



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES FENÓLICAS EN UN  
REACTOR SBR CON BIOMASA GRANULAR AEROBIA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTA:

**DIANA YOSSELIN BADILLO CHÁVEZ**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GABRIELA ALEJANDRA VÁZQUEZ RODRÍGUEZ

Parte de esta tesis fue presentada en los siguientes eventos académicos:

- **Badillo Chávez Y.**, Calvario Rivera C.I., Baños Rodríguez U. y Vázquez Rodríguez G. (2007) Efecto de la aclimatación sobre la producción de exopolímeros en gránulos aerobios degradadores de fenol. Memorias del *2º Taller Internacional de Biotecnología y 2º Encuentro Internacional de Energías Alternativas*, Pachuca Hgo., 7-9 noviembre.
  
- Calvario Rivera C.I., **Badillo Chávez Y.**, Cruz Gómez C., Weissman Vilanova J. y Vázquez Rodríguez G. (2007) Efecto de la aclimatación sobre la cinética de biodegradación de fenol por parte de gránulos aerobios. Memorias del *2º Taller Internacional de Biotecnología y 2º Encuentro Internacional de Energías Alternativas*, Pachuca Hgo., 7-9 noviembre.

---

*“La virtud, como el arte, se consagra  
constantemente a lo que es difícil  
de hacer, y cuando más dura es  
la tarea, más brillante  
es el éxito.”*

*PLATÓN*

---

## DEDICATORIAS

*A mis queridos padres Ernestina Chávez Badillo y Celso Badillo Bustos:*

*A quiénes les debo la vida, lo que soy, por ser mi ejemplo más grande, por darme sus consejos, por ayudarme a conseguir esta meta y lo más importante por luchar tanto para sacarme adelante.*

*Gracias, los quiero mucho y los admiro.*

*A mi hermano Edwin Raúl Badillo Chávez:*

*Por darme momentos inolvidables y por su cariño.*

*A mi tío Simeon Hernández Badillo:*

*Por sus consejos, enseñanzas y por su apoyo incondicional.*

*A ti Aldo Iván Ordóñez Hernández:*

*Por enseñarme a vivir la vida, por ayudarme a ver los momentos difíciles en momentos de aprendizaje por escucharme y siempre estar conmigo.*

*Te amo*

---

## AGRADECIMIENTOS

*Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Gabriela Alejandra Vázquez Rodríguez por dirigirme en mi tesis, por su tiempo, enseñanza y sobre todo por su amistad.*

*A todos los profesores de mi carrera por compartirme sus conocimientos y sus valores.*

*A mis amigas Brenda, Altagracia, Jovita, Sra. Rocío y Sra. Isabel, por brindarme su amistad y su apoyo incondicional.*

*A mis compañeros de laboratorio: Claudia, Ubaldo y Violeta, por todo su apoyo en este trabajo.*

---



---

	Índice
2.3.1 Biodegradación de altas concentraciones de fenol por <i>Pseudomonas putida</i> MTCC 1194	17
2.3.2 Biodegradación de altas concentraciones de fenol por <i>Candida tropicalis</i>	17
<b>2.4 Tratamiento de aguas residuales con biomasa granular aerobia</b>	<b>17</b>
2.4.1 Factores que afectan la granulación aerobia	18
2.4.2 Características de los gránulos	20
2.4.3 Estructura y diversidad microbiana	21
2.4.3.1 Estructura microbiana	21
2.4.3.2 Diversidad microbiana	22
2.4.4 Mecanismos de granulación aerobia	22
2.4.5 Tratamiento de aguas residuales fenólicas con biomasa granular aerobia.	24
2.4.6 Cultivo de gránulos aerobios estables degradadores de fenol utilizando gránulos alimentados con acetato como inóculo	25
2.4.7 Tratamiento anóxico de aguas residuales fenólicas en un reactor granular de alimentación secuenciada	26
2.4.8 Las sustancias poliméricas extracelulares	26
2.4.8.1 Las sustancias poliméricas extracelulares en gránulos aerobios	27
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Planteamiento del problema</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Justificación</b>	<b>28</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Objetivo general</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Objetivos específicos</b>	<b>29</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>

---

---

	Índice
<b>5.1 Instalación e instrumentación del reactor</b>	30
<b>5.2 Obtención de gránulos aerobios</b>	33
5.2.1 Inóculo	33
5.2.2 Medio de cultivo	34
<b>5.3 Cultivos en matraces agitados</b>	35
<b>5.4 Métodos analíticos</b>	35
5.4.1 Análisis de la biomasa	35
5.4.1.1 <i>Determinación de sólidos suspendidos totales (SST)</i>	35
5.4.1.2 <i>Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)</i>	35
5.4.1.3 <i>Microscopía electrónica de barrido</i>	36
5.4.2 Determinación de la concentración de fenol	36
5.4.2.1 <i>Método de la 4-aminoantipirina</i>	36
5.4.2.2 <i>Método espectrofotométrico UV</i>	37
5.4.3 Análisis de exopolímeros	38
5.4.3.1 <i>Determinación de polisacáridos</i>	38
5.4.3.2 <i>Determinación de proteínas</i>	39
5.4.4 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)	40
5.4.5 Determinación de la concentración de metabolitos intermediarios	41
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	42
<b>6.1 Granulación aerobia a partir de inóculos de lodos activados</b>	42
<b>6.2 Efecto de la aclimatación al fenol sobre la producción de exopolímeros</b>	44
<b>6.3 Efecto de la aclimatación al fenol sobre su cinética de degradación</b>	47
6.3.1 Biodegradación en el reactor granular	47
6.3.2 Biodegradación en matraces agitados	53
6.3.2.1 <i>Producción de metabolitos intermediarios</i>	56

---

<b>7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>58</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>66</b>
<b>9.1 Mecanismos de biodegradación aerobia del fenol</b>	<b>66</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>2-HMAS</b>	Semialdehído 2-hidroximucónico
<b>CVA</b>	Carga volumétrica aplicada [ $\text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ ]
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i>
<b>EPS</b>	Exopolímeros
<b>PN</b>	Proteínas
<b>PN/PS</b>	Relación proteínas/polisacáridos
<b>PS</b>	Polisacáridos
<b><math>Q_0</math></b>	Caudal de agua residual tratada [L/h]
<b><math>q_s</math></b>	Velocidad específica de degradación [mg/g SST·h]
<b><math>S_0</math></b>	Concentración inicial de fenol [mg/L]
<b><math>S_{0inf}</math></b>	Concentración inicial de fenol en el influente [mg/L]
<b>SBR</b>	<i>Sequencing batch reactor</i>
<b>SST</b>	Sólidos suspendidos totales
<b>SSV</b>	Sólidos suspendidos volátiles
<b><math>t_c</math></b>	Duración del ciclo de trabajo [h]
<b>TRH</b>	Tiempo de retención hidráulico [h]
<b>V</b>	Volumen de trabajo el reactor [L]
<b><math>V_s</math></b>	Velocidad superficial de aireación [m/s]
<b>X</b>	Concentración de biomasa [g SST/L]

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 2.1	Estructura del fenol	3
Figura 2.2	Esquema de un sistema de lodos activados	8
Figura 2.3	Etapas de un ciclo de operación de un reactor SBR	9
Figura 2.4	Esquema de un reactor de lecho anaerobio de flujo ascendente	11
Figura 2.5	Esquema de un reactor de lecho fluidizado	12
Figura 2.6	Esquema de un reactor de biopelícula fluidizada	13
Figura 2.7	Esquema de un reactor de circulación interna	14
Figura 2.8	Esquema de un filtro percolador	15
Figura 2.9	Esquema de un contactor rotatorio	16
Figura 2.10	Recreación de la estructura microbiana de un gránulo aerobio	22
Figura 5.1	Esquema del SBR granular	30
Figura 5.2	Panel de control del reactor SBR	33
Figura 5.3	Curva de calibración para la determinación de fenol por el método de la 4-aminoantipirina	37
Figura 5.4	Curva de calibración para la determinación de polisacáridos	38
Figura 5.5	Curva de calibración para la determinación de proteínas	39

Figura 5.6	Curva de calibración para la determinación de la demanda química de oxígeno	40
Figura 6.1	Estructura de un gránulo aerobio obtenida con microscopio electrónico de barrido	42
Figura 6.2	Bacterias en los primeros gránulos obtenidos	43
Figura 6.3	Efecto de la concentración de fenol en el influente sobre la cantidad de polisacáridos (PS), proteínas (PN) y exopolímeros totales (EPS).	45
Figura 6.4	Efecto de la concentración de fenol en el influente sobre la relación PN/PS	47
Figura 6.5	Cinéticas de degradación en el reactor con diferentes concentraciones iniciales de fenol: (●) 53; (○) 126; (■) 150; (□) 224; (▲) 263; (△) 297; (◆) 329 mg/L	48
Figura 6.6	Efecto de la concentración de fenol en el influente ( $S_{0inf}$ ) sobre la velocidad específica de degradación ( $q_s$ ) y el tiempo de degradación	51
Figura 6.7	Biodegradación de bajas concentraciones de fenol ( $S_{0inf}$ ) en el reactor: (●) 100; (○) 200; (■) 300; (□) 400 mg/L	52
Figura 6.8	Biodegradación de altas concentraciones de fenol ( $S_{0inf}$ ) en el reactor: (▲) 500; (△) 600; (◆) 700 mg/L	52
Figura 6.9	Biodegradación de fenol en matraces agitados a diferentes concentraciones iniciales: (●) 50; (○) 100; (■) 250; (□) 400 mg/L	53
Figura 6.10	Biodegradación de fenol en matraces agitados a diferentes concentraciones iniciales: (◆) 500; (◇) 750; (▲) 1000; (△) 1250 mg/L	54

Figura 6.11	Efecto de la concentración de fenol en matraces agitados sobre la velocidad específica de degradación ( $q_s$ ) en matraces agitados. Gránulos aclimatados a: (■) 100, (●) 500 y (▲) 700 mg/L	55
Figura 6.12	(●) Biodegradación de fenol y producción del metabolito intermediario (2-HMAS) con diferentes concentraciones iniciales de fenol	56

## ÍNDICE DE TABLAS

		<b>Página</b>
Tabla 2.1	Criterios ecológicos de calidad del agua para el fenol	4
Tabla 2.2	Propiedades físicas y químicas del fenol	5
Tabla 5.1	Etapas de operación del reactor	31
Tabla 5.4	Composición del agua residual sintética	34
Tabla 5.5	Composición de la solución de elementos traza	34
Tabla 6.1	Velocidades de biodegradación de fenol observadas a distintas concentraciones de aclimatación ( $S_{0inf}$ )	49

# ***RESUMEN***

---

## RESUMEN

El fenol es un contaminante comúnmente encontrado en aguas residuales industriales. El objetivo de este estudio fue biodegradar el fenol presente en un agua residual sintética con gránulos aerobios utilizando un reactor discontinuo de alimentación secuenciada. Éste se inoculó con lodos activados provenientes de una planta tratadora de aguas residuales domésticas. Una vez obtenidos los gránulos, se aclimataron a diferentes concentraciones de fenol hasta alcanzar 700 mg/L. Para observar el efecto de la inhibición sobre los gránulos, se estudió la cinética de biodegradación en matraces agitados con distintas concentraciones de fenol, y se observó la producción de un metabolito intermediario (semialdehído 2-hidroximucónico). Así mismo, se estudió el efecto de las distintas concentraciones de aclimatación de fenol sobre la velocidad específica de degradación ( $q_s$ ) y sobre la producción de exopolisacáridos (polisacáridos, PS y proteínas, PN). Se observó que las concentraciones de PS y PN aumentaron conforme se incrementó la concentración de fenol, a lo cual se puede atribuir la resistencia de los gránulos contra el fenol; lo anterior condujo también a una notable disminución en la relación PN/PS. Se obtuvo una buena degradación del fenol ya que los gránulos fueron inhibidos sólo a altas concentraciones de fenol, y un efecto positivo sobre la  $q_s$ . Se concluye que los gránulos aerobios son aptos para degradar fenol a altas concentraciones y que la aclimatación contribuye a que los gránulos segreguen sustancias exopoliméricas que les sirven como barrera protectora hacia el fenol.

# ***INTRODUCCIÓN***

---

# 1. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural renovable cuyo contenido de fenol representa un riesgo potencial para el medio ambiente y la salud humana. Una fuente de emisión de dicho contaminante hacia el ambiente son las numerosas industrias que lo usan como materia prima. La eliminación de fenol se realiza mediante procesos que se clasifican en dos grupos: los fisicoquímicos y los biológicos. Sin embargo, el uso de tratamientos no biológicos puede ser un inconveniente, ya que eleva los costos y puede llevar a la formación de subproductos peligrosos.

