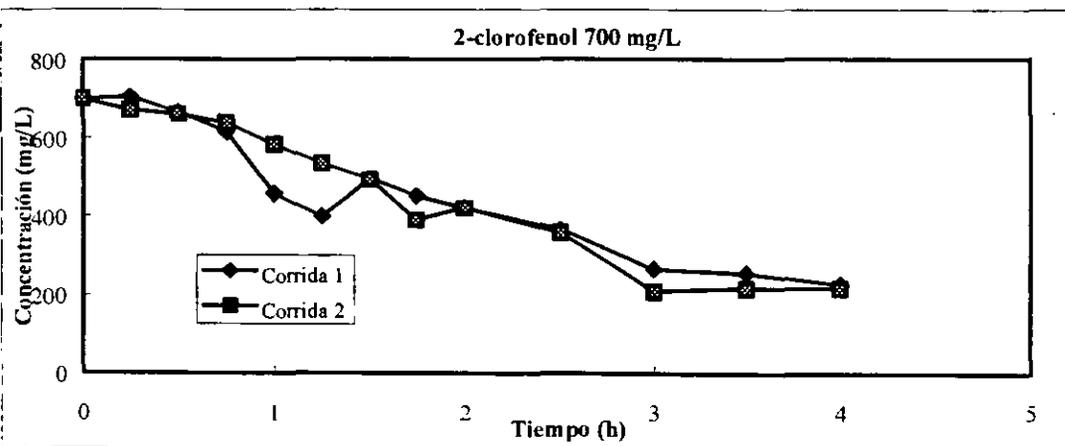
**ANEXO F**  
**Bacterias inmovilizadas en reactor agitado**

2-clorofenol 700 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	698.7	698.7
0.25	703.88	670.18
0.5	664.24	659.28
0.75	614.68	637.48
1	457.1	581.98
1.25	397.64	533.41
1.5	493.77	492.78
1.75	450.16	388.72
2	418.45	419.44
2.5	363.94	357
3	262.85	207.35
3.5	252.94	215.28
4	223.21	216.27

2-clorofenol 1000 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	976.6	976.6
0.25	965.52	955.61
0.5	896.15	906.16
0.75	810.92	888.22
1	814.88	816.86
1.25	773.25	637.48
1.5	721.72	721.72
1.75	682.08	686.04
2	622.61	648.38
2.5	557.2	544.32
3	491.79	513.59
3.5	442.23	426.38
4	228.16	365.92

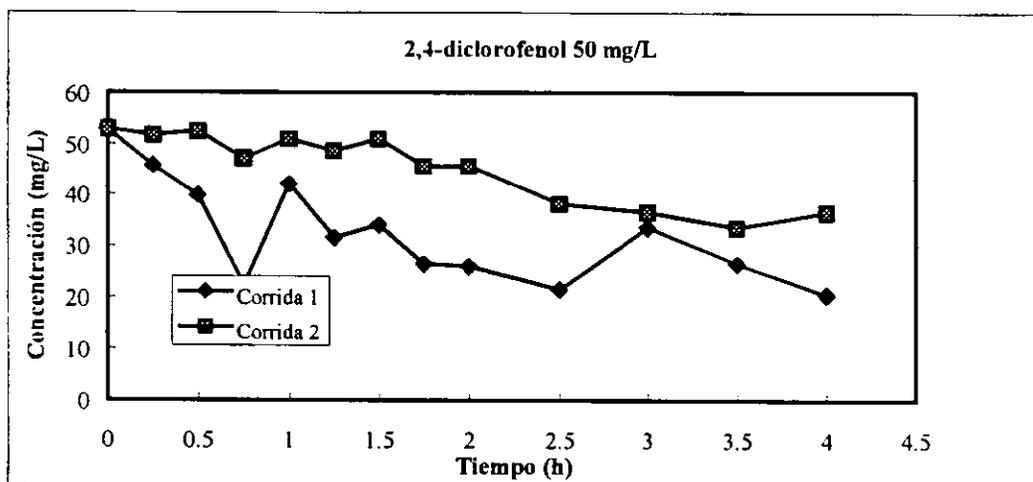
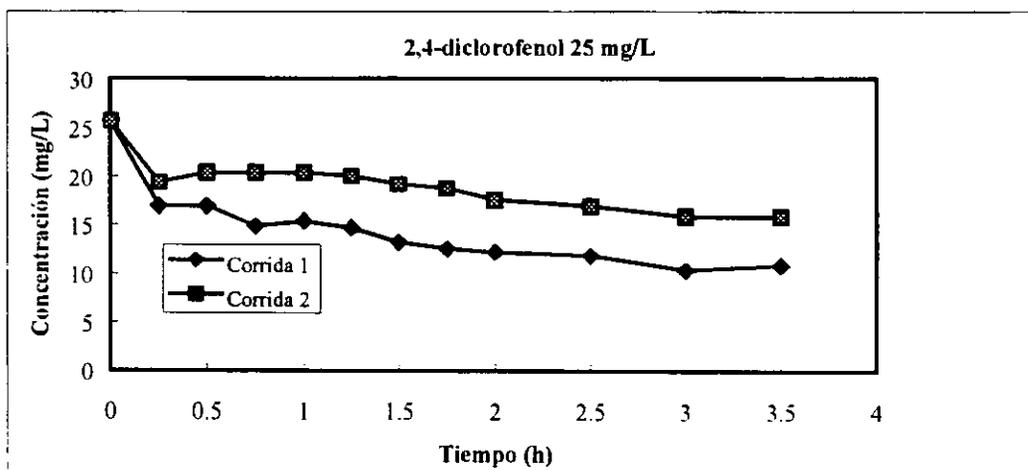


**2,4-diclorofenol 25 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	25.6	25.6
0.25	16.82	19.33
0.5	16.82	20.34
0.75	14.81	20.34
1	15.31	20.34
1.25	14.65	19.98
1.5	13.16	19.13
1.75	12.5	18.7
2	12.16	17.45
2.5	11.79	16.82
3	10.29	15.82
3.5	10.79	15.82

**2,4-diclorofenol 50 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	52.75	52.75
0.25	45.6	51.59
0.5	39.68	52.35
0.75	22.35	47.05
1	41.95	50.84
1.25	31.4	48.56
1.5	33.91	50.84
1.75	26.37	45.53
2	25.87	45.53
2.5	21.34	37.95
3	33.41	36.44
3.5	26.37	33.41
4	20.34	36.44

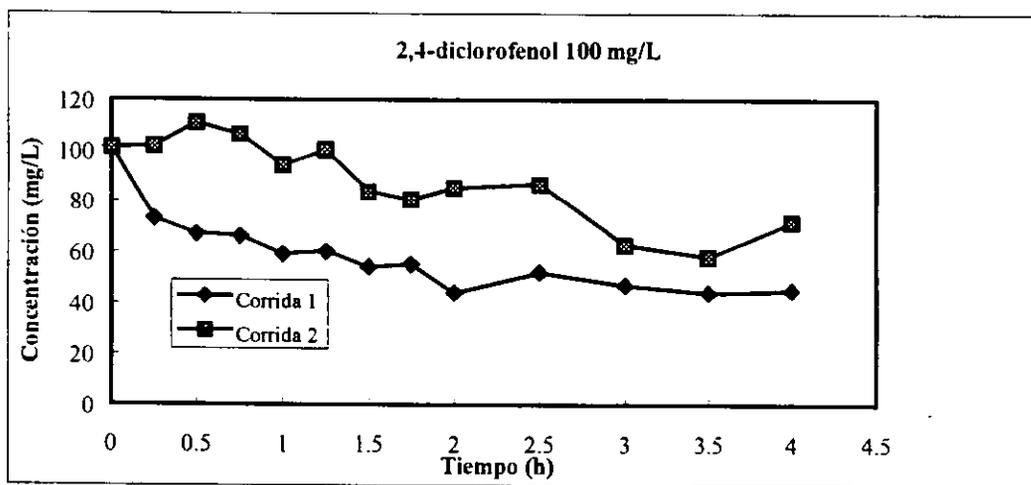
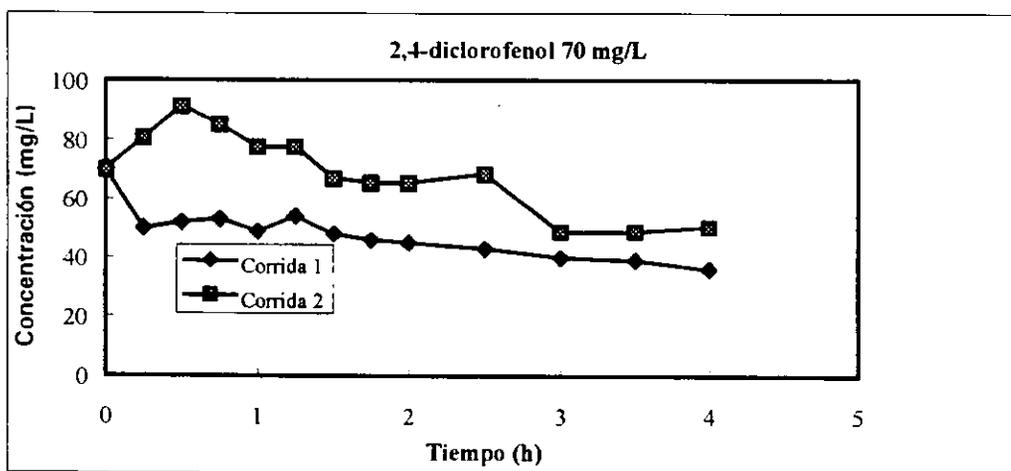


**2,4-diclorofenol 70 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	69.84	69.84
0.25	49.73	80.46
0.5	51.74	91.07
0.75	52.75	85.01
1	48.73	77.43
1.25	53.75	77.43
1.5	47.72	66.82
1.75	45.71	65.31
2	44.7	65.31
2.5	42.69	68.34
3	39.68	48.63
3.5	38.67	48.63
4	35.66	50.15

**2,4-diclorofenol 100 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	101	101
0.25	72.85	101.68
0.5	66.82	110.77
0.75	65.81	106.22
1	58.78	94.1
1.25	59.78	100.16
1.5	53.75	83.49
1.75	54.76	80.46
2	43.7	85.01
2.5	51.74	86.52
3	46.71	62.27
3.5	43.7	57.73
4	44.7	71.37



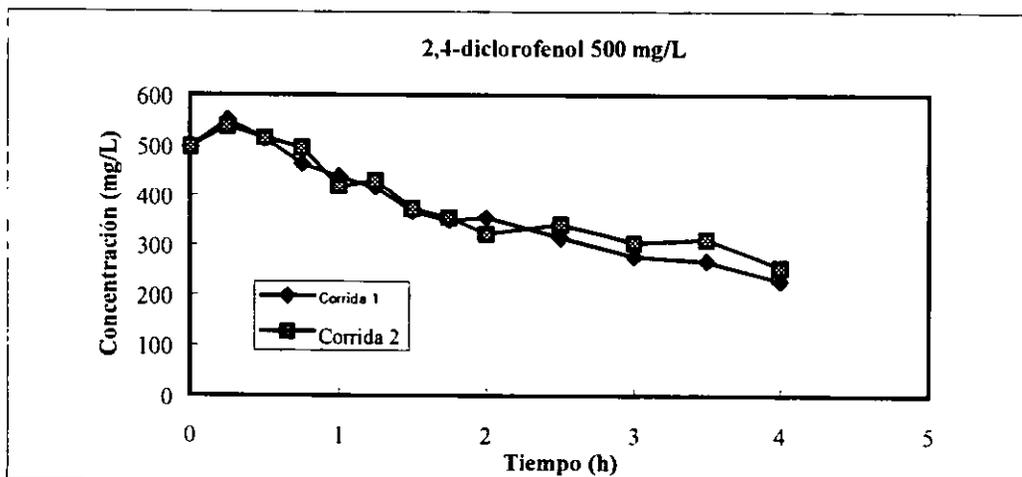
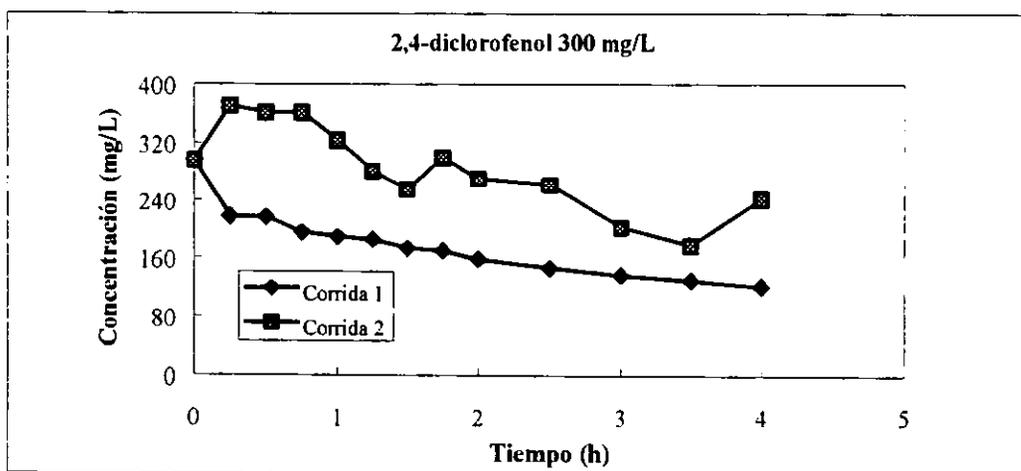
**ANEXO F**  
**Bacterias inmovilizadas en reactor agitado**

**2,4-diclorofenol 300 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	295.01	295.01
0.25	216.6	369.92
0.5	215.6	360.83
0.75	194.49	360.83
1	188.45	322.94
1.25	184.43	280.51
1.5	172.37	254.74
1.75	168.35	298.69
2	157.29	269.9
2.5	145.23	260.8
3	135.18	201.7
3.5	128.14	175.94
4	120.1	241.1

**2,4-diclorofenol 500 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	497	497
0.25	548.75	536.62
0.5	513.89	515.41
0.75	462.37	495.71
1	438.12	416.9
1.25	415.38	429.02
1.5	366.89	372.95
1.75	348.7	354.77
2	354.77	321.42
2.5	313.85	341.13
3	275.96	303.24
3.5	266.87	310.82
4	227.46	254.74



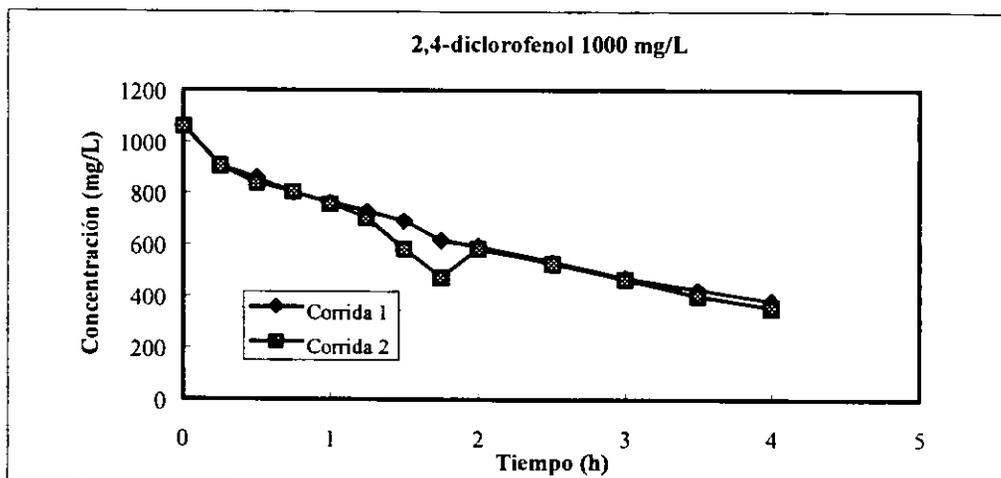
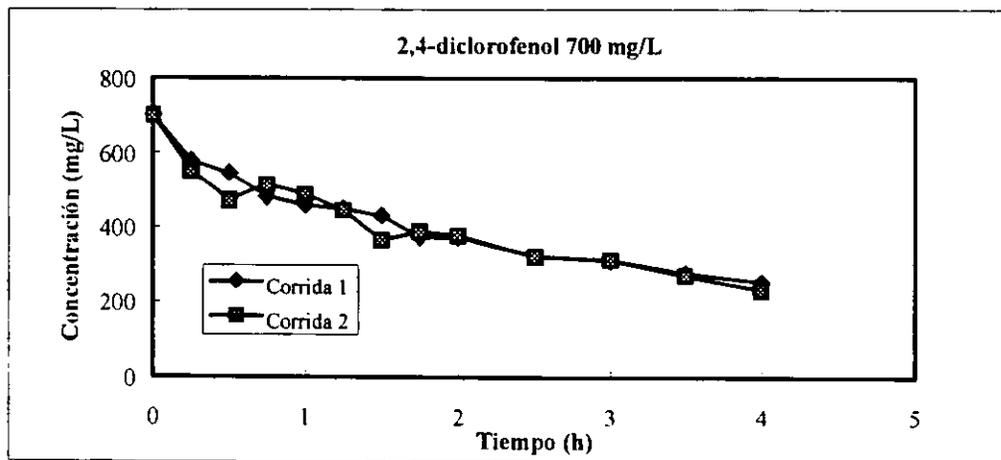
**ANEXO F**  
**Bacterias inmovilizadas en reactor agitado**

**2,4-diclorofenol 700 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	701.1	701.1
0.25	576.67	550.17
0.5	544.65	470.66
0.75	478.39	512.63
1	456.31	486.12
1.25	447.48	444.16
1.5	428.7	363.55
1.75	371.28	385.64
2	371.28	375.7
2.5	320.49	318.28
3	308.34	310.55
3.5	275.21	268.59
4	252.02	229.94