La degradación biológica se prefiere debido a sus bajos costos, y a que conduce a la mineralización del fenol en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . El tratamiento biológico de aguas residuales fenólicas se lleva a cabo principalmente en sistemas continuos de lodos activados aerobios. No obstante, estos procesos se ven afectados por cargas elevadas de fenol, ya que se trata de un sustrato tóxico e inhibitorio para los microorganismos.

La granulación aerobia es una nueva forma de inmovilización celular para el tratamiento de aguas residuales. Los gránulos microbianos aerobios cultivados en un reactor de alimentación secuenciada (*sequencing batch reactor*, SBR) poseen una estructura microbiana compacta y fuerte, buena sedimentabilidad y alta retención de biomasa. Por lo general, los sistemas de granulación aerobia requieren un arranque total de tres meses, pero es conveniente aclimatar aún más tiempo los inóculos provenientes de lodos activados a la presencia de fenol. Estos largos periodos de arranque representan un problema para la aplicación industrial de la granulación aerobia. Por lo tanto, es de particular importancia estudiar los efectos de la aclimatación al fenol en gránulos aerobios.

El objetivo de este trabajo fue cultivar en un SBR los gránulos con una fuente de carbono fácilmente asimilable, como el etanol, y someterlos luego a un periodo de

aclimatación para incrementar su potencial de degradación y lograr la remoción de fenol a concentraciones superiores a 700 mg/L. Los resultados permitirán obtener aguas residuales con una concentración de fenol dentro de los límites establecidos por las normas mexicanas de medio ambiente para su descarga.

# ***MARCO TEÓRICO***

---

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 El fenol en el medio acuático

El fenol es un compuesto orgánico aromático (Fig. 2.1) que en su forma pura es un sólido de incoloro a blanco; el producto comercial, que contiene cierta cantidad de agua, es un líquido. Tiene un olor dulce y alquitranado característico. El fenol empieza a ser detectado por las personas cuando se encuentra a concentraciones aproximadas de 40 ppb en el aire y de 1 a 8 ppm en el agua. El fenol se evapora más lentamente que el agua (ATSDR, 1998).

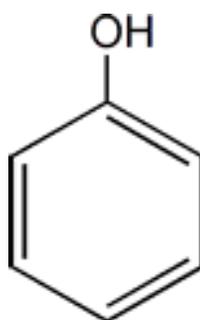


Figura 2.1. Estructura del fenol

El fenol se obtiene industrialmente a partir del alquitrán del carbón; también por la fusión del benzenosulfonato de sodio con hidróxido de sodio o por el calentamiento del monoclorobenceno con hidróxido de sodio a altas presiones. El fenol es un material de utilidad industrial para la obtención de diversos productos, tales como pinturas, pesticidas, plásticos, productos farmacéuticos, aceite de refinerías, llantas, piel y petroquímicos, entre otros (Fang y Chen, 1997; Murialdo *et al.*, 2003). Por lo anterior, se le encuentra con frecuencia en el medio acuático.

El fenol y sus derivados se han asociado con efectos agudos y crónicos para la salud humana (ATSDR, 1998). Así, el fenol se encuentra en la lista de las 275 sustancias más peligrosas, establecida en 1991 por la Agencia Ambiental de Estados Unidos, EPA (Bravo y Páez, 1998). La EPA también recomienda que el nivel de fenol en aguas superficiales (lagos, arroyos) no exceda 3.5 mg/L para evitar consumir agua o peces contaminados (ATDSR, 1998).

En México, su concentración en agua potable no debe ser superior a 0.3 mg/L según la modificación a la NOM-127-SSA-1994 (INE, 2000), mientras que los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua establecen los límites máximos especificados en la Tabla 2.1 para los diferentes usos del agua.

Tabla 2.1. Criterios ecológicos de calidad del agua para el fenol

Uso del agua	Límite máximo permisible [mg/L]
Fuente de abastecimiento de agua potable	0.300
Recreativo con contacto primario	0.001
Protección de la vida acuática (agua dulce)	0.100
Protección de la vida acuática (agua marina)	0.060

### 2.1.1 Propiedades físicas y químicas del fenol

La capacidad para formar enlaces de hidrógeno fuertes con las moléculas de agua confiere a los fenoles una solubilidad moderada en agua. En la tabla 2.2 (Rippen *et al.*, 1989) se resumen las propiedades físicas y químicas de este compuesto.

Tabla 2.2. Propiedades físicas y químicas del fenol

Fórmula empírica:	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O
Masa molecular relativa:	94.11 g
Densidad:	1.07 g/cm <sup>3</sup> a 20°C
Densidad relativa del gas:	3.24
Punto de ebullición:	181.75°C
Punto de fusión:	40.8°C
Presión de vapor:	0.2 hPa a 20°C 3.5 hPa a 50°C 54 hPa a 100°C
Punto de inflamación:	82°C
Temperatura de ignición:	595°C
Límites de explosividad:	1.3-9.5% V
Umbral de olor:	0.18 mg/m <sup>3</sup> = 0.046 ppm
Solvólisis:	En agua: 82 g/L se disuelve fácilmente en alcohol, éter, cloroformo, grasas y aceites esenciales

### 2.1.2 Biodegradación del fenol

La biodegradación aerobia del fenol es llevada a cabo por diferentes rutas, gracias a la mediación de una amplia variedad de microorganismos.

La biodegradación del fenol inicia con una reacción de canalización, que prepara el anillo aromático para su ruptura y posterior conversión en moléculas precursoras y/o en CO<sub>2</sub>. Esta conversión genera energía, ya sea en forma de ATP o de poder reductor (*i.e.*,

NADH). Las reacciones de canalización producen moléculas de menor estabilidad termodinámica que los sustratos, lo cual se logra por la inserción de oxígeno en forma de un grupo hidroxilo. Esta importante etapa de la biodegradación es catalizada por una monooxigenasa, la cual introduce uno de los átomos de oxígeno de la molécula de O<sub>2</sub>, al tiempo que reduce el otro a H<sub>2</sub>O (Gibson *et al.*, 1968). En el Anexo A se presenta un esquema con las rutas de biodegradación aerobia del fenol.

El catecol así formado es el principal intermediario en el catabolismo del fenol. Este compuesto puede posteriormente fisionarse de dos maneras, debido a lo cual existen las rutas conocidas como *orto* y *meta*. En la ruta *orto*, el anillo se rompe al interior del enlace diol y se produce ácido mucónico, mientras que en la ruta *meta* la ruptura ocurre en un enlace adyacente al enlace diol y se genera el semialdehído 2-hidroximucónico (2-HMAS). Ambas rupturas son catalizadas por dioxigenasas, las cuales, a diferencia de las monooxigenasas, insertan los dos átomos de oxígeno del O<sub>2</sub> en el catecol. Se ha reportado que la ruta *meta* caracteriza la biodegradación de fenol por parte de *Pseudomonas pickettii*, *P. putida*, *Ralstonia eutropha* y *Ochromonas danica*, mientras que *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra* y *Trichosporon cutaneum* utilizan la vía *orto* (Semple y Cain, 1996; Komarkova *et al.*, 2003; Shalaby, 2003). En general, la ruta *orto* es utilizada por microorganismos asociados al suelo, y particularmente en grupos bacterianos asociados a plantas, *i.e.*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* spp. (Ramírez-Cerón, 2005), por lo que es más probable que los microorganismos de los lodos activados utilicen la vía *meta*.

En la ruta *meta*, después de que se rompe el anillo debido a la acción de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa, el 2-HMAS puede degradarse de dos distintas formas. En la primera, el 2-HMAS se oxida para dar el ácido 2-hidroximucónico, que es descarboxilado a través de la acción de las enzimas isomerasa y descarboxilasa para dar el ácido 2-oxopenta-4-enoico. En la segunda, el 2-HMAS se fracciona por hidrólisis para producir el ácido formico y el ácido 2-oxopenta-4-enoico, y que es degradado por hidratación a 4-hidroxi-2-oxovaleriato y después a acetaldehído y piruvato por

mediación de una aldolasa. Estos productos siguen oxidándose al incorporarse al ciclo de Krebs (Bugg y Winfield, 1998).

## **2.2 Tratamiento biológico de aguas residuales**

Las aguas residuales son ricas en materia orgánica y deben ser tratadas antes de ser descargadas al medio acuático. Se utiliza una variedad de procesos biológicos para su tratamiento, los cuales pueden basarse en el uso de biomasa en suspensión o de biopelículas.

### 2.2.1 Procesos con biomasa en suspensión

En estos sistemas los microorganismos se encuentran libres dentro del reactor. Son muy aplicados, pero su mayor inconveniente consiste en que, frecuentemente, presentan problemas de sedimentabilidad, debido a lo cual los microorganismos se escapan con el efluente y deterioran su calidad. Los procesos más conocidos son los de lodos activados, los procesos continuos de alimentación secuenciada (SBR) y las lagunas.

#### 2.2.1.1 *Proceso de lodos activados*

El proceso de lodos activados (Fig. 2.2) consiste en poner en contacto en un reactor el agua residual, la biomasa y aire en abundancia, en condiciones de agitación suficientes para mantener la biomasa en suspensión y asegurar un buen contacto con el oxígeno del aire. Después de un tiempo de reacción, la masa de los lodos activados se lleva a un sedimentador secundario, donde se separa del agua clarificada. Una parte de los lodos activados se recircula al reactor para mantener la concentración de biomasa requerida y el resto se elimina como purga. El proceso de lodos activados convencional

es el más utilizado cuando se desea un efluente de calidad, se dispone de suficiente terreno y los volúmenes a tratar son importantes. Sin embargo, el bajo tiempo de retención hidráulica lo hace sensible a las descargas tóxicas puntuales (Rigola-Lapeña, 1999).

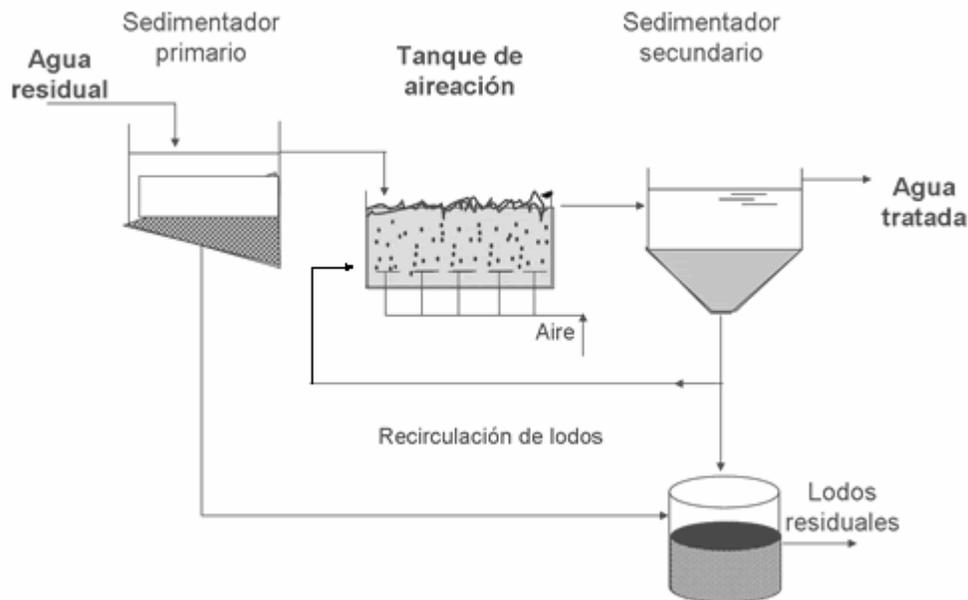


Figura 2.2. Esquema de un sistema de lodos activados

Fuente: [www.rema.com.mx/images/sistema\\_lodos.gif](http://www.rema.com.mx/images/sistema_lodos.gif)

### 2.2.1.2 Procesos discontinuos de alimentación secuenciada

En un sistema SBR (*Sequencing Batch Reactor*) con biomasa suspendida, la aireación y la clarificación son llevadas a cabo secuencialmente en el mismo tanque. El ciclo de operación de un SBR procede en 5 pasos: llenado, reacción (con mezcla y/o aireación), sedimentación, reposo y vaciado (Fig. 2.3). Muchas instalaciones SBR comprenden al menos dos reactores idénticos, los cuales reciben el influente alternadamente y pueden proveer tratamiento continuo.