**2,4-diclorofenol 1000 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	1059	1059
0.25	907.94	905.73
0.5	861.57	837.27
0.75	797.52	801.94
1	759.98	754.45
1.25	724.64	698.14
1.5	688.2	582.19
1.75	615.32	469.56
2	591.03	581.09
2.5	529.19	523.67
3	466.25	464.04
3.5	420.97	397.78
4	377.91	352.51



## ANEXO F

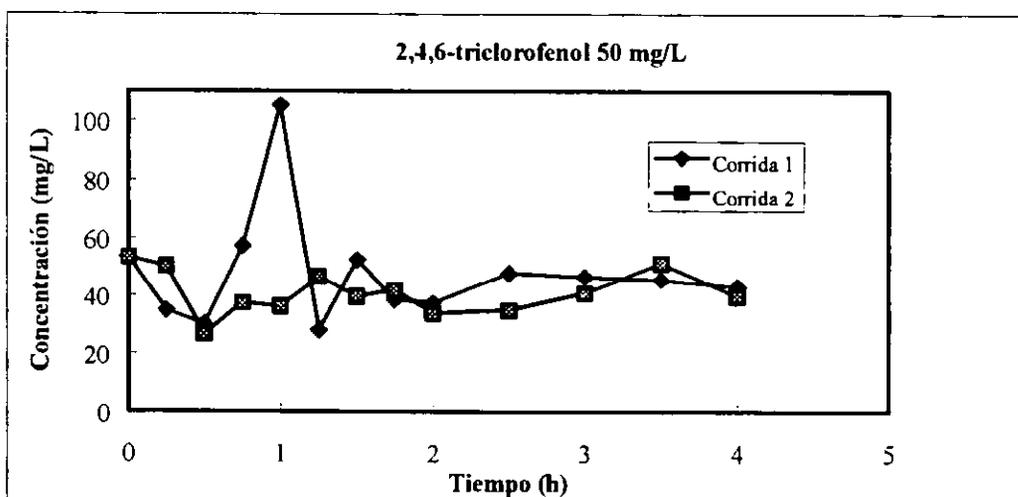
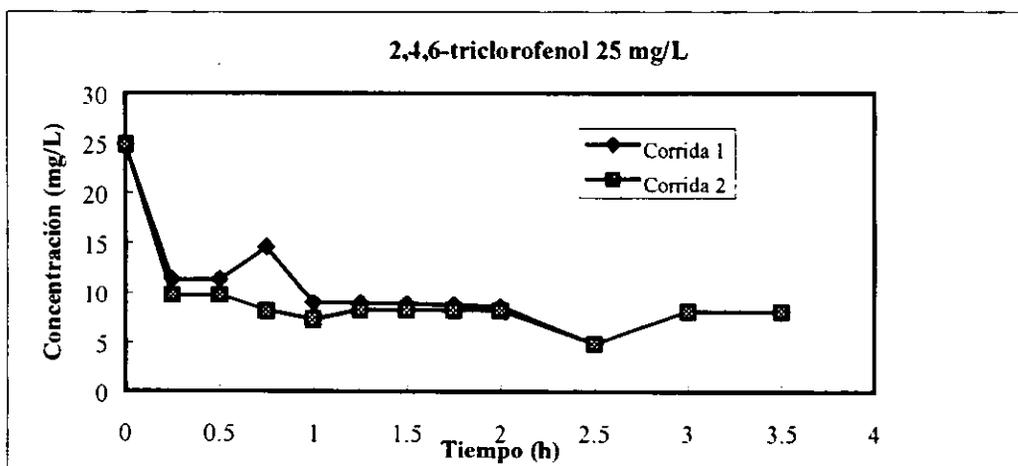
### Bacterias inmovilizadas en reactor agitado

2,4,6-triclorofenol 25 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	24.8	24.8
0.25	11.28	9.67
0.5	11.28	9.67
0.75	14.5	8.05
1	8.86	7.25
1.25	8.83	8.18
1.5	8.78	8.15
1.75	8.63	8.15
2	8.5	8.1
2.5	4.83	4.83
3	8.05	8.05
3.5	8.05	8.05

2,4,6-triclorofenol 50 mg/l

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	53.19	53.19
0.25	34.57	50
0.5	29.9	26.63
0.75	57	37.14
1	104.9	35.98
1.25	27.8	46.49
1.5	52.33	39.48
1.75	38.31	41.82
2	37.14	33.64
2.5	47.66	34.81
3	46.49	40.65
3.5	45.32	51.16
4	42.99	39.48



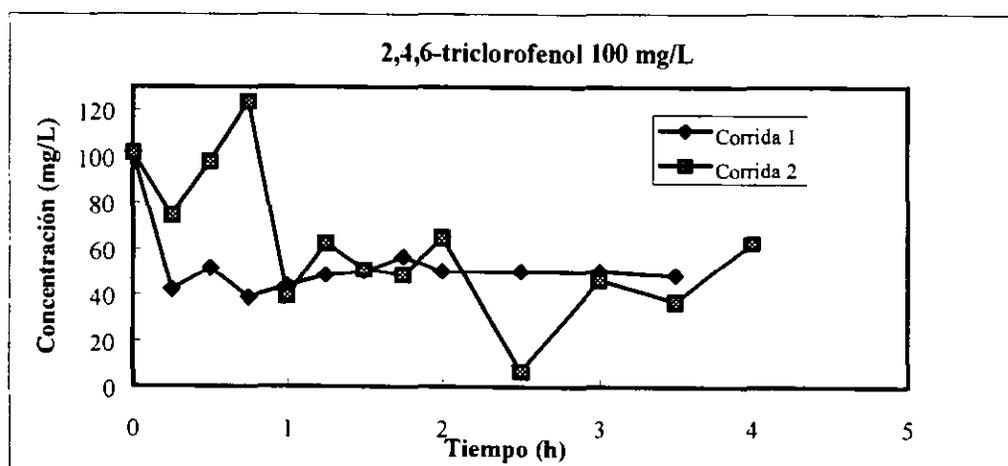
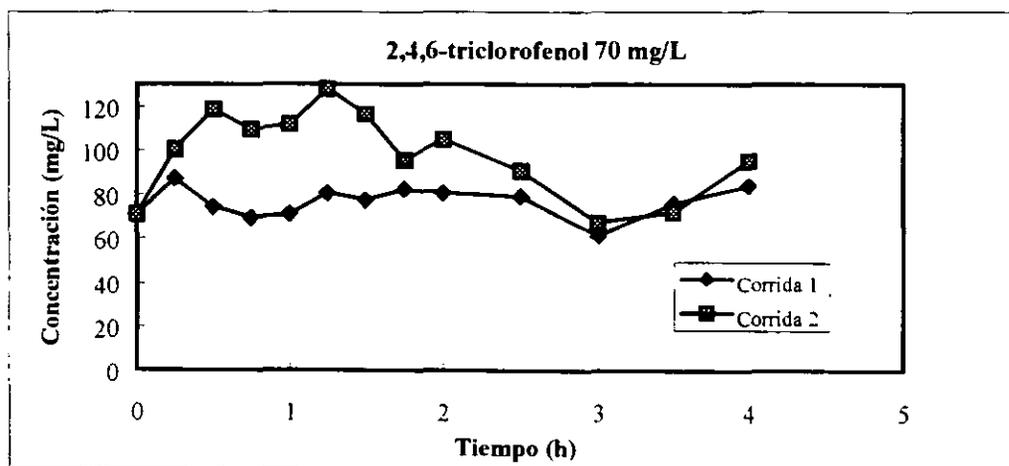
**ANEXO F**  
**Bacterias inmovilizadas en reactor agitado**

**2,4,6-triclorofenol 70 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	70.9	70.9
0.25	87.04	100
0.5	74.14	118.69
0.75	69.31	109.34
1	70.92	111.68
1.25	80.59	128.03
1.5	77.36	116.35
1.75	82.2	95.32
2	80.59	104.67
2.5	78.98	90.65
3	61.25	67.28
3.5	75.75	71.96
4	83.81	95.32

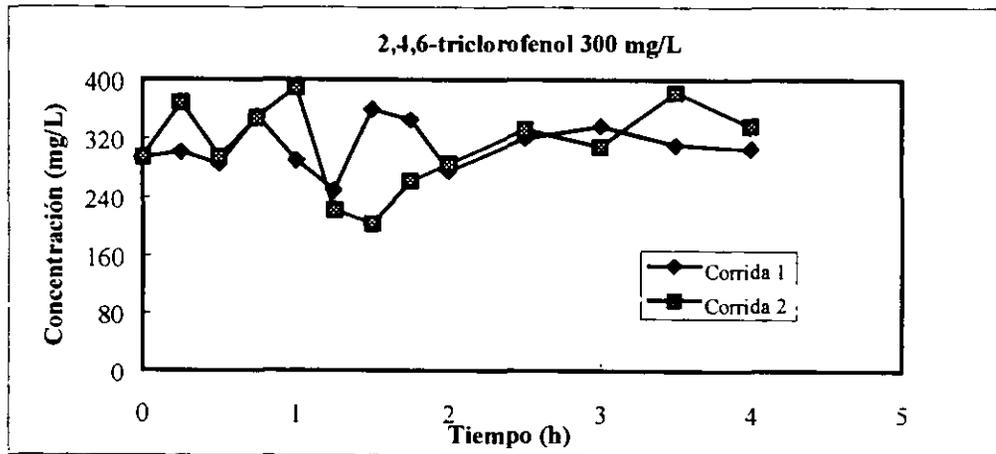
**2,4,6-triclorofenol 100 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	101.54	101.54
0.25	41.9	74.29
0.5	51.57	97.66
0.75	38.68	123.36
1	43.52	39.25
1.25	48.35	62.61
1.5	49.96	50.93
1.75	56.41	48.59
2	49.96	64.95
2.5	49.96	6.54
3	49.96	46.26
3.5	48.35	36.91
4		62.61