El lodo es desechado del reactor durante la purga, cuando el volumen del lodo alcanza cierto nivel. Los costos de construcción y operación de los SBR son aproximadamente 20% inferiores a los de las plantas convencionales de lodos activados, debido primordialmente al hecho de que no es necesario un sedimentador externo. Inclusive, en muchos casos no se requiere un tratamiento primario. Las fluctuaciones en carga orgánica pueden ajustarse fácilmente por medio de la variación del volumen del reactor, del nivel de oxígeno disuelto y de la concentración de biomasa, ajustes que son imposibles en los sistemas convencionales de lodos activados (Henry y Heinke, 1996).

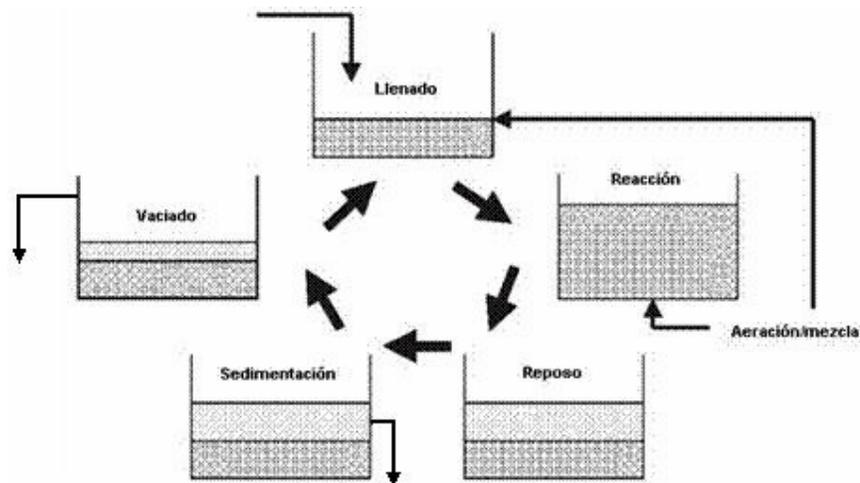


Figura. 2.3. Etapas de un ciclo de operación de un reactor SBR

Fuente: [www.epa.gov/.../625r00008/html/html/tfs3fig1.gif](http://www.epa.gov/.../625r00008/html/html/tfs3fig1.gif)

### 2.2.1.3 Lagunas

Las lagunas de estabilización son de uso muy generalizado, ya que su desarrollo y aplicación son sencillos. Son recomendables para lugares con condiciones climatológicas adecuadas, en climas cálidos o semicálidos, en áreas con bajo costo de terreno y de fácil excavación, cuando la carga orgánica tiene grandes variaciones y donde hay presupuesto limitado. El tratamiento ocurre por la oxidación de la materia orgánica debida a las bacterias y al suministro de oxígeno que aportan las algas. Este

proceso se efectúa de manera simbiótica, ya que las bacterias tienen la propiedad de degradar la materia orgánica compleja y producir dióxido de carbono, el cual sirve de fuente de carbono para las algas. El oxígeno producido por las algas puede no ser suficiente para el proceso de degradación por lo que, en ocasiones, se colocan aireadores superficiales. Estas lagunas se convierten en un sistema facultativo y se asemejan en su comportamiento a los ríos y lagos. Las lagunas se clasifican como anaerobias, aerobias, facultativas aerobias-aireadas y facultativas-aireadas (Jiménez, 2002).

## 2.2.2 Procesos con biopelículas particuladas

En los sistemas basados en biopelículas, los microorganismos se encuentran adheridos a un soporte. Tienen menor volumen que los sistemas con biomasa suspendida y producen agregados microbianos con alto grado de sedimentabilidad. Estos pueden ser de dos tipos: los de biopelículas fijas y los que emplean biopelículas particuladas en movimiento dentro del reactor. Algunos de los principales procesos que utilizan biopelículas particuladas se describen a continuación.

### 2.2.2.1 *Reactor de lecho anaerobio de flujo ascendente*

En este tipo de reactores, la biomasa crece en forma de gránulos densos (1-4 mm) y se permite la acumulación de gran cantidad de biomasa activa en el reactor. Además, no se necesita un sedimentador externo, ya que la separación del lodo se integra en el propio reactor.

El agua residual entra desde el fondo del reactor y asciende a través del denso lecho de lodos anaerobios. La demanda química de oxígeno (DQO) soluble es convertida a biogás, el cual es rico en metano y estabiliza la circulación ascendente del agua y del

gas naciente de lodos (Fig. 2.4). El diseño de este reactor permite altas velocidades de carga, así como un corto tiempo de retención hidráulico (TRH) (Nicolella *et al.*, 2000).

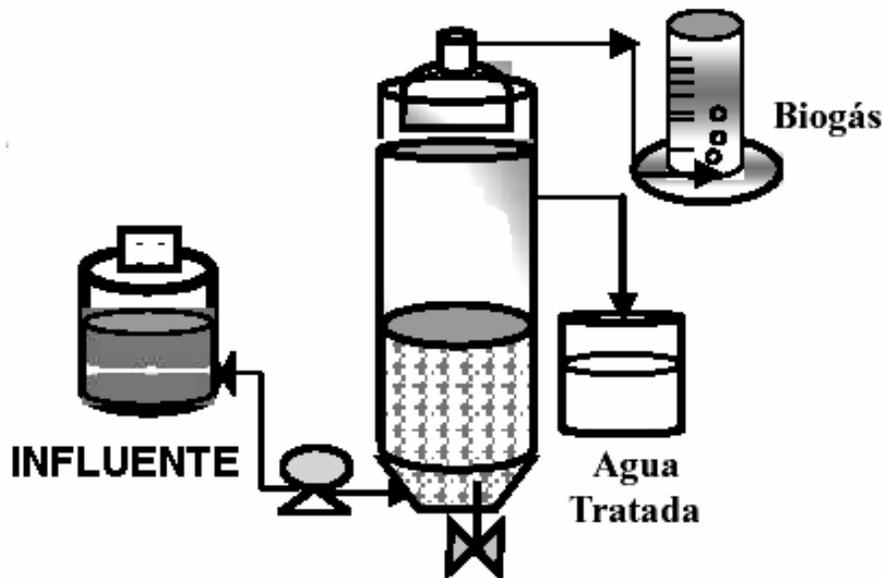


Figura 2.4. Esquema de un reactor de lecho anaerobio de flujo ascendente

Fuente: [www.scielo.org.ve/.../v28n2/art03img01.gif](http://www.scielo.org.ve/.../v28n2/art03img01.gif)

### 2.2.2.2 Reactor de lecho fluidizado

En este tipo de reactor, el agua residual es bombeada a través de un lecho de tamaño medio a una velocidad de fluidización determinada (Fig. 2.5). Se permiten concentraciones de biomasa en un rango de 10-40 g/L.

Este reactor es muy usado para tratar efluentes contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos que requieren de periodos de residencia mayores de 15 días para la oxidación biológica, así como con concentraciones reducidas de sólidos suspendidos (Nicolella *et al.*, 2000).

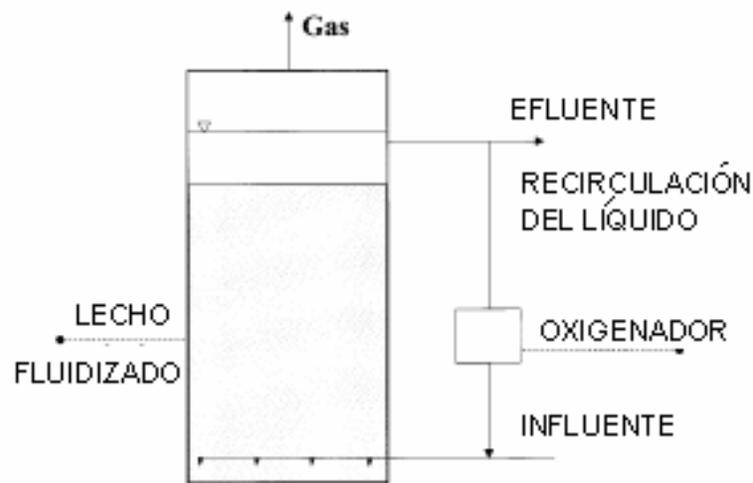


Figura 2.5. Esquema de un reactor de lecho fluidizado

### 2.2.2.3 Reactor de biopelícula fluidizada

Este reactor consiste en dos secciones conectadas, una ascendente y otra descendente (Fig. 2.6). El principio de operación es el esparcimiento de un gas desde el fondo del reactor, el cual sube hasta la cúspide de la sección ascendente para de esta forma suministrar aireación a todo el reactor. Cuando la velocidad del líquido es suficientemente alta, las partículas pueden ser suspendidas y recirculadas con el líquido, con lo que se mezclan en todo el reactor. Esta tecnología fue originalmente diseñada para su aplicación en el tratamiento de aguas residuales industriales (Nicoletta *et al.*, 2000).

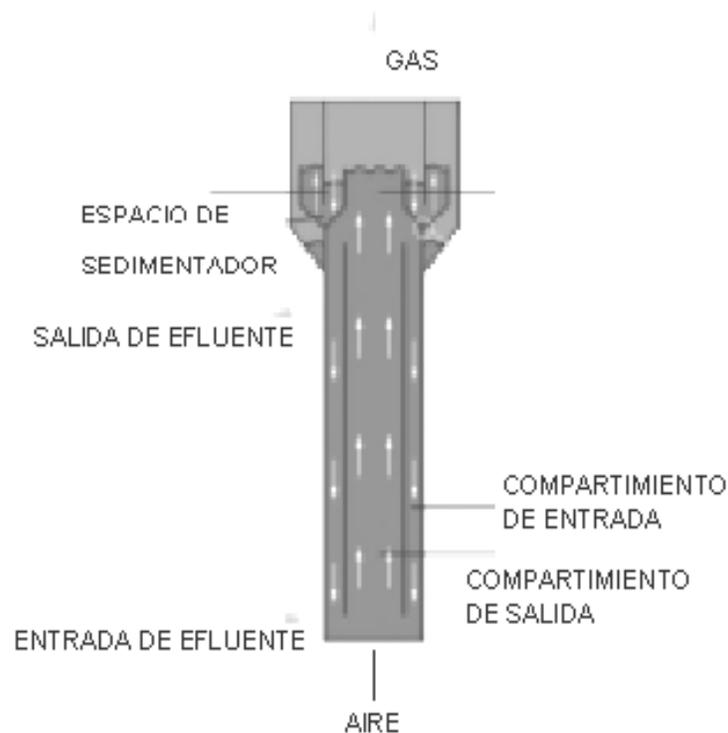


Figura 2.6. Esquema de un reactor de biopelícula fluidizada

Fuente: [www.dedini.com.br/pt/imagens/efluente\\_04.jpg](http://www.dedini.com.br/pt/imagens/efluente_04.jpg)

#### 2.2.2.4 Reactor de circulación interna

Esta tecnología emplea dos reactores de lecho anaerobio de flujo ascendente, interconectados uno encima del otro (Fig. 2.7). La mayor parte del biogás se produce en la primera etapa, que se localiza en la parte baja del reactor. El gas es atrapado en una campana extractora atravesando la zona ascendente para una separación líquido-gas que tiene lugar en el reactor superior. Así, la producción de biogás es dirigida por un flujo de circulación interna a través de la fluidización. En la sección de abajo, la velocidad del líquido ascendente varía de 10 a 20 m/h. El efluente del primer compartimiento es post-tratado en el segundo, donde se remueve la DQO biodegradable que quedó en el primero. Las velocidades del líquido en este

compartimiento varían de 2 a 10 m/h. Estos sistemas consisten en reactores verticales delgados con alturas de hasta 25 m y un área relativamente pequeña (Nicolella *et al.*, 2000).