**2,4,6-triclorofenol 300 mg/l**

Tiempo (h)	Corrida 1	Corrida 2
0	293.35	293.35
0.25	300.93	368.69
0.5	284.57	293.92
0.75	350	347.66
1	289.25	389.71
1.25	249.53	221.49
1.5	359.34	202.8
1.75	345.32	261.21
2	275.23	284.57
2.5	319.62	331.3
3	335.98	307.94
3.5	310.28	382.71
4	305.6	335.98



# **ANEXO G**

*Publicación relacionada con el proyecto*

# Production and characterization of a Ca-alginate biocatalyst for removal of phenol and chlorophenols from wastewaters

Luis G. Torres\*, Alicia Sánchez-de-la-Vega, Norma A. Beltrán and Blanca E. Jiménez

Instituto de Ingeniería, Coordinación de Ingeniería Ambiental, Grupo Tratamiento y Reúso, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-472, Coyoacán 04510, México D.F. México

(Received 28 August 1997; revised version received 23 January 1998; accepted 1 February 1998)

## Abstract

The production of a Ca-alginate/*Pseudomonas fluorescens* biocatalyst, for the removal of phenol, chlorophenol, dichlorophenol, and trichlorophenol from wastewaters was studied. Rheological characterization (before and after heat treatment) of the Na-alginate solution was carried out. The effect of some operational parameters of production including air pressure, alginate solution concentration, feed rate, and alginate/cells ratio, on the size and quality of the spheres was evaluated. In addition, a study of the biocatalyst including the quantity of cells entrapped into the alginate spheres, the apparent and real catalyst densities, the humidity and the  $\epsilon$  void fraction was carried out together with a kinetic characterization of the Ca-alginate spheres through a first order expression. Finally, an assessment of the catalyst in the biodegradation of phenol, mono-, di-, and trichlorophenol at medium-high concentrations (1000, 500, 400 and 100 mg l<sup>-1</sup>) is presented and discussed. © 1998 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

**Keywords:** Calcium alginate, Chlorophenols, Immobilized cells, Phenol, Wastewater treatment.

## Introduction

Phenol and chlorophenols are toxic compounds very often found in industrial effluents such as those generated by the pulp and paper, timber products, plastics and synthetic polymers, pharmaceutical products, pesticides, oil and petrochemistry and textile industries. Microbial enzymes are a potentially effective means of degrading pollutants, and immobilized cells have advantages over the use of freely suspended cells [1], such as the capability of re-use, and the ease with which the cells can be separated from the reaction mixture.

Other advantages include the possibility of the minimization of the diffusional restrictions on the rates of reaction, the minimization of product inhibition (especially for packed columns) and the possibility of fully continuous processes. There are many inert sup-

ports or polymeric matrices in which to immobilize cells and all present both desirable and undesirable features, in aspects such as strength, cost, affinity with the substrates, ease of handling, and the capability of entrapment/adsorption of cells [2–5]. With respect to the option of entrapping cells into a polymeric matrix, some polymers have been more frequently reported, such as k-carrageenin, DEAE, polyhydracide, alginate, agar, and bone char [1].

The aim of this work is to provide information concerning the production of a Ca-alginate/*Pseudomonas fluorescens* biocatalyst for the removal of phenol, chlorophenol, dichlorophenol, and trichlorophenol from wastewaters. Tests such as the rheological characterization of the Na-alginate solutions (before and after heat treatment) were carried out. The effect of some of the production operational parameters (i.e. air pressure, alginate solution concentration, feed rate, and alginate/cells ratio, among others) on the size and quality of the spheres was also evaluated. In addition, a

\*Corresponding author. E-mail: lth@pumas.iingen.unam.mx

characterization comprising the quantity of cells (as FCU  $g_{\text{support}}^{-1}$ ) entrapped into the alginate spheres, the apparent and real catalyst densities, the humidity, and the void fraction of the biocatalyst was developed. Finally, a kinetic characterization of the Ca-alginate spheres through a first order expression, as well as the assessment of the catalyst in the biodegradation of phenol (Ph), mono (2CPh), di- (2,4DCPh), and trichlorophenol (2,4,6TCPPh) at high concentrations (1000, 500, 400 and  $100 \text{ mg l}^{-1}$ ) is presented and discussed.

## Materials and methods

### Strain, cultural conditions and harvesting procedure

A *Pseudomonas fluorescens* strain obtained from sea sediments was employed in this work. This strain showed interesting capabilities in the degradation of chloro-, nitro-, and methylphenols, as well as phenyl acetic and 2,4 dichlorophenoxyacetic acids [6]. Details concerning the general characteristics, cultural conditions, and biodegradation capabilities of the bacteria have been discussed previously [6]. Cells were harvested after growing in YPG medium (yeast extract, peptone of caseine and glucose), using a mini-centrifuge (Eppendorf 5415C, USA) at 11000 rpm (9880 relative centrifugal force RCF) for 20 min. The cells were rinsed with phosphate buffer (pH 7) and centrifuged again.

### Na-alginate solutions preparation and characterization

Alginate solutions (Burmester Pharmatrade, Hamburg, Germany) were prepared in concentrations between 0.5 and 4%. Alginate powder was added to deionized water and mixed thoroughly (700 rpm) until the suspension became homogeneous. Some of the suspensions contained 0.067% *Pseudomonas fluorescens* with different proportions of Na-alginate. Some suspensions were characterized before and after a heat treatment (consisting of 10 min at  $100^\circ\text{C}$  in an autoclave) by means of a Brookfield DV-1 viscometer (spindles 1 and 4). The rheological indices  $K$  and  $n$  were statistically evaluated from the Brookfield raw data according to the procedure detailed by Hannote *et al.* [7].

### Biocatalyst production

The production of the Ca-alginate spheres and the Ca-alginate/cell spheres was as follows: a solution or mixture was extruded through a needle placed into a concentric cylinder, fed with filter air (at different pressures) in order to control the particle diameter (see Fig. 1). The drops extruded were received in a flask containing 0.1 M calcium chloride solution and cured for 1 h. The parameters controlled during the process were the air pressure (in  $\text{kg cm}^{-2}$ ), the alginate feed

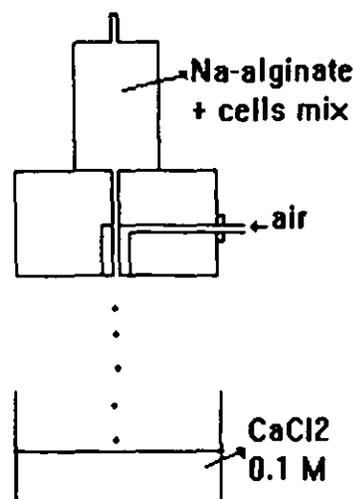


Fig. 1. System for the production of Ca-alginate spheres.

rate (in  $\text{ml min}^{-1}$ ), and the height between the end of the pipe and the surface of the calcium chloride solution (in cm).

The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  consumed in the alginate gelation process (with and without cells entrapped), was determined by means of the measurement of the initial and final Ca concentration in the gelation process according to Standard Methods [8]. In addition, the  $g_{\text{spheres}} g_{\text{alginate}}^{-1}$  and  $g_{\text{spheres}} l_{\text{alginate solution}}^{-1}$  yields were calculated owing to their importance in the economics of biocatalyst production.

### Physical and kinetic characterization of the biocatalyst

The size distribution of the spheres produced was evaluated in two ways. 30–50 spheres were manually measured by means of a vernier, the measurements were averaged and the standard deviation calculated. As an alternative, the spheres were sieved through a sequence of stainless steel meshes (10, 12, 16, 18, 20 and 30, corresponding to 1.68, 1.41, 1.13, 0.96, 0.8, and 0.59 mm, respectively). No significant differences were found between the results of the two methods, and the most frequent diameter is reported, unless otherwise indicated. The sphericity of the biocatalyst was evaluated by measuring the major and minor diameters of the particles (i.e.  $D_A$  and  $D_B$ ) in order to determine sphericity =  $D_A D_B^{-1}$ . The apparent density was evaluated by putting a number of spheres in a 50 ml glass cylinder, and the real density by a water displacement method (using diluted Dapaah medium). Humidity was evaluated in duplicate using a thermobalance (Ohaus, USA). The void fraction was evaluated using the method reported by Buchholz [9], consisting of dehydration of the biocatalyst until the critical humidity (from a humidity versus water loss rate plot, the point between b and c zones, Fig. 4) followed by a reconsti-

tution of the particle in a 0.1 M calcium chloride solution.