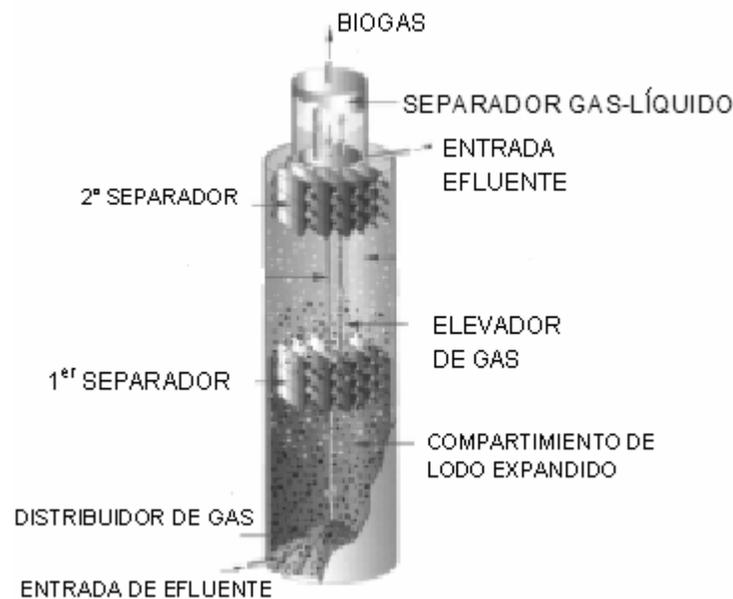


Figura 2.7. Esquema de un reactor de circulación interna

Fuente: [www.dedini.com.br/pt/imagens/efluente\\_04.jpg](http://www.dedini.com.br/pt/imagens/efluente_04.jpg)

## 2.2.3 Procesos con biopelículas fijas

### 2.2.3.1 Filtro percolador

Este sistema se ha considerado inferior a los de procesos en biomasa en suspensión por ser menos estricto en sus estándares. Sin embargo, su diseño y operación son aceptables para un tratamiento terciario como la nitrificación y potencialmente para remoción de fósforo. Los filtros percoladores actúan como camas de contacto. El agua residual es difundida mediante un difusor rotatorio sobre superficies circulares en un medio inerte con alto vacío (Fig. 2.8). Al pasar a través de la superficie, los compuestos

orgánicos coloidales y solubles en el agua son adsorbidos por una capa microbiana situada en la superficie del medio filtrante. El oxígeno requerido para la oxidación bioquímica es proporcionado por circulación natural o forzada a través de los espacios del medio. Entre sus desventajas destacan los altos costos de construcción y, dependiendo del diseño, pueden ser más sensibles al calor que los procesos convencionales de lodos activados (Henry y Heinke, 1996).

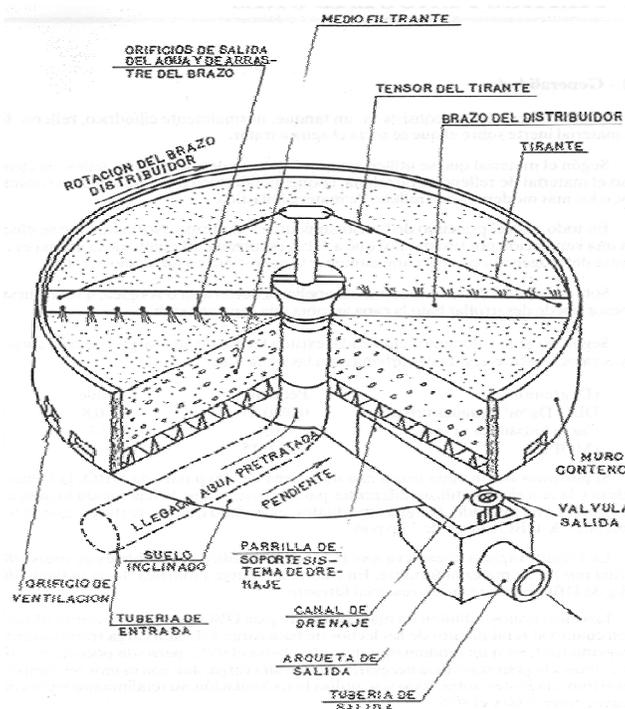


Figura 2.8. Esquema de un filtro percolador

Fuente: [www.miliarium.com/.../blandos/disenio6.gif](http://www.miliarium.com/.../blandos/disenio6.gif)

### 2.2.3.2 Contactor rotatorio

Consiste en una serie de discos de polietileno de alta densidad, de empaque cerrado y diámetros grandes, colocados en un eje horizontal con aproximadamente 40% de área superficial del medio sumergida en agua residual dentro un área de concreto (Fig. 2.9). El eje es rotado, ya sea mecánicamente o por burbujas de aire proveniente de una unidad de aireación, entre una a dos rpm. La capa de biomasa fija a la superficie de los

discos es puesta en contacto alternadamente con el agua residual para absorción de materia orgánica y con la atmósfera para proporcionar oxígeno (Henry y Heinke, 1996).

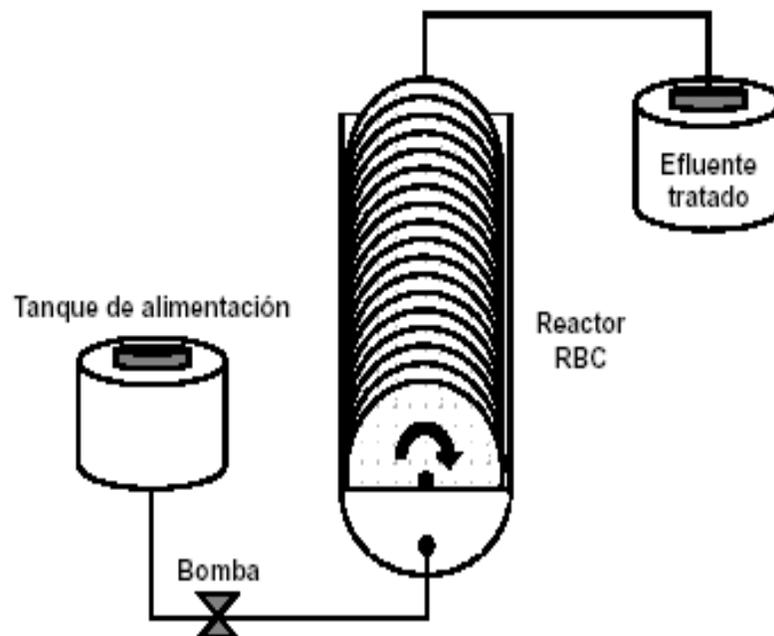


Figura 2.9. Esquema de un contactor rotatorio

Fuente: [www.serbi.luz.edu.ve/.../mc/v3n2/art\\_05img1.gif](http://www.serbi.luz.edu.ve/.../mc/v3n2/art_05img1.gif)

Para concluir esta sección, puede enfatizarse el uso de los reactores con biopelícula, debido a que presentan una mayor tolerancia hacia compuestos tóxicos como el fenol y a que son más compactos que los sistemas con biomasa en suspensión.

### 2.3 Tratamiento biológico de aguas residuales fenólicas

A continuación se presentan algunas aplicaciones del tratamiento biológico en aguas residuales fenólicas, con énfasis en la degradación de concentraciones elevadas (superiores a 500 mg/L) y asociadas a efectos tóxicos

### 2.3.1 Biodegradación de altas concentraciones de fenol por *Pseudomonas putida* MTCC 1194

Kumar *et al.* (2005) estudiaron la degradación biológica de fenol y pirocatecol por *Pseudomonas putida* (MTCC 1194) en un medio basal salino, en experimentos en matraces agitados a  $29.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$  y a un pH de aproximadamente 7.1. Esta cepa bacteriana se aclimató a concentraciones de 1000 y 500 mg/L de fenol y pirocatecol, respectivamente, durante un período de 3 meses. Entre más elevadas fueron las concentraciones de fenol y pirocatecol, el período de aclimatación fue más largo. El cultivo aclimatado de *P. putida* degradó el fenol y el pirocatecol presentes a concentraciones iniciales de 1000 y 500 mg/L en 162 y 94 h, respectivamente.

### 2.3.2 Biodegradación de altas concentraciones de fenol por *Candida tropicalis*

La especie de levadura *Candida tropicalis* fue aislada a partir de lodos activados aclimatados al fenol. Los resultados demostraron que *C. tropicalis* tiene una elevada tolerancia al fenol, el cual pudo ser degradado a una concentración inicial de 2000 mg/L en un medio mineral dentro de 66 h. El uso de un mayor nivel de inoculación disminuyó la toxicidad del fenol para las células e incrementó su velocidad de biodegradación (Yan *et al.*, 2005).

## 2.4 Tratamiento de aguas residuales con biomasa granular aerobia

Se han desarrollado reactores SBR para procesos aerobios, en los cuales la biomasa se autoadhiera en forma de gránulos. Por lo general, consisten en columnas de burbujeo en las que el agua residual se trata con aire en un ciclo de pocas horas. Al inicio de todos los ciclos se agrega una cantidad de agua residual al reactor y comienza la aireación y la conversión de la materia orgánica. Al final de cada ciclo, la aireación se

apaga y los gránulos sedimentan en pocos minutos, y posteriormente se retira el efluente clarificado (Beun *et al.*, 1999).

Los lodos granulares aerobios tienen numerosas ventajas, tales como una estructura microbiana regular, densa y fuerte; una buena capacidad de sedimentación, una gran retención de biomasa activa, y una elevada capacidad para tratar altas cargas de materia orgánica. Por lo anterior, los procesos granulares aerobios poseen un diseño compacto (Liu y Tay, 2004).

#### 2.4.1 Factores que afectan la granulación aerobia

La variedad de sustratos, incluyendo glucosa, acetato, etanol, fenol y agua residual doméstica es uno de los factores que afecta la formación de gránulos aerobios. La diversidad de las especies microbianas en los gránulos se asocia al tipo de fuente de carbono. Así los gránulos aerobios alimentados con glucosa presentan una estructura filamentosa, mientras que los suministrados con acetato tienen estructuras compactas en las cuales predominan especies con forma esférica. Los gránulos aerobios también han sido cultivados con bacterias nitrificantes a partir de carbono inorgánico (Liu y Tay, 2004).

En diferentes estudios se han empleado un amplio rango de cargas orgánicas, que van desde 2.5 a 15 kg DQO/m<sup>3</sup>.d. Aunque el efecto de carga orgánica sobre la formación de los gránulos aerobios es insignificante, las características físicas de los gránulos aerobios sí dependen de ésta (Liu y Tay, 2004).

Una gran fuerza mecánica (*shear force*) favorece la formación y la estabilidad de los gránulos aerobios, ya que pueden formarse sólo cuando esta fuerza, en términos de la velocidad superficial de aire ( $V_s$ ) se encuentra por encima de 1.2 cm/s en el SBR. Esto permite cultivar gránulos aerobios más regulares, redondos y compactos (Liu y Tay, 2004).

El periodo de aireación consiste en dos fases: una fase de degradación, en la cual el sustrato se consume hasta agotarse, seguida por una fase de inanición aerobia, en la cual las bacterias subsisten sólo a partir de sus reservas. Bajo condiciones de inanición, las bacterias se vuelven más hidrofóbicas, lo cual facilita la adhesión microbiana. Los microorganismos son capaces de modificar las características de su superficie cuando se afrontan a la inanición (Liu y Tay, 2004). La inanición periódica tiene un efecto profundo sobre las células hidrofóbicas, lo cual es un factor clave en la granulación aerobia. Liu *et al.* (2003); Tay *et al.* (2001a) encontraron que la hidrofobicidad de la superficie de las células estaba proporcionalmente relacionada a la duración del periodo de inanición en el SBR.

Por otra parte, la elección de un tiempo de sedimentación óptimo es muy importante. Generalmente, los gránulos aerobios maduros tienden a sedimentar en un minuto, dejando un sobrenadante claro en el reactor. Los gránulos con excelentes propiedades de sedimentación son esenciales para el funcionamiento efectivo de un sistema biológico de tratamiento de aguas residuales (Liu y Tay, 2004).

El tiempo de retención hidráulico se define como el volumen de efluente descargado, dividido por el volumen de trabajo del SBR. Un ciclo con un TRH corto podría suprimir el crecimiento de sólidos suspendidos, debido al frecuente lavado de material suspendido. Si los ciclos del SBR son demasiado cortos, se observa la pérdida de lodos a través del lavado hidráulico debido a que el crecimiento bacteriano ha sido incapaz de compensarlo. Así, el TRH debe ser bastante corto para suprimir el crecimiento de lodo suspendido, pero lo suficientemente largo para permitir el crecimiento y la acumulación microbiana (Liu y Tay, 2004).

Jiang *et al.* (2003) reportaron que la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  aceleraba el proceso de agregación microbiana. El  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó la formación de los gránulos aerobios, los cuales mostraron mejores características de fuerza, sedimentación y un alto contenido de polisacáridos. Se ha propuesto que el  $\text{Ca}^{2+}$  une los grupos cargados negativamente que se encuentran en la superficie bacteriana y las moléculas de polisacáridos

extracelulares, actuando de esta manera como un puente para promover la agregación bacteriana.

En la mayoría de los casos reportados, los gránulos aerobios se producen en reactores de columna de flujo ascendente de aire. La configuración de los reactores tiene un impacto sobre el diseño del flujo del líquido y la forma de los agregados microbianos en el reactor. El aire ascendente en los reactores de columna pueden crear un flujo relativamente homogéneo y localizado en la zona de mezclado a lo largo de los ejes del reactor, de modo que los agregados microbianos están constantemente sujetos a una fuerza mecánica hidráulica. El flujo circular aparentemente fuerza a los agregados microbianos a adaptarse a una forma granular regular con un mínimo de energía libre. Un reactor de columna tipo flujo ascendente con una razón altura/diámetro elevada (H/D) asegura una gran trayectoria de flujo circular, y una forma regular de los agregados microbianos (Liu y Tay, 2004).

#### 2.4.2 Características de los gránulos

Los gránulos aerobios son conocidos por (i) su fuerte y densa estructura microbiana; (ii) una apariencia redonda, lisa, regular y una superficie exterior definida; (iii) ser entidades individuales visibles, durante las fases de mezclado y sedimentación; (iv) tener una elevada retención de biomasa y una excelente sedimentación; (v) soportar caudales importantes; (vi) resistir elevadas velocidades de carga orgánica; y (vii) ser menos vulnerables que los lodos suspendidos a la toxicidad de químicos orgánicos y metales pesados en aguas residuales. La excelente sedimentación de los gránulos aerobios simplifica la separación del efluente tratado de los lodos granulares (Liu y Tay, 2004).

El examen microscópico muestra que la morfología de los lodos granulares aerobios es completamente distinta a la de los lodos floculares. El aspecto de los gránulos es casi esférico, con una silueta muy clara. El tamaño del gránulo es un parámetro importante

en la caracterización de la granulación aerobia. El diámetro promedio de los gránulos aerobios varía en un rango de 0.2 a 5.0 mm (Liu y Tay, 2004).

### 2.4.3 Estructura y diversidad microbiana

Estudiar la estructura y diversidad microbiana en los tratamientos de aguas residuales es esencial para un mejor entendimiento de las comunidades microbianas.

#### 2.4.3.1 Estructura microbiana

Para el estudio de la microestructura de los gránulos aerobios, se han utilizado microscopios confocales láser de barrido, con diferentes sondas de oligonucleótidos, fluorocromos específicos y microesferas fluorescentes. Las bacterias nitrificantes aerobias del género *Nitrosomonas* se encontraron principalmente a una profundidad de 70 a 100  $\mu\text{m}$  de la superficie del gránulo. Los gránulos aerobios contenían canales y poros que penetraban a una profundidad de 900  $\mu\text{m}$  bajo la superficie del gránulo. La porosidad máxima se encontró a profundidades de 300 a 500  $\mu\text{m}$  de la superficie del gránulo (Tay *et al.*, 2002, 2003). Estos canales y poros podrían facilitar el transporte de nutrientes y oxígeno al interior y de metabolitos al exterior de los gránulos. La formación máxima de polisacáridos se da a una profundidad de 400  $\mu\text{m}$  bajo la superficie del gránulo, mientras que a una profundidad de 800 a 1000  $\mu\text{m}$  se localiza una capa de células muertas (Fig. 2.10). Para optimizar su actividad, el diámetro de los gránulos aerobios debería ser menor a 1600  $\mu\text{m}$ , el cual es dos veces la distancia de la superficie del gránulo a la capa anaerobia. Consecuentemente, los gránulos pequeños serán más efectivos para el tratamiento de aguas residuales, ya que tienen más células vivas en un volumen determinado de gránulos (Liu y Tay, 2004).

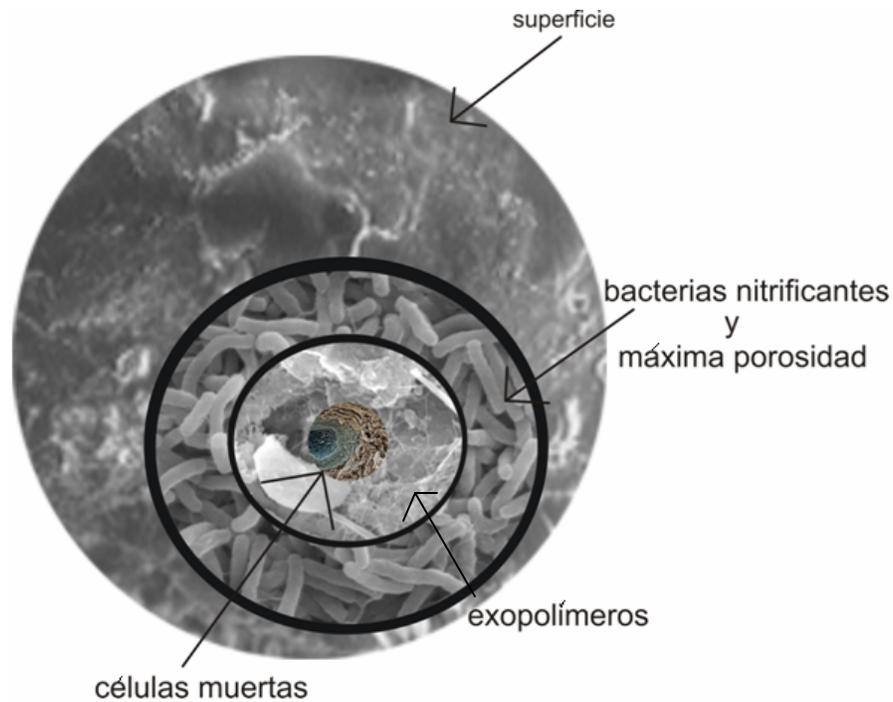


Fig. 2.10. Recreación de la estructura microbiana de un gránulo aerobio

#### 2.4.3.2 *Diversidad microbiana*

La diversidad microbiana de los gránulos aerobios se ha estudiado por técnicas de biología molecular. Se han identificado bacterias heterótrofas, nitrificantes, desnitrificantes, acumuladoras de fósforo y glucógeno, en gránulos aerobios desarrollados bajo diferentes condiciones. La diversidad microbiana está íntimamente relacionada con la composición del medio en el cual se desarrollaron y estructuraron los gránulos aerobios (Liu y Tay, 2004).

#### 2.4.4 Mecanismos de granulación aerobia

Liu y Tay (2002) propusieron un modelo para la granulación aerobia, que consiste en las siguientes etapas:

- a) **Etapa 1:** Movimientos físicos iniciadores del contacto bacteria-bacteria. Los factores involucrados en esta etapa son la hidrodinámica, la difusión de la transferencia de masa, la gravedad, efectos termodinámicos y la movilidad celular.
  
- b) **Etapa 2:** Estabilidad de los contactos multicelulares resultado de las fuerzas de atracción iniciales. Estas fuerzas de atracción son físicas (*i. e.* fuerzas de Van der Waals, atracción de cargas opuestas, tensión superficial, hidrofobicidad, bacterias filamentosas que pueden formar puentes individuales celulares), fuerzas químicas y fuerzas bioquímicas, incluyendo deshidratación de la superficie celular, fusión de las membranas celulares, señalamientos y acciones colectivas en la comunidad bacteriana.
  
- c) **Etapa 3:** Maduración de los agregados celulares a través de la producción de polímeros extracelulares, crecimiento de racimos (grupos) celulares, cambios metabólicos, efectos genéticos inducidos en el ambiente que facilitan la interacción célula-célula y que resultan en una elevada organización estructural microbiana.
  
- d) **Etapa 4:** La formación de un estado tridimensional estable de la estructura de los agregados microbianos por fuerzas mecánicas hidrodinámicas (Liu y Tay, 2004).

La hidrofobicidad de la superficie celular puede jugar un papel crucial en la iniciación de la granulación aerobia. De acuerdo a las teorías hidrodinámicas, un incremento en dicho factor podría causar un decremento en el exceso de energía de Gibbs de la superficie y promover las interacciones célula-célula, para posteriormente dirigir la agregación de las bacterias dentro del líquido suspendido (fase hidrofóbica). Los enlaces hidrofóbicos son considerados de primordial importancia para enlaces célula-

célula. Una gran hidrofobicidad celular podría resultar de una fuerte interacción célula-célula y en la formación de una estructura densa (Liu y Tay, 2004).

Los polisacáridos extracelulares pueden intervenir tanto por cohesión como por adhesión de células y juegan un papel crucial en el mantenimiento de la integridad estructural en una comunidad de células inmobilizadas. El contenido de los polisacáridos de los gránulos aerobios tiende a ser mucho mayor que el de los flóculos (Liu y Tay, 2004). Los polisacáridos celulares también contribuyen enormemente a la granulación aerobia. Qin *et al.* (2004) observaron que los gránulos aerobios se cultivaron exitosamente en SBR que operaron con un tiempo de sedimentación menor a 15 minutos. En el corto tiempo de sedimentación la producción de una cantidad de polisacáridos celulares fue mayor.

Aunque se han desarrollado mecanismos y modelos para la granulación aerobia, no existe un esquema completo del proceso de granulación aerobio. Se sabe que tanto la comunicación intercelular como la coordinación multicelular contribuyen a la organización de las bacterias dentro de las estructuras espaciales. El *Quorum sensing* ha mostrado ser un ejemplo del comportamiento social en las bacterias, una especie de intercambio de señales entre las células individuales que lleva a la población entera a elegir un camino óptimo de interacción con el ambiente (Liu y Tay, 2004).

#### 2.4.5 Tratamiento de aguas residuales fenólicas con biomasa granular aerobia

Los lodos granulares aerobios son menos susceptibles a la toxicidad del fenol, ya que la mayor parte de la biomasa en los gránulos no está directamente expuesta a las altas concentraciones de fenol presentes en el agua residual. Por tal motivo, los gránulos aerobios han demostrado una excelente capacidad para degradar fenol. Para un influente con concentraciones de fenol de 500 mg/L pueden diseñarse sistemas granulares aerobios compactos con elevadas velocidades de carga y altas concentraciones de fenol. Así mismo, los gránulos aerobios constituyen poderosos

bioagentes de remoción de otros compuestos orgánicos y tóxicos inhibitorios procedentes de aguas residuales industriales de alta carga, así como de metales pesados (Liu y Tay, 2004).

#### 2.4.6 Cultivo de gránulos aerobios degradadores de fenol utilizando gránulos alimentados con acetato como inóculo

Tay *et al.* (2005) estudiaron la posibilidad de usar gránulos aerobios alimentados con acetato para desarrollar rápidamente gránulos degradadores de fenol. Los gránulos fueron primeramente cultivados en cuatro reactores secuenciales con acetato como la única fuente de carbono, a una carga volumétrica aplicada (CVA) de  $3.8 \text{ kg/m}^3\text{d}$ . Posteriormente se agregó el fenol a los reactores a CVA de 0, 0.6, 1.2 y  $2.4 \text{ kg/m}^3\text{d}$ . Los gránulos se aclimataron rápidamente a todas las cargas de fenol y se estabilizaron una semana después que el fenol fue introducido. Los gránulos presentaron una buena actividad metabólica, como se evidenció por sus altas velocidades de sedimentación, su estabilidad y las buenas eficiencias de remoción del acetato y fenol. No hubo efectos inhibidores por parte del fenol en las cargas intermedias de 0.6 y  $1.2 \text{ kg/m}^3\text{d}$ , excepto por una breve fase de latencia antes del inicio de la degradación del fenol durante los primeros ciclos. A la carga más elevada de  $2.4 \text{ kg/m}^3\text{d}$ , se observó una ligera acumulación de fenol debido a que los gránulos inicialmente fueron incapaces de degradar el fenol. Sin embargo, esta acumulación se disipó rápidamente, mientras los gránulos se adaptaron a las altas concentraciones de fenol. La estructura compacta de los gránulos parecía proteger a los microorganismos de la toxicidad del fenol y facilitó la aclimatación microbiana a las CVA mayores de fenol.

#### 2.4.7 Tratamiento anóxico de aguas residuales fenólicas en un reactor granular de alimentación secuenciada

Tradicionalmente, las aguas residuales fenólicas han sido tratadas mediante procesos biológicos aerobios. Sin embargo, sus altos requerimientos energéticos y su excesiva producción de biomasa han conducido a la implementación de procesos anaerobios, principalmente en condiciones metanogénicas.