The colony forming units per gram of support, CFU  $\text{g}_{\text{support}}^{-1}$  were measured as detailed in Torres *et al.* [6]. A quantity of spheres was weighted, mashed and dissolved in a  $2 \text{ g l}^{-1}$  EDTA, and  $20 \text{ g l}^{-1}$  NaCl solution. When the catalyst was completely dissolved, the solution was diluted and the procedure was continued.

10 g of biocatalyst (previously put on a paper in order to avoid excessive water) were placed in a 500 ml Erlenmeyer flasks, with 150 ml of Dapaah medium [10] diluted 1/10, along with the corresponding concentration of 2CPh, 2.4DCPh or 2.4.6TCPPh. The flasks were agitated at 200 rpm, with temperature controlled at 35°C. The flasks were aerated by means of an air pump with air flow of  $1.9 \pm 0.72 \text{ l min}^{-1}$ . Runs without aeration were done in order to avoid the effect of the desorption process. Samples (100  $\mu\text{l}$ ) were taken every 15 min for 2 h, and every 30 min during the next 2 h. The samples were analysed for specific phenols according to the Standard Methods [8], using a calibration curve for each chlorophenol. Data were fitted to an expression in the form:

$$C = C_0 \exp(-kt) \quad (1)$$

where  $C$  and  $C_0$  are the phenol concentrations (in  $\text{mg l}^{-1}$ ) at any given time and zero time,  $k$  is the kinetic parameter (in  $\text{h}^{-1}$ ) and  $t$  the process time (hours),  $r$  is the correlation factor which indicates the suitability of the fitting process.

#### Assessment of biodegradation capability

A 0.027 ml glass column, similar to that used in a previous work [5] was employed in order to assess the biodegradation capability of the biocatalyst. Approximately 22.5 g of biocatalyst was placed in the column. Temperature was fixed by means of water recirculation through the external jacket. All experiments were carried out as batch processes. 100 ml of each chlorophenol in Dapaah diluted medium were circulated through the column for a time which was long enough to achieve a chlorophenol removal value of around 95%, which was measured using the 4-aminoantipirine method [8]. For other details see Ref. [5].

## Results and discussion

### Alginate solutions and mixtures characterization

Raw data from the Brookfield viscometer measurements were processed as detailed by Hannote *et al.* [7] in order to calculate statistically the flow index,  $n$ , and the consistency index,  $K$ , from the power law:

$$\mu = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad (2)$$

where  $\mu$  is the apparent viscosity in mPa,  $K$  is the consistency index in  $\text{N s}^n \text{ m}^{-2}$ ,  $\dot{\gamma}$  is the shear rate in  $\text{s}^{-1}$ , and  $n$  is the index flow (dimensionless). The values of  $n$  and  $K$ , as well as the correlation coefficients ( $r$ ) for the different Na-alginate solutions before and after heat treatment (without cells) are shown at Table 1. For repeatability purposes, the number of the spindle used is reported in the same table.

In the case of the solutions before heat treatment, all the fluids showed a pseudoplastic or rheofluidizing behaviour ( $n < 1$ ) in the range of 0.67–0.95  $n$  values. With respect to the consistency index,  $K$ , there exists a clear relationship between the Na-alginate concentration and the  $K$  value (which had values between 0.04 and  $16.9 \text{ N s}^n \text{ m}^{-2}$ ). It is worth noting that  $r$  values were always greater or equal to 0.94, which confirms the suitability of the power law equation in modelling the experimental data. In terms of viscosities, the solutions had values from 31 to 13619 cp (since it is a non-Newtonian fluid, an apparent viscosity can be defined for every shear rate value, in this case for a shear rate of 30 rpm).

After heat treatment, the solutions undergo important changes. The sterilization process caused a drastic decrease in the solution's viscosity [1]. The Na-alginate solutions were in general more pseudoplastic ( $0.73 \leq n \leq 0.9$ ) and less viscous. The consistency indexes were in the range  $0.02$ – $2.75 \text{ N s}^n \text{ m}^{-2}$  (the higher the polymer concentration, the higher the  $K$  value) and the viscosities between 12 and 1724 cp (for a shear rate of 30 rpm). This means a reduction between 50 and 600%. Again, the  $r$  values were quite high (0.94–0.99), indicative of a good applicability of the power law.

This reduction in viscosity due to the sterilization

Table 1. Rheological characterization of the Na-alginate solutions without cells, before and after heat treatment

Na-alginate (%)	Before heat treatment					After heat treatment				
	Spindle number	$n$ (-)	$K$ ( $\text{N s}^n \text{ m}^{-2}$ )	$\mu$ (cp)	$r$ (-)	Spindle number	$n$ (-)	$K$ ( $\text{N s}^n \text{ m}^{-2}$ )	$\mu$ (cp)	$r$ (-)
4	4	0.88	16.99	13619	0.99	4	0.77	2.75	1724	0.97
3	4	0.86	6.65	5131	0.99	4	0.73	1.15	644	0.94
2	4	0.67	1.31	633	0.94	1	0.90	0.26	149.7	0.99
1	1	0.95	0.19	175.3	0.99	1	0.84	0.06	49.0	0.99
0.5	1	0.83	0.04	31.7	0.98	1	0.75	0.02	12.2	0.97

process could be beneficial to process economy, since lower viscosities mean lower pump sizes and the avoidance of some tubing and fitting problems if, and only if no gelling problems (i.e. weak gels, long gelation times) are encountered.

0.067% *Pseudomonas fluorescens* solutions were mixed with 1–4% Na-alginate, and the rheological characteristics were evaluated. The alginate/cells ratio varied between 15 and 60 (Table 2). These solutions showed pseudoplastic behaviour ( $0.7 \leq n \leq 0.96$ ), but had different values when compared with solutions with an equal polymer concentration (lower  $n$  values as a general rule). The  $K$  values were always higher for the mixtures in comparison with those found for the Na-alginate solutions, but the more relevant differences were for the 2 and 3% alginate solutions. The  $r$  values were excellent (0.97–0.99), better than those reported for the solutions at equal Na-alginate concentrations.

A rheogram shear rate–viscosity for the alginate/cells mixtures is shown in Fig. 2 in which solid lines correspond to the power law equation. As shown, good

agreement between data and the theoretical expression was found. The viscosities of the alginate/cells mixtures with ratios 60 and 45 were quite similar (specially at low shear rates), not significantly different in statistical terms, while the viscosities for the mixtures with ratios 30 and 15 were clearly different.

#### Production of the biocatalyst

Different biocatalyst batches were produced using different operational parameters: air pressures, alginate concentrations, feed rates and height from the curing solution surface to the end of the tube where the spherical alginate particles were extruded. Different size distributions were obtained when the operational parameters were controlled at different values. As an example, in Fig. 3 the percentage of material retained in every mesh (from 0.42 to 2.38 mm) for alginate concentrations of 1–4% are displayed. For every polymer concentration, a typical size distribution was observed, i.e. the more frequent sizes were 1.41, 1.13, 0.96, and 0.59 mm for the 4, 3, 2, and 1% of Na-alginate. These

Table 2. Rheological characterization of Na-alginate/*Pseudomonas fluorescens* mixtures

Na-alginate (%)	Spindle number	Alginate/cells ratio	$n$ (-)	$K$ ( $N s^r m^{-2}$ )	$r$ (-)
4	4	60	0.84	18.22	0.99
3	4	45	0.76	17.00	0.99
2	4	30	0.70	4.02	0.97
1	1	15	0.96	0.34	0.99

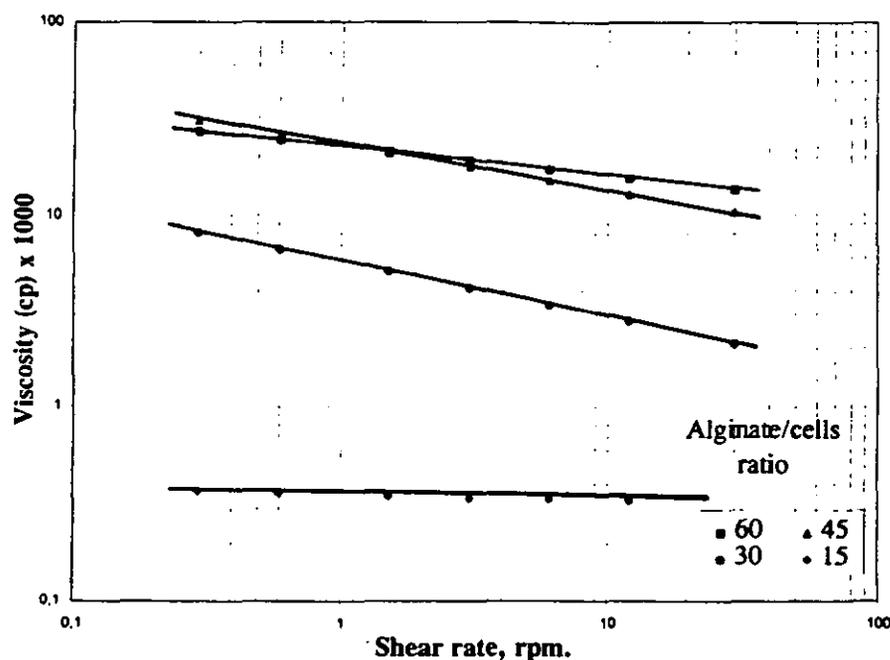


Fig. 2. Shear rate vs. viscosity rheogram for different alginate/cells ratios.