Sarfaraz *et al.* (2004) estudiaron la remoción anóxica del fenol usando lodos granulares desnitrificantes en un reactor de alimentación secuenciada a diferentes concentraciones de fenol. Los resultados demostraron que fue posible tratar una concentración de fenol de 1050 mg/L en ciclos de 6 h, que correspondió a una CVA de 6.4 kg DQO/m<sup>3</sup>-d. Los resultados de este estudio demostraron que los gránulos anóxicos pudieron desarrollarse fácilmente y ser mantenidos durante un largo tiempo sin pérdida de su actividad. Así mismo, se lograron eficiencias de remoción de fenol y de nitratos superiores al 80%.

#### 2.4.8 Las sustancias poliméricas extracelulares

Las sustancias exopoliméricas celulares (EPS) cuya abreviatura ha sido empleada para designar polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos, se definen como sustancias de origen biológico que participan en la formación de agregados microbianos y que juegan un papel importante en el control de la floculación (Bura *et al.*, 1998; Wingender *et al.*, 1999). Sin embargo, los EPS son una matriz rica de polímeros que incluye polisacáridos, proteínas, glucoproteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos y ácidos húmicos. Los EPS también se han asociado con la protección de asociados microbianos contra condiciones ambientales nocivas del ambiente (Wingender *et al.*, 1999).

Algunos reportes sugieren que en las biopelículas, los EPS interactúan con agentes antimicrobianos y protegen a las células, previniendo el acceso de ciertos compuestos o bien reduciendo su concentración. Sin embargo, los efectos de protección probablemente son limitados (Sutherland, 2001).

#### 2.4.8.1 *Las sustancias poliméricas extracelulares en gránulos aerobios*

Los EPS son cruciales en la construcción y mantenimiento de la estructura de los gránulos a través de la cohesión y adhesión de células microbianas (Morgan *et al.*, 1990). Los polisacáridos juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de gránulos aerobios, ya que forman un fuerte, pegajoso e indeformable gel polimérico, semejante a una matriz.

Quarmby y Forster (1995) reportaron una débil estructura granular cuando los gránulos eran deficientes en EPS. Tay *et al.* (2001b) encontraron que la estabilidad de los gránulos aerobios se relaciona con la producción de polisacáridos extracelulares. El incremento en la producción de polisacáridos extracelulares a fuerzas mecánicas elevadas puede contribuir a que la estructura de los gránulos sea más fuerte y más compacta.

Después de un calentamiento a 80°C en presencia de NaOH o con el uso de una resina de intercambio catiónico para extraer los EPS de los gránulos, Tay *et al.* (2001a) y Wang *et al.* (2005) concluyeron que el aumento de la fuerza mecánica hidrodinámica incrementa la producción de polisacáridos en gránulos aerobios.

McSwain *et al.* (2005) concluyen que las proteínas, más que los polisacáridos, enriquecen el gránulo y notan además un exceso de proteínas en el centro del gránulo. Según Adav *et al.* (2008), son las proteínas las que mantienen con integridad a los gránulos aerobios sometidos a una fuerza mecánica.

# ***PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN***

---

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

#### 3.1 Planteamiento del problema

El fenol es un contaminante encontrado frecuentemente en aguas residuales industriales, cuya remoción es de gran interés. Los tratamientos biológicos son preferidos generalmente a los métodos fisicoquímicos por sus bajos costos y por permitir una mineralización completa. Sin embargo, los sistemas convencionales tales como los de lodos activados son conocidos por su sensibilidad a las concentraciones elevadas de fenol.

La granulación aerobia es una nueva forma de tecnología de autoinmovilización microbiana que ha resultado atractiva para el tratamiento de aguas residuales industriales. Por lo anterior, en este estudio se pretende probar la eficiencia del sistema en el tratamiento de aguas fenólicas. Para esto, es necesario obtener gránulos capaces de degradar fenol y estudiar la cinética de degradación, así como el efecto de la aclimatación sobre la producción de EPS.

#### 3.2 Justificación

Al fenol se le considera una molécula tóxica que es necesario eliminar de las aguas residuales de las industrias, ya que su destino son cuerpos acuáticos que podrían verse afectados por este compuesto. Los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua indican que una concentración mayor de 0.1 mg/L sería dañina para la vida acuática. Por tal motivo, se necesita un sistema eficiente capaz de remover totalmente el fenol de estas aguas residuales.

# ***OBJETIVOS***

---

---

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Remover el fenol presente en aguas residuales utilizando un reactor discontinuo de alimentación secuenciada con biomasa granular aerobia.

### 4.2 Objetivos específicos

- Obtener una población microbiana granular a partir de lodos activados utilizando etanol como fuente de carbono.
- Aclimatar gradualmente la población microbiana obtenida a 700 mg/L de fenol.
- Estudiar la cinética de degradación de fenol por parte de poblaciones aclimatadas a diferentes concentraciones de este compuesto.
- Analizar el efecto de las distintas concentraciones de fenol sobre la producción de sustancias poliméricas extracelulares.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Instalación e instrumentación del reactor

Se utilizó un reactor discontinuo de alimentación secuenciada (Fig. 5.1), cuya configuración se basa en el diseño de Beun *et al.* (1999).

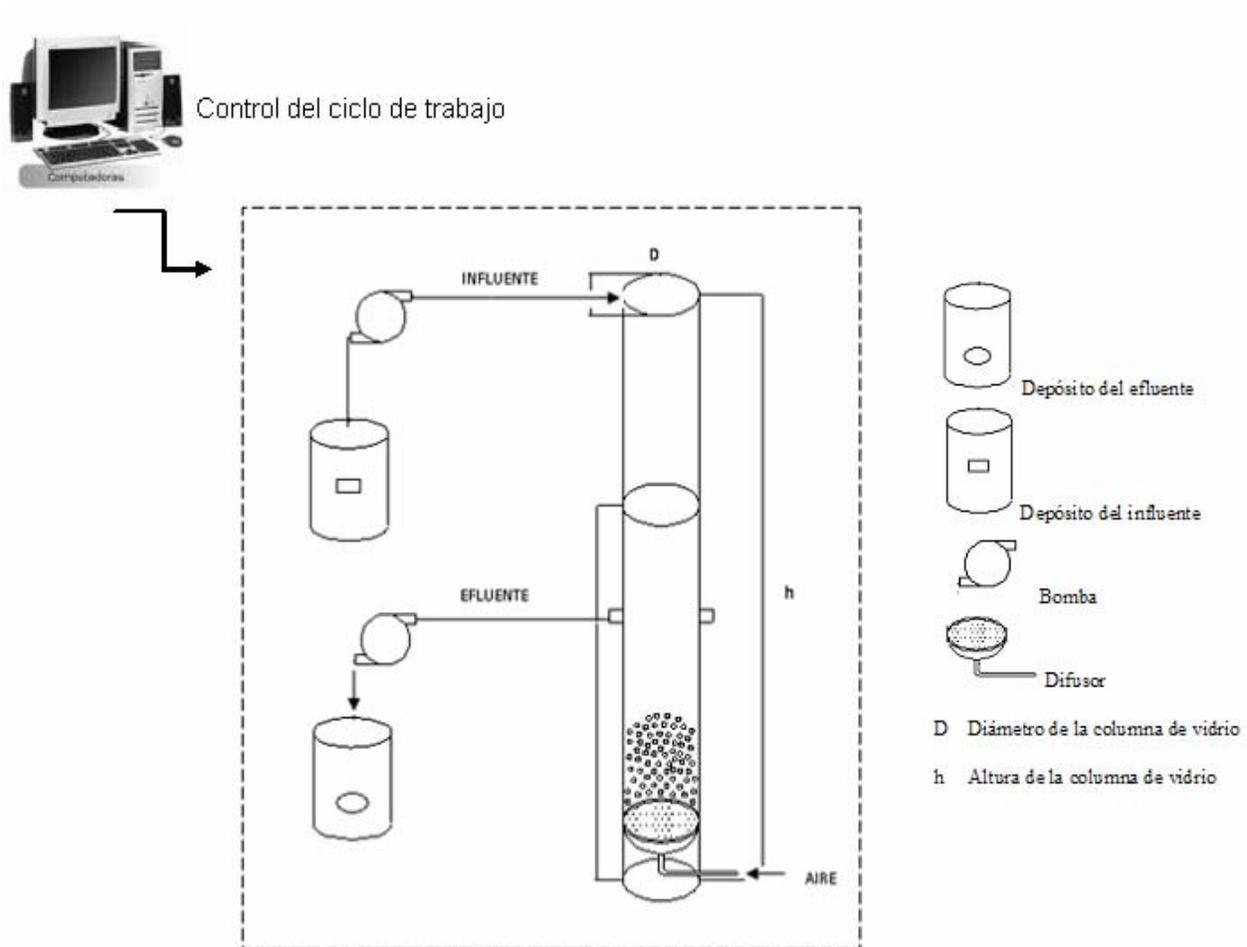


Figura 5.1. Esquema del SBR granular

Este reactor consiste en una columna de vidrio con una elevada relación altura/diámetro (147cm/5.4 cm). El volumen nominal del reactor fue de 3.37 L y el de trabajo fue de 2.1

L. En éste, el agua fenólica fue tratada en ciclos de 3 horas, divididos en diferentes operaciones, como se muestra en la tabla 5.1.

Al inicio de cada ciclo se adiciona el agua residual fenólica por la parte superior del reactor y se inicia la aireación. El aire es introducido por un difusor de burbujas situado en la base del reactor; para dosificar su entrada, se contó con un medidor volumétrico de flujo de aire, con lo que se obtuvieron flujos comprendidos entre 4 y 5 L/min. Este caudal de aire es suficiente para garantizar una mezcla completa dentro del reactor. Cuando termina el ciclo, la aireación se detiene y empieza la sedimentación; finalmente, el efluente tratado es extraído por la parte media del reactor. El proceso se desarrolló a temperatura ambiente.

Tabla 5.1. Etapas de operación del reactor

<b>Etapas</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Alimentación	2
Aireación	171
Sedimentación	5
Extracción	2

Para reactores discontinuos alimentados, el caudal de agua residual tratada ( $Q_0$ , L/h) se calcula de la siguiente manera:

$$Q_0 = \frac{\left[1 - \frac{1}{n}\right]V}{t_c} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

donde:

V: Volumen de trabajo del reactor, L

$t_c$ : Duración del ciclo, h

$\frac{1}{n}$ : Fracción del volumen de agua alimentado que permanece en el reactor al final de cada ciclo.

Así, la razón de intercambio volumétrico es  $1 - \frac{1}{n}$ . El tiempo de retención hidráulico (TRH) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{TRH} = \frac{V}{Q_0} \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

En cuanto a la carga volumétrica aplicada (CVA), ésta se calcula de la siguiente manera:

$$\text{CVA} = \frac{S_0 \cdot Q_0}{V} \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

Donde:

$S_{0\text{inf}}$ : Concentración de fenol en el influente

Para adicionar y retirar el agua automáticamente se utilizaron bombas peristálticas Masterflex, las cuales fueron operadas desde una computadora provista de una interfaz gráfica (Figura 5.2). Esto se hizo gracias a la colaboración de alumnos e investigadores del CITIS-UAEH. Estas bombas fueron operadas por una tarjeta *National Instruments* NI6024-E que cuenta con salidas análogas y digitales, que se programó con el software Labview 7.1 (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench; National Instruments, E.U.A.*). La interfaz gráfica cuenta con un panel de control que ayuda a programar la duración de las etapas del ciclo de trabajo del reactor.

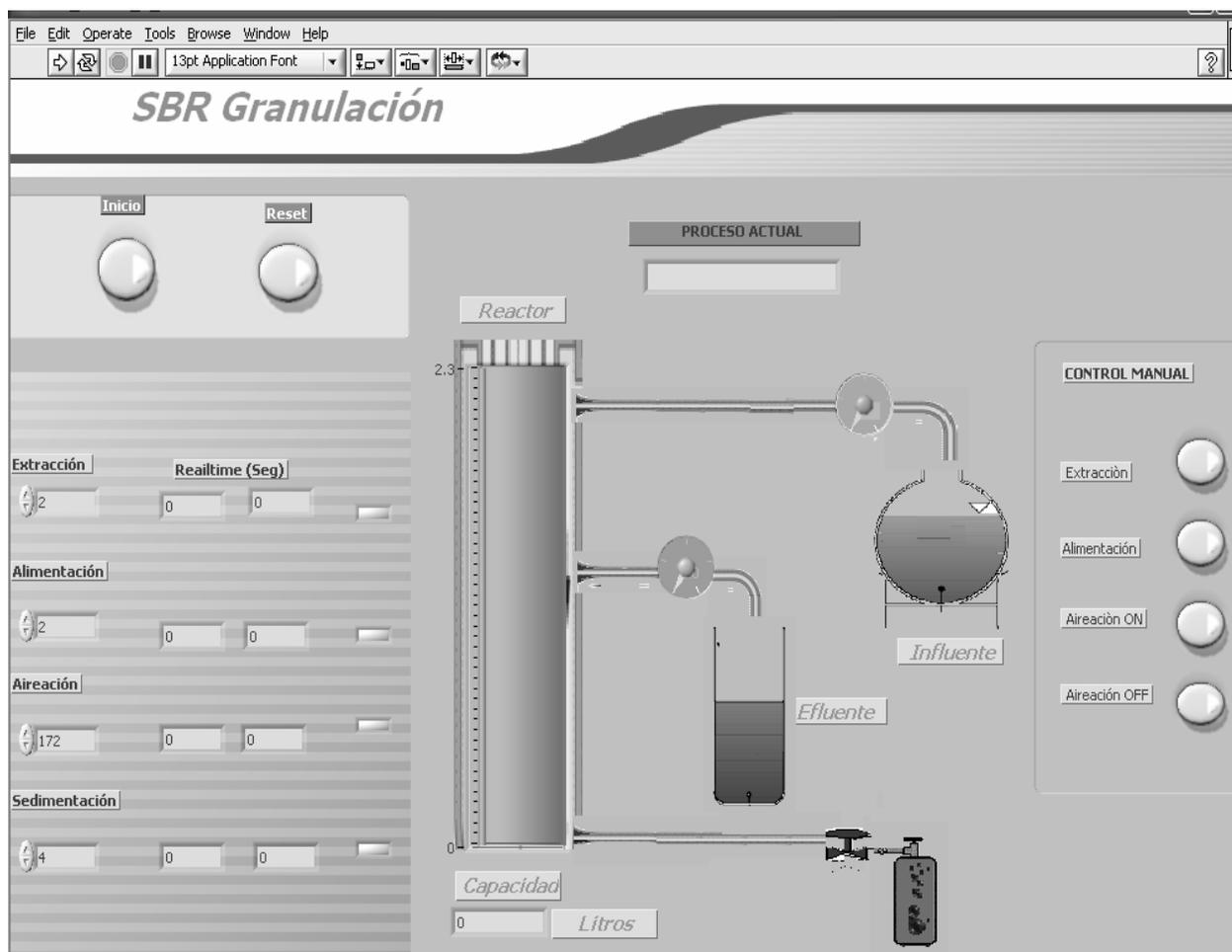


Figura 5.2 Panel de control del reactor SBR

## 5.2 Obtención de gránulos aerobios

### 5.2.1 Inóculo

Para obtener los gránulos, el SBR se inoculó con un volumen de 200 mL de sobrenadante de lodos activados obtenidos a partir de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Hidalgo.

## 5.2.2 Medio de cultivo

El reactor se alimentó con agua residual sintética que sirvió como medio de cultivo, el cual se basó en el utilizado por Beun *et al.* (1999). La composición del medio se muestra en las tablas 5.4 y 5.5.

Tabla 5.4. Composición del agua residual sintética

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
Etanol	0.40 g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0.16 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.58 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.23 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.09 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.07 g/L
EDTA	0.02 g/L
Solución de elementos traza	1 mL/L

Tabla 5.5. Composición de la solución de elementos traza

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.50 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.15 g/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.03 g/L
KI	0.03 g/L
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.12 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.06 g/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.12 g/L
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.15 g/L

Para la aclimatación de los gránulos, se adicionaron diferentes concentraciones de fenol (100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 mg/L). Después de cada aumento en la concentración de fenol, se observó si los gránulos eran resistentes. Esto se analizó: tomando muestras diarias de entrada y de salida del ciclo, además observando si a esa concentración se veía una disminución en el volumen de la biomasa

### **5.3 Cultivos en matraces agitados**

Con la finalidad de estudiar la cinética de degradación del fenol, se llevaron a cabo cultivos en matraces agitados de 1 litro provistos de baffles (120 rpm) en baño María a una temperatura de 25°C. Cada uno de los matraces contenía 400 mL de medio sin etanol y alrededor de 2 g de biomasa granular aerobia (peso seco). Las concentraciones de fenol iniciales variaron entre 50 y 1250 mg/L.

### **5.4 Métodos analíticos**

#### 5.4.1 Análisis de la biomasa

##### *5.4.1.1 Determinación de sólidos suspendidos totales (SST)*

La biomasa se determinó como sólidos suspendidos totales (SST) empleando el método estándar 2540.D de la APHA (1989). En este método, se pone en cápsulas de porcelana (a peso constante) un volumen conocido de gránulos (5 mL). Estos se llevan a sequedad en la estufa a 105°C durante 12 horas. Posteriormente se registra el peso y la diferencia se reporta como la cantidad de SST.

##### *5.4.1.2 Determinación de sólidos suspendidos volátiles (SSV)*

La biomasa como sólidos suspendidos volátiles se determinó mediante el método estándar 2540.E de la APHA (1989). En una cápsula de porcelana de peso conocido

(previamente limpiada por ignición en una mufla a 550 °C durante una hora y después llevada al desecador) se agregan 5 mL de muestra de gránulos y se lleva a una mufla a 550°C durante una hora. Luego, la cápsula se deja enfriar, se lleva al desecador y por último se registra su peso. La diferencia de peso de la cápsula con la muestra y la cápsula sola indica la cantidad de SSV.

#### 5.4.1.3 *Microscopía electrónica de barrido*

Este análisis se llevó a cabo en el Laboratorio de Usos Múltiples de la UAEH empleando un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-6300, Japón). Las muestras de gránulos se recubren con oro en una evaporadora (Dentum Vacuum, DESK II, E.U.A) durante un tiempo de 2 min a una presión de 20 millitorrers. La muestra se coloca en un soporte y en el monitor se puede observar la imagen a distintas resoluciones según sea requerido.

#### 5.4.2 Determinación de la concentración de fenol

##### 5.4.2.1 *Método de la 4-aminoantipirina*

El fenol se determinó por el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina descrito por Woolard e Irvine (1995). En un tubo de vidrio de 10 mL se colocan 2 mL de muestra previamente centrifugada. A ésta se le agregan 0.2 mL de  $K_3Fe(CN)_6$  al 5% (m/v), mezclando y dejando reaccionar por 5 minutos. Pasado este tiempo, se agregan 2 mL de reactivo de 4-aminoantipirina al 0.25%, que se disuelve en una solución tampón de glicina (ésta se prepara por disolución de 5.58 g de hidrocloreuro de glicina y de 3.75 g de glicina en agua destilada, ajustando el pH a 9.7 con una solución de NaOH 6N para un volumen final de 1 L). Esta mezcla se agita y se deja reaccionar por 20 min. Por último, se mide la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys 10vis Termo Electron Co., E. U. A.) a 506 nm en un periodo inferior a 30 minutos. Para obtener la

concentración de fenol, el resultado se compara con una curva de calibración de un rango de 0-25 mg/L, como se muestra en la figura 5.3.

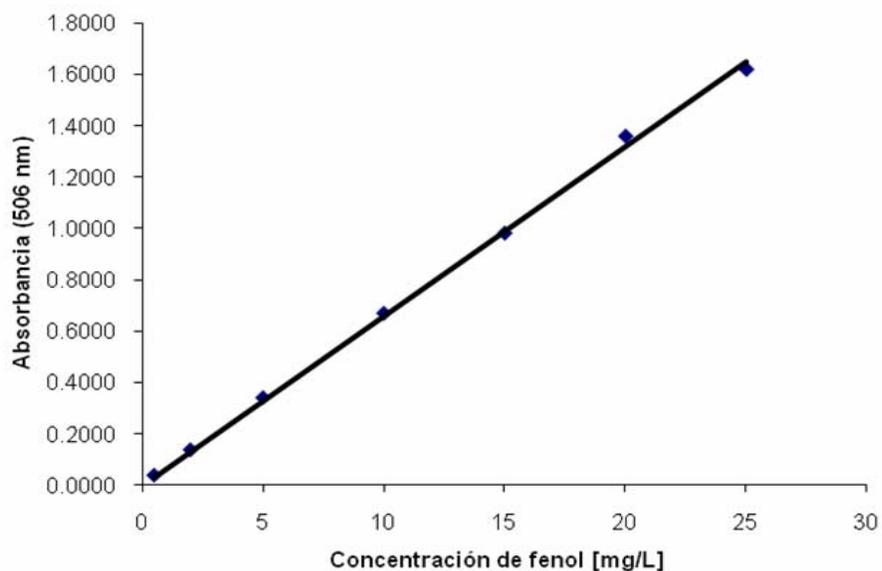


Figura 5.3. Curva de calibración para la determinación de fenol por el método de la 4-aminoantipirina

#### 5.4.2.2 Método espectrofotométrico UV

Este método se utiliza como una forma rápida para la cuantificación de fenol, e implica la determinación de las absorbancias de las muestras (centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min) a 269 nm (Ramírez-Cerón, 2005) utilizando un espectrofotómetro Lambda 40 UV-VIS (Perkin Elmer, E.U.A.). Mediante la comparación de las absorbancias con una curva de calibración, se obtienen las concentraciones de fenol (inferiores a 100 mg/L).

### 5.4.3 Análisis de exopolímeros

#### 5.4.3.1 Determinación de polisacáridos

Para determinar la concentración de polisacáridos en los gránulos se empleó el método descrito por Rosenberg (2003), que es una modificación de Dubois *et al.* (1956). En un tubo de 15 mL se mezclan 0.1 g de gránulos húmedos con 4 mL de agua destilada y se les adiciona 1 mL de NaOH (20% m/v). La suspensión se calienta a 100°C durante 5 min y se le adicionan 2 mL de solución de fenol (5%) y 10 mL de ácido sulfúrico (95-97%). Después de 10 min a temperatura ambiente, se agita la mezcla y pasados 30 min se mide la longitud de onda a 487 nm empleando agua destilada como blanco. La cantidad de polisacáridos se puede determinar usando una curva de calibración con D(+)-glucosa (J.T. Baker, E.U.A.), en un rango de 0-100 mg/L (Figura 5.4).

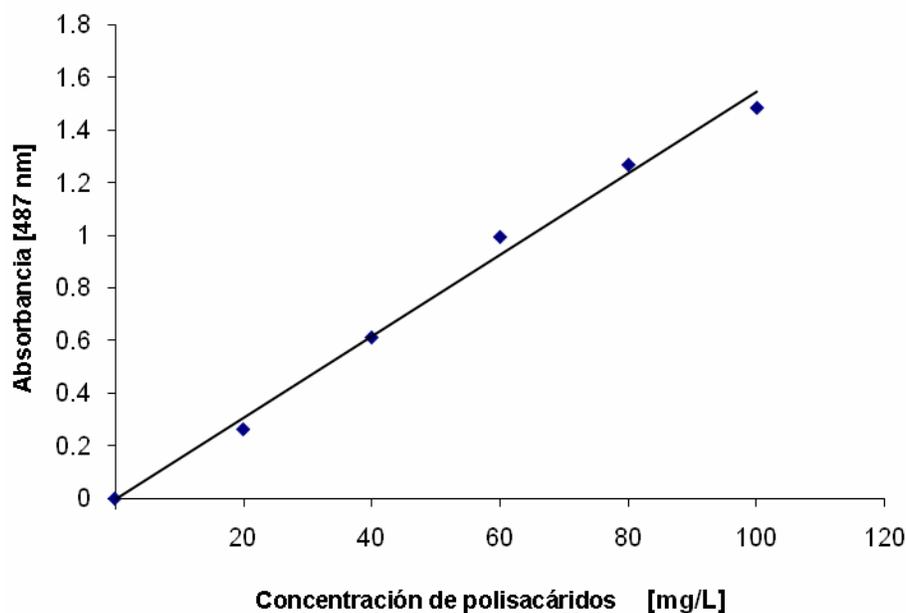


Figura 5.4. Curva de calibración para la determinación de polisacáridos

### 5.4.3.2 Determinación de proteínas

El análisis de proteínas se realizó por el método de Biuret (Herbert *et al.*, 1971). En un tubo de 5 mL se colocan 0.5 g de gránulos húmedos, 2 mL de agua destilada y 1 mL de NaOH (20% m/v), para posteriormente calentar a 100°C durante 5 min. Los tubos se enfrían con agua y se adicionan 0.167 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (2.5% m/v). La mezcla se agita rápidamente con un aparato vortex (Labnet, VX 100). Después de 5 minutos, la muestra se centrifuga y se decanta. El sobrenadante se lee a una longitud de onda de 560 nm (en un espectrofotómetro), en un lapso no mayor a 60 min después de haber agregado el  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , en un espectrofotómetro. La cantidad de proteínas se puede determinar usando una curva de calibración (Fig. 5.5) con albúmina de huevo como proteína, en un rango de concentración de 0-10 mg de proteína/mL.