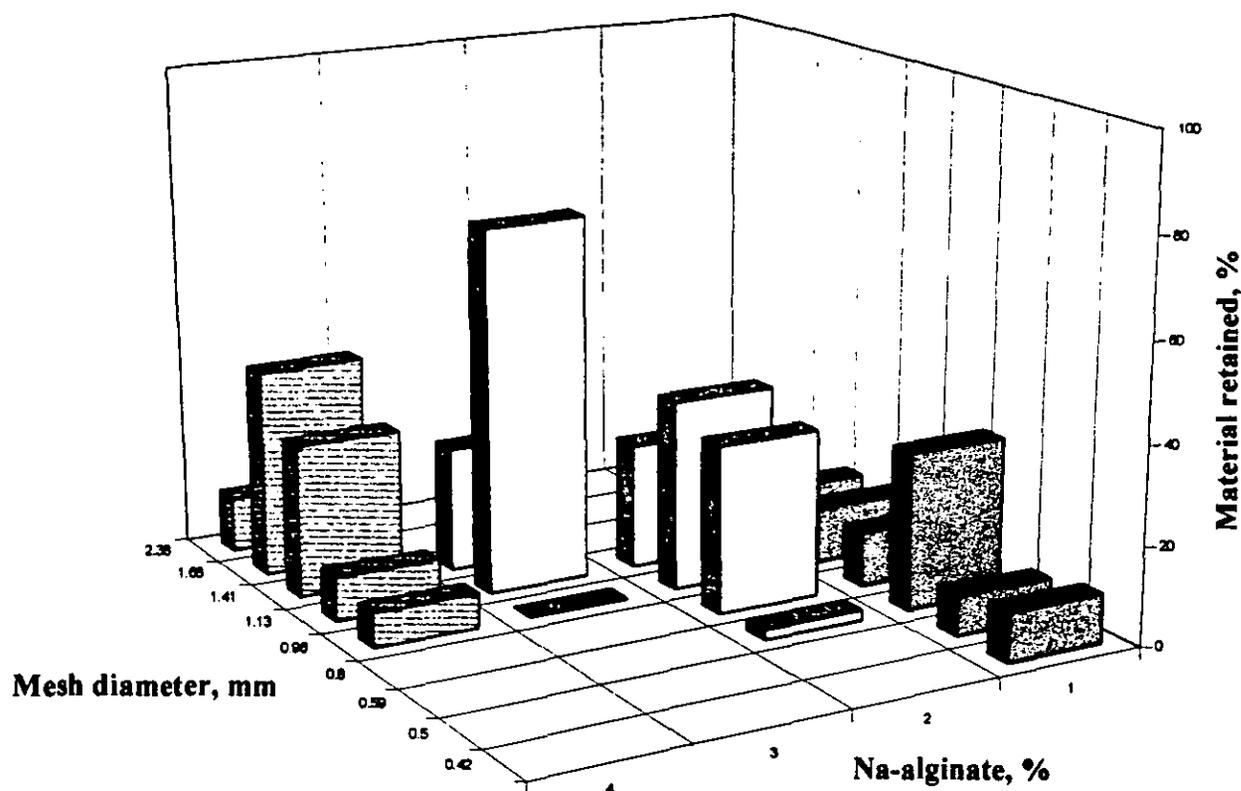


Fig. 3. Size distribution of the catalyst produced under different conditions.

tests were developed at a fixed air pressure ( $3 \text{ kg cm}^{-2}$ ). The results using the vernier were very similar (data not shown).

If the particles with diameter around 1.5 mm are the goal (in order to minimize mass transfer problems), the best alginate concentration to use was 3%, since 74% of the material showed a diameter around 1.13 mm, 2.54% a diameter of 1.41 mm, and only 1% a diameter of 0.96 mm.

In the case of the different air pressures assessed (for a 3% alginate solution), the most frequent diameters for the 0, 1, 2, and  $3 \text{ kg cm}^{-2}$  were 3.35, 2.38, 1.41, 1, and 1.13 mm (with abundances of 98.5, 86.5, 86.8, and 74.5%, respectively), as shown on Table 3.

The feed rate did not influence the most frequent diameter of the particles. Feed rates from 1.1 to  $325 \text{ ml min}^{-1}$  always gave an average diameter of 1.13 mm (when a 3% alginate solution was fed with an air pressure of  $3 \text{ kg cm}^{-2}$ ).

Finally, the height from the  $\text{CaCl}_2$  surface to the end of the pipe where the alginate drops are produced did not affect the size distribution itself, although it did affect the sphericity of the particles. The best catalyst was produced at a height of 80 cm (perfect polymer spheres with sphericity value of around 1.0). In the case of the lower heights, elongated biocatalysts were obtained (sphericity values of 2.61 and 1.74).

In conclusion, the best operational conditions were

Table 3. Production of Na-alginate spheres

Air pressure ( $\text{kg cm}^{-2}$ )	Diameter (mm)	Alginate conc. (%)	Diameter (mm)	Feed rate ( $\text{ml min}^{-1}$ )	Diameter (mm)	Height (m)	Sphericity $D_A/D_B$ (-)
0	3.35	1	0.59	1.1	1.13	20	$2.61 \pm 0.71$
1	2.38	2	0.96	30	1.13	40	$1.74 \pm 0.67$
2	1.41	3	1.13	150	1.13	80	$1.0 \pm 0.00$
3	1.13	4	1.41	325	1.13	-	-

an air pressure of  $3 \text{ kg cm}^{-2}$ , an alginate concentration of 3%, a feed rate as high as possible ( $325 \text{ ml min}^{-1}$  or more), and a height of 80 cm approximately.

#### Biocatalyst physical characterization

The real densities of the biocatalyst produced with different alginate/cells ratios were  $1.0066 \text{ g ml}^{-1} \pm 0.136\%$ . The apparent densities ranged between  $0.5673$  and  $0.9542 \text{ g ml}^{-1}$ , as an effect of the different cell concentrations and in part because of the particle size distributions.

The different alginate/cell ratios gave obviously different CFU  $\text{g}_{\text{support}}^{-1}$  values (data not shown), but some of the combinations resulted in very weak gels. On the basis of a very gross observation, a fairly good alginate/cell ratio is  $2.54/18.8$ , giving a cell load of about  $3.85 \times 10^{14} \text{ CFU g}_{\text{support}}^{-1}$ , which is reasonable when compared with other polymer catalysts.

Some tests were developed in order to determine the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  required for the gelation process. The alginate concentration was obviously a factor in determining the Ca requirements, but the  $\text{mg Ca}^{2+} \text{ mg alginate}^{-1}$  ratio was different for different alginate concentrations. When no cells were present, for alginate concentrations of 0.5, 1, 2, and 3% the ratios were 2.07, 1.079, 0.835, and 0.78, i.e. the higher the alginate concentration, the lower the  $\text{mg Ca}^{2+} \text{ mg alginate}^{-1}$  ratio. When different cell concentrations were added, the  $\text{mg Ca}^{2+} \text{ mg alginate}^{-1}$  ratios were slightly higher (data not shown). These facts are related to the diffusion of the  $\text{Ca}^{2+}$  ions into the Ca-alginate and Ca-alginate/cells catalysts.

Finally, a typical 3% alginate production batch gave yields of  $22.7 \text{ g}_{\text{spheres}} \text{ g}_{\text{alginate}}^{-1}$  and  $566 \text{ g}_{\text{spheres}} \text{ l}_{\text{alginate solution}}^{-1}$ , which are important figures for the calculation of the unit costs of the process.

#### Void fraction and humidity of the catalyst

The void fraction is an important parameter in biocatalyst packed column design, since it affects the pressure drop and the residence time. For example, the residence time for a continuously operated packed column will be

$$\Theta = V\varepsilon Q^{-1} \quad (3)$$

where  $\Theta$  is the residence time (in hours),  $\varepsilon$  is the void fraction (dimensionless),  $V$  is the column active volume (in litres), and  $Q$  the feed rate (in  $\text{l h}^{-1}$ ).

In order to estimate  $\varepsilon$ , it is necessary to know the critical humidity, as a measurement of the free water in the gel hydration. The drying curve for a 3% alginate biocatalyst (1.13 mm of diameter) is displayed in Fig. 4. The total humidity was plotted against the  $dH/dt$  rate (the total humidity loss in respect to the elapsed time). The curve is represented by three sections: a, where a high evaporation rate occurs, b, where an equilibrium between the heat transfer rate and the mass transfer rate occurs, and c, where drying rate drastically diminishes. When the catalyst reaches the critical humidity (the point between b and c, see Fig. 4), it is dehydrated in  $\text{CaCl}_2$  0.1 M solution. By volume difference, the void fraction is calculated, since  $\varepsilon$  is the relationship between the intraparticle and interparticle volumes over the total volume.

The void fractions and humidities for catalysts prepared under different conditions are shown in Table 4. First, the effect of the alginate concentration was tested (for spheres with 1.13 mm of diameter). An average  $\varepsilon$  value of  $0.6842 \pm 1.3\%$  was found as well as humidity values between 92 and 96% for the 3-1 alginate concentrations (the spheres with 4% alginate were not evaluated).

When a 3% alginate solution was used, and spheres with diameters between 1.13 and 3.35 mm were pro-

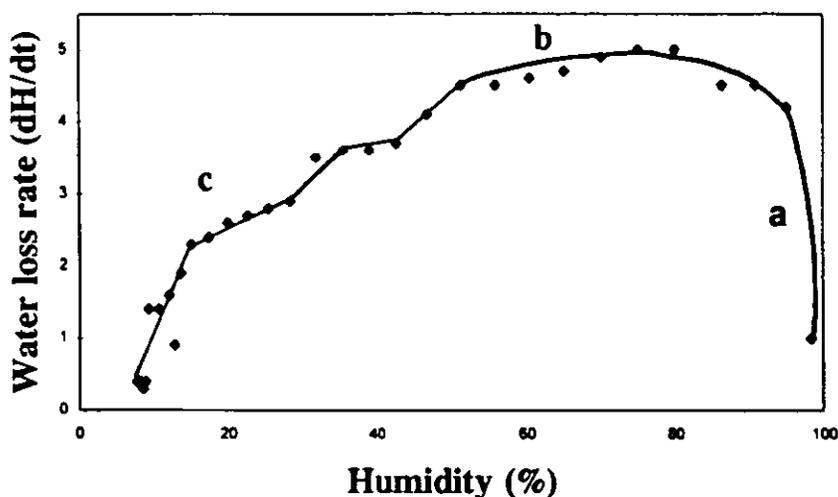


Fig. 4. Drying curve for the 3% alginate, 1.13 m diameter biocatalyst.

Table 4. Effect of some parameters over the void fraction and humidity for alginate spheres

Diameter = 1.13 mm			Ca-alginate 3%			Diameter = 1.13 mm		
Na-alginate (%)	$\epsilon$ (-)	Humidity (%)	Diameter (mm)	$\epsilon$ (-)	Humidity (%)	Alginate/cells ratio	$\epsilon$ (-)	Humidity (%)
4	ND	92.0	3.35	0.6875	93.0	60	0.5833	83.0
3	0.6862	93.0	2.38	0.6938	93.0	45	0.5777	84.5
2	0.6734	95.0	1.41	0.6346	93.0	30	0.6354	85.5
1	0.6930	96.0	1.13	0.6862	93.0	15	0.6428	87.0

ND, not determined.

duced, the void fraction value varied between 0.634 and 0.694 (maximum differences around 10%). The humidity in all cases was around 93%.

Finally, spheres with diameter 1.13 mm and alginate: cells ratios between 15 and 60 were produced and characterized. The void fractions values ranged from 0.578 and 0.643 with humidities between 83 and 87%. This seems to be the more remarkable effect observed and practical applications need to be taken into account.

#### Kinetic characterization

Table 5 shows the kinetic constants for 2CPh, 2,4DCPh and 2,4,6TCPh biodegradation tests. The parameters reported are  $C_0$ ,  $k$ , and the correlation coefficient ( $r$ ). As a general trend, it is noteworthy that for the experiments with initial concentrations 25–1000 mg l<sup>-1</sup>, the values of  $C_0$  were similar to the real initial concentrations, as measured with the 4-aminoantipirine method. The worst cases were those of the 2,4,6TCPh assessments. Secondly, no very clear relationships were found between chlorophenol initial concentration and the  $k$  value. In the case of the 2CPh, it varied between 0.0724 and 0.326. For the 2,4DCPh and 2,4,6TCPh tests, the ranges were 0.129–0.236 and 0.048–0.1583, respectively. It is important to observe that the experi-

ments with 2,4,6TCPh were carried out with initial concentrations up to 300 mg l<sup>-1</sup> only.

The trend of the  $k$  values was not clear. If the  $k$  values are compared at the same initial concentrations for the three different compounds, it can be observed that for the lowest concentration, the higher value of  $k$  corresponded to the 2,4,6TCPh, followed by 2,4DCPh and finally 2CPh. This trend was not the same for other concentrations. In the case of the 50, 100 and 1000 mg l<sup>-1</sup> the best value of  $k$  was for 2,4DCPh, while for 70, 300, 500 and 700 mg l<sup>-1</sup> the best  $k$  values were for 2CPh.

Another interesting value is  $t_{1/2}$ , reported in Table 5 for the different phenolic compounds and concentrations. This parameter means the time required in order to produce 50% of the initial toxic concentration as defined by the equation:

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (4)$$

As can be seen, at some concentrations anomalous values were obtained, maybe as a result of the fitting process. The  $t_{1/2}$  values for 2CPh were 9.57, 6.93, 2.85, 7.13 (too high), 3.25, 3.28, and 3.07 h. For the 2,4DCPh the half-lives were as high as 4.88, 4.64, 5.37 (too high), 4.52, 3.53, 3.53, and 2.76. Finally, for the 2,4,6TCPh the values were as follows: 4.37, 14.4, 5.45, 7.24, and 7.60 h.

It is important to mention that  $r$  values were high

Table 5. Kinetic constants for the 2CPh, 2,4DCPh, and 2,4,6TCPh degradation with the biocatalyst

Phenolic	Parameter	Concentration (mg l <sup>-1</sup> )							
		25	50	70	100	300	500	700	1000
2CPh	$C_0$ (mg l <sup>-1</sup> )	23.83	50.30	62.83	92.02	287.78	462.31	760.14	1004.7
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	0.0724	0.0999	0.2424	0.0972	0.2132	0.2140	0.3257	0.2256
	$t_{1/2}$ (h)	9.57	6.93	2.85	7.13	3.25	3.28	2.12	3.07
	$r$ (-)	0.89	0.89	0.98	0.89	0.99	0.98	0.98	0.99
2,4DCPh	$C_0$ (mg l <sup>-1</sup> )	20.73	51.96	65.97	79.04	314.16	530.19	602.43	979.08
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	0.142	0.1492	0.129	0.1533	0.1961	0.1963	0.2365	0.2512
	$t_{1/2}$ (h)	4.88	4.64	5.37	4.52	3.53	3.53	2.93	2.76
	$r$ (-)	0.91	0.98	0.95	0.9	0.97	0.98	0.98	0.99
2,4,6TCPh	$C_0$ (mg l <sup>-1</sup> )	12.5	43.55	68.56	60.18	287.27	ND	ND	ND
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	4.37	14.4	5.45	7.24	7.60	ND	ND	ND
	$t_{1/2}$ (h)	8.76	28.76	10.9	14.48	15.2	ND	ND	ND
	$r$ (-)	0.62	0.51	0.91	0.51	0.89	ND	ND	ND

ND, not determined.

enough for the 2CPh and 2,4DCPh experiments (between 0.89 and 0.99), but not for all the 2,4,6TCPH experiments (0.51–0.91). This means that 2,4,6TCPH degradation with this biocatalyst was not well modelled by a first-order expression, like the one mentioned earlier. The specific biodegradation rate (BDR), in contrast, did not follow a clear trend. The values for Ph and 2,4,6TCPH were similar, while the values for the mono and dichlorophenol are also close.

#### Biodegradation assessment

The biodegradation assessment of the biocatalyst was carried out with the spheres packed into the 0.027 l glass column as previously described. The biodegradation curves for the Ph, 2CPh, 2,4DCPh and 2,4,6TCPH are shown as a function of time in Fig. 5. The solid lines represents eqn (1). In Table 6, the main characteristics of the tests and the main results are displayed. For the experiment with 1000 mg l<sup>-1</sup> of Ph, the operation time was 120 h, sufficient to reach a 98% removal value, while for the 2CPh (500 mg l<sup>-1</sup>), 2,4DCPh (400 mg l<sup>-1</sup>), and 2,4,6TCPH (100 mg l<sup>-1</sup>) the opera-

tion times and removal values were 109, 160.5, and 210 h, and 95, 98 and 97%, respectively.

These operation times and compound degradation, in combination with the removal efficiencies, give different BDR and specific BDR, if the average CFU g<sub>support</sub><sup>-1</sup> (average of the initial and final conditions) is taken into account. It is noteworthy that BDR ranged from around 38 to 670 mg l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, for the tri < di < mono < phenol tests, which is congruent with their toxicities of 1.9, 2.0, 18.0, and 18.0 mg l<sup>-1</sup>, as EC50 measured by means of the Microtox system [11].

Dapaah and Hill [10] assessed the biodegradation of a mixture of phenol and 4-chlorophenol with *Pseudomonas putida* free cells. They reached BDR as high as 64 mg l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for 500 mg l<sup>-1</sup> of phenol and 13 mg l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for 100 mg l<sup>-1</sup> of 4-chlorophenol. Westmeier and Rehm [2] employed *Alcaligenes sp.* entrapped in Ca-alginate spheres for the degradation of 4-chlorophenol. They reported activities in the range of 269–514 mg l<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for 0.25–0.5 mg l<sup>-1</sup> of chlorophenol.

Lee et al. [3] studied the use of a mixture of six identified microorganisms immobilized in Ca-alginate

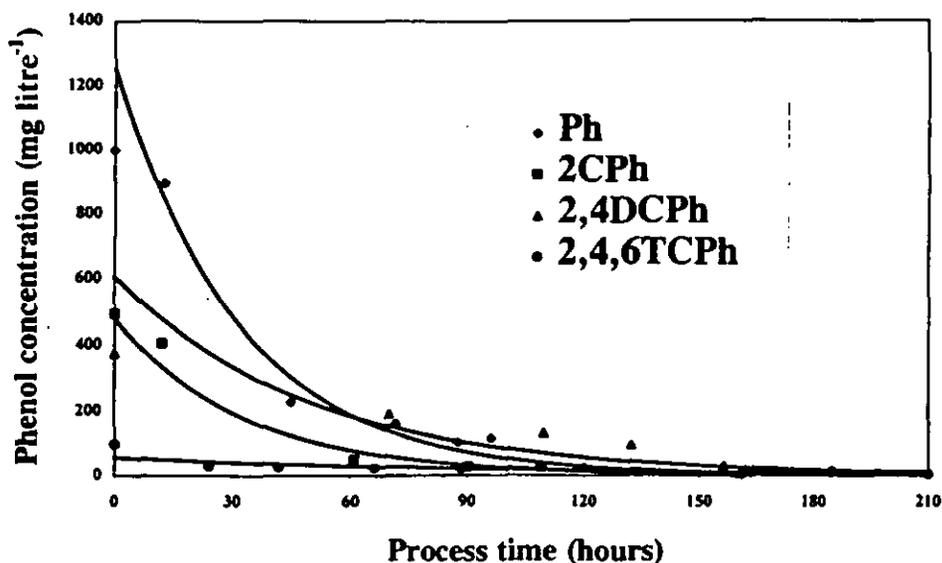


Fig. 5. Biodegradation curves for Ph, 2CPh, 2,4DCPh and 2,4,6 TCPH with the Ca-alginate/*P. fluorescens* biocatalyst.

Table 6. Results of the packed column biodegradation tests

Compound	Concentration (mg l <sup>-1</sup> )	FCUg <sub>support</sub> <sup>-1</sup>	Operation time (h)	Removal (%)	BDR (mg l <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	Specific BDR (mg CFU <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> ) (× 10 <sup>-100</sup> )
Ph	1000	1.41 × 10 <sup>8</sup>	120	98.0	669.2	58.4
2CPh	500	1.4 × 10 <sup>9</sup>	109	95.0	354.9	3.31
2,4DCPh	400	6.9 × 10 <sup>6</sup>	160.5	98.0	190.7	3.86
2,4,6TCPH	100	9.6 × 10 <sup>6</sup>	210	97.0	37.9	55.3

for the biodegradation of phenol, 2-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol. They observed activities of  $181\text{--}1000\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$  for  $200\text{--}500\text{ mg l}^{-1}$  of phenol,  $10\text{--}12.96\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$  for  $10\text{--}35\text{ mg l}^{-1}$  2-chlorophenol, and  $40\text{--}80\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$  for  $20\text{--}40\text{ mg l}^{-1}$  of 2,4-dichlorophenol.

Shwu-Ling *et al.* [4] immobilized *Rhodococcus sp.* on granular activated carbon and in calcium alginate for the continuous degradation of phenol. They assessed the system in the treatment of  $500\text{--}1500\text{ mg l}^{-1}$ . They found that the activated carbon system reached BDR as high as  $2910\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$ , while under the same conditions the Ca-alginate system presented a BDR of  $2100\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$ . It is worth noting that their system took 10 days before the effluent concentration was lower than the influent concentration (acclimation period).

### Conclusions

Many aspects, not very often considered when characterizing the production of a natural-polymer biocatalyst, have been described here. The rheological characterization of the Na-alginate mixtures before and after heat treatment, showed that the material suffers drastic changes due to the re-organization of the long alginate molecules. The rheological behaviour of the mixture is complex, since it is the product of the alginate-alginate and the cells-alginate interactions. This fact is in accord with the compromise existing between biocatalyst strength and biocatalyst efficiency.

Among the different parameter evaluated in the production of the Ca-alginate spheres, the air pressure fed together with the alginate solution in order to obtain the right size distribution profile was the most remarkable one. For a given Na-alginate concentration, the air pressure required in order to obtain a mean diameter around  $1.0\text{ mm}$ , was  $3.0\text{ kg cm}^{-2}$ . Fortunately, the feed rate was not dependent on the size distribution or the sphericity of the biocatalysts.

The parameter which affected the value of the void fraction more markedly was the alginate/cells ratio. This fact has not been published before and has a crucial importance regarding the biocatalyst design and operation.

The BDR and specific BDR values obtained with the Ca-alginate biocatalysts, when degrading phenol, 2CPH, 2,4DCPH and 2,4,6TCPH were sufficient high when compared with those published for other similar biocatalysts. Typical values of  $37.9\text{--}669.2\text{ mg l}^{-1}\text{ day}^{-1}$  for 2,4,6TCPH and Ph were obtained. Regarding to the specific BDR values, a range of  $3.31\text{--}58.4 \times 10^{-10}$  [10]  $\text{mg CFU}^{-1}\text{ day}^{-1}$ , were reached. The removal efficiencies reported were between 95 and 98%, for toxic concentrations of  $100\text{--}1000\text{ mg l}^{-1}$ .

Finally a kinetic characterization of the degradation of chlorophenols, showed that the expression  $C = C_0 \exp(-kt)$  represents the biodegradation profiles

fairly in the case of the mono, and dichlorophenols, but not very fairly for the trichlorophenol experiences.

Further studies on the use of a 54 ml glass column packed with Ca-alginate/*P. fluorescens*-cells biocatalyst are in progress. The effect of parameters such as spheres size, cells load, pH and dissolved oxygen concentration over the BDR and specific BDR, are the subject of study.

### Acknowledgements

This work was financially supported by DGAPA/UNAM (Grant IN503895). The English style revision is acknowledge with tanks to Manuel de la Torre. The authors thank Maricarmen Quirazco and Fany Iturbe (Facultad de Química/UNAM) for their help in the development of certain techniques, and for the permission to use a thermobalance, respectively. To I. Monje due to his useful comments regarding the manuscript. N. Beltrán thanks to CONACYT, México, for a Master Degree scholarship.

### References

- Cheetham P. S. J. and Bucke C., Immobilization of microbial cells and their use in wastewater treatment. In: J. M. Grainger and J. M. Lynch (Eds.), *Microbial Methods for Environmental Biotechnology*. Society for Applied Bacteriology, Technical Series 19. Academic Press, New York, 1984.
- Westmeier, F. and Rehm, J., Biodegradation of 4-chlorophenol by entrapped *Alcaligenes sp.* A 7-2. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1985, **22**, 301-305.
- Lee, C. M., Lu, C. J. and Chuang, M. S., Effects of immobilized cells on the biodegradation of chlorinated phenols. *Water Science and Technology* 1994, **30**(9), 87-90.
- Shwu-Ling, P., Yu-Lan, H., Nyuk-Min, Ch., Ching-Sen, S. and Cheishiang, Ch., Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus sp.* immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. *Bioresource Technology* 1995, **51**, 37-42.
- Torres, L. G., Albiter, V. and Jiménez, B., Removal of chlorophenols including pentachlorophenol at high concentrations from contaminated waters. In: *Proceedings of the in situ and on-site Bioremediation Symposium*, Battle, New Orleans, LA, April-May 1997, pp. 447-452.
- Torres, L. G., Bandala, E., Albiter, V., Cabello, M., Sánchez-de-la-Vega, A. and Jiménez, B., Biodegradation of some chloro-, nitro-, and methylphenols by *Pseudomonas fluorescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, submitted.
- Hannote, M., Flores, F., Torres, L. and Galindo, E., Apparent yield stress estimation in xanthan gum solutions and fermentation broths using a low-cost viscometer. *The Chemical Engineering Journal* 1991, **45**, B49-B56.

8. APHA, AWWA and WPCF. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17th ed., USA, 1989.
9. Buchholz, K., Characterization of Immobilized Biocatalysts, Vol. 84, Dechema, Frankfurt, 1979, pp. 73-94 and 127-135.
10. Dapaah, S. Y. and Hill, G. A., Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering* 1992, **40**, 1353-1358.
11. Blum, D. J. W. and Speece, R. E., A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparison and correlations. *Research Journal WPCF* 1991, **63**(3), 198-207.