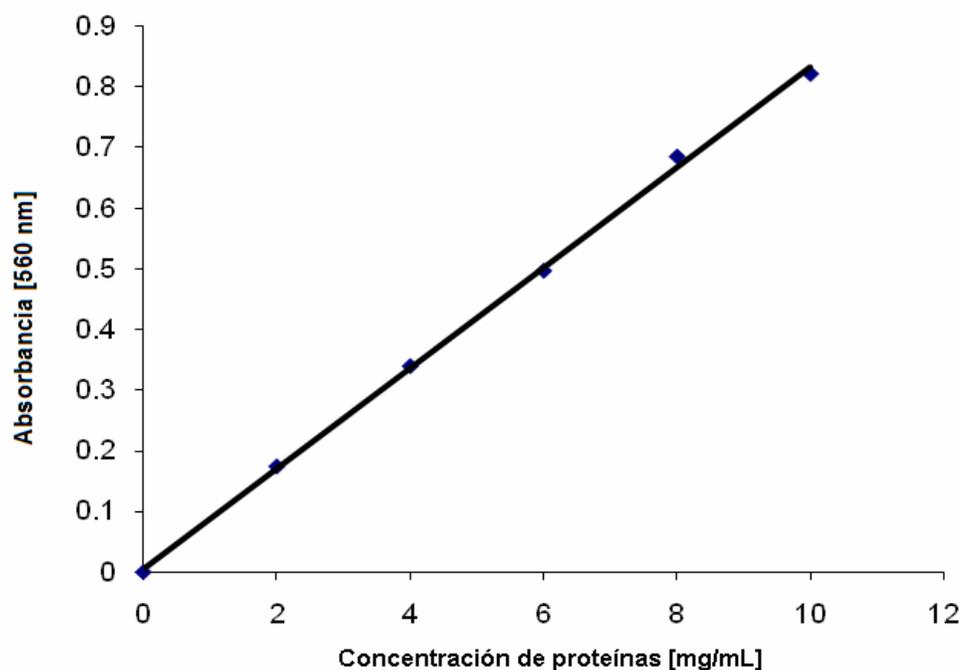


Figura 5.5. Curva de calibración para la determinación de proteínas

#### 5.4.4 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

Para la determinación de la demanda química de oxígeno se utilizó el micrométodo 5220 D de la EPA (APHA, 1989). En un tubo de vidrio de 16 x 100 mm se colocan 2.5 mL de muestra, a los que se agregan 3.5 mL de solución de  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  (10.142 g de  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  en un litro de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y 1.5 mL de solución digestora. La solución digestora se prepara disolviendo 10.216 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (previamente secado a  $105^\circ\text{C}$  durante 2 h) en 500 mL de agua destilada. Por separado, se disuelven 33.3 g de  $\text{HgSO}_4$  en 167 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Ambas soluciones se mezclan con suficiente agitación, y se aforan a 1 L.

Los tubos de vidrio se cierran bien y se agitan, para luego llevarse a un bloque de calentamiento (COD Reactor 45600, Hach Co., E.U.A.) a  $105^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Al término de este tiempo se dejan enfriar y reposar, para leer la absorbancia al día siguiente en un espectrofotómetro (se utilizó un Genesys 10vis, Termo Electron Co., E. U. A.) a 600 nm. Los valores de DQO se obtienen por comparación con una curva de calibración de biftalato de potasio en un rango de 0-700 mg/L de DQO.

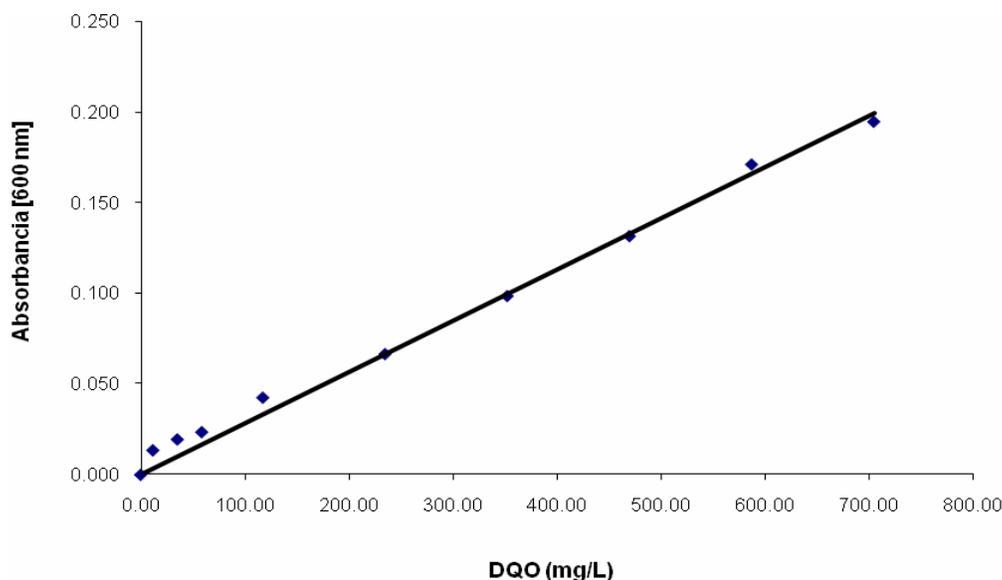


Figura 5.6. Curva de calibración para la determinación de la demanda química de oxígeno

#### 5.4.5 Determinación de la concentración de metabolitos intermediarios

Para la determinación del metabolito intermediario de la degradación de fenol (semialdehído ácido 2-hidroximucónico, 2-HMAS), se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 375 nm. La concentración del 2-HMAS se calculó empleando la ley de Lambert-Beer y un coeficiente de absorptividad molar de 33000 L/mol·cm (Mörsen y Rehm, 1990).

# ***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

---

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Granulación aerobia a partir de inóculos de lodos activados

La instalación del reactor se llevó a cabo como se muestra en la sección 5.1. El agua residual sintética que se empleó contenía etanol como única fuente de carbono y de energía (Tablas 5.4 y 5.5). Como inóculo, se utilizaron 200 mL de sobrenadante de lodos activados sin aclimatar. El reactor se operó según el ciclo de trabajo descrito en la tabla 5.1.

A los 7 días de operación se observó en el reactor un color verdoso y un abundante crecimiento de biomasa en suspensión. Sin embargo, después de 15 días de operación inició la formación de los primeros gránulos. A los 25 días se observaron gránulos más grandes, con un tamaño comprendido entre 3 y 3.5 mm y con una estructura compacta y esferoidal (Figura 6.1).

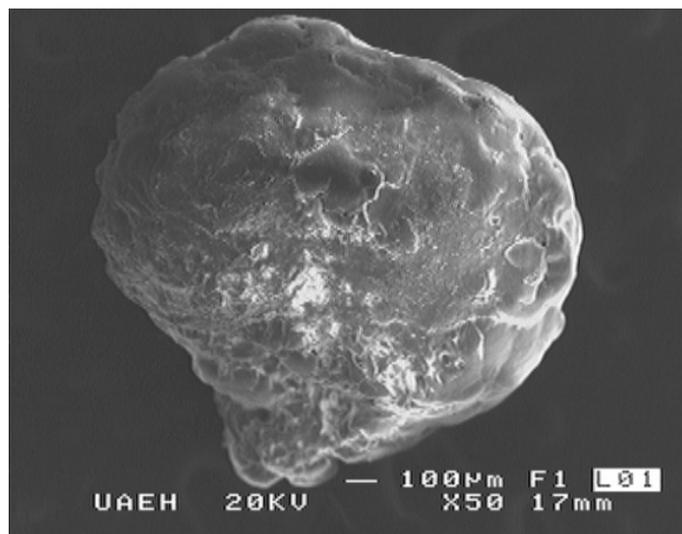


Figura 6.1. Estructura de un gránulo aerobio obtenida con microscopio electrónico de barrido

En la figura 6.1 es posible observar la estructura esferoidal del gránulo, que es compacto y no presenta crecimiento de bacterias filamentosas.

Según Liu y Tay (2002), el principal factor que determina la obtención de gránulos resistentes es la velocidad de aireación, por lo que recomiendan mantenerla a niveles superiores a 0.025 m/s en términos de velocidad superficial ( $V_s$ ). En el presente estudio se pudieron proporcionar flujos de aire de 4-5 L/min de modo casi constante, que corresponden a  $V_s$  entre 0.029 y 0.036 m/s. Por lo anterior, puede concluirse que la fuerza de desgarre que se mantuvo en el reactor fue suficiente para inducir la adhesión microbiana.

En la Figura 6.2 se muestran las bacterias que integraban estos primeros gránulos que tenían un tiempo de formación de aproximadamente un mes. La imagen se obtuvo utilizando una mayor resolución en el microscopio electrónico de barrido.

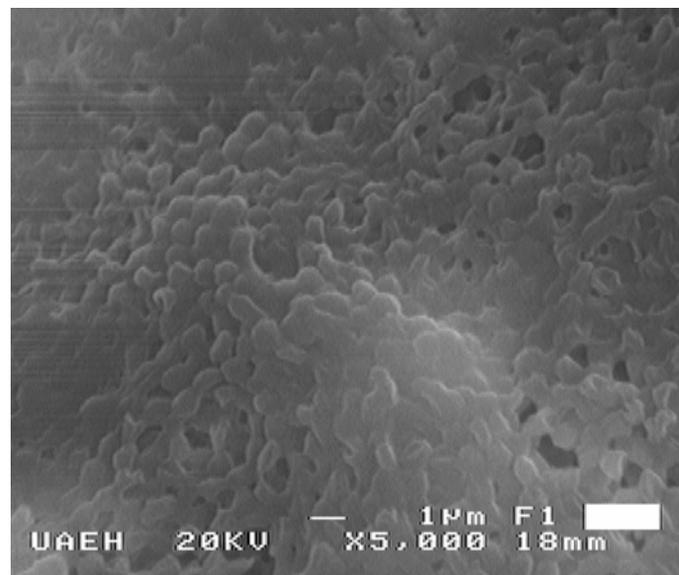


Figura 6.2. Bacterias en los primeros gránulos obtenidos

## 6.2 Efecto de la aclimatación al fenol sobre la producción de exopolímeros

Después de que se obtuvieron los gránulos a partir de etanol, se procedió a aclimatarlos a diferentes concentraciones de fenol. Inicialmente se agregaron 100 mg/L al agua residual sintética, para luego incrementar esta concentración de 100 en 100 hasta llegar a 700 mg/L. Al aumentar la concentración de fenol se hicieron cálculos para incrementar también los nutrientes de acuerdo con la cantidad de carbono añadida y así evitar carencias nutricionales, según lo establecido por Egli y Fietcher (1981).

Los EPS son macromoléculas que se encuentran en los espacios intercelulares de agregados microbianos; son de origen bacteriano y juegan un papel importante en las propiedades de floculación, incluyendo la sedimentación (Bura *et al.*, 1998). Igualmente, determinan la integridad estructural y funcional de las biopelículas, además de contribuir significativamente a la organización de sus comunidades (Branda *et al.*, 2005). Los EPS también están involucrados en la nutrición, ya que constituyen un alimento de reserva en situaciones de carencia nutricional, así como en la interacción de los microorganismos con el ambiente que los rodea. Por último, su consistencia gelatinosa los convierte en una barrera protectora hacia compuestos tóxicos (Flemming y Wingender, 2003).

Para cada concentración de aclimatación se midió la producción de polisacáridos (PS) y de proteínas (PN) (§ 5.4.3.1 y 5.4.3.2, respectivamente), y se calculó el total de exopolímeros (EPS) sumando ambas cantidades, aun cuando se ha reportado la presencia de otros polímeros (ácidos húmicos, ADN, entre otros) en la matriz extracelular (McSwain *et al.*, 2005). En la Figura 6.3 se muestran los resultados en función de la masa de los gránulos (expresada como SST).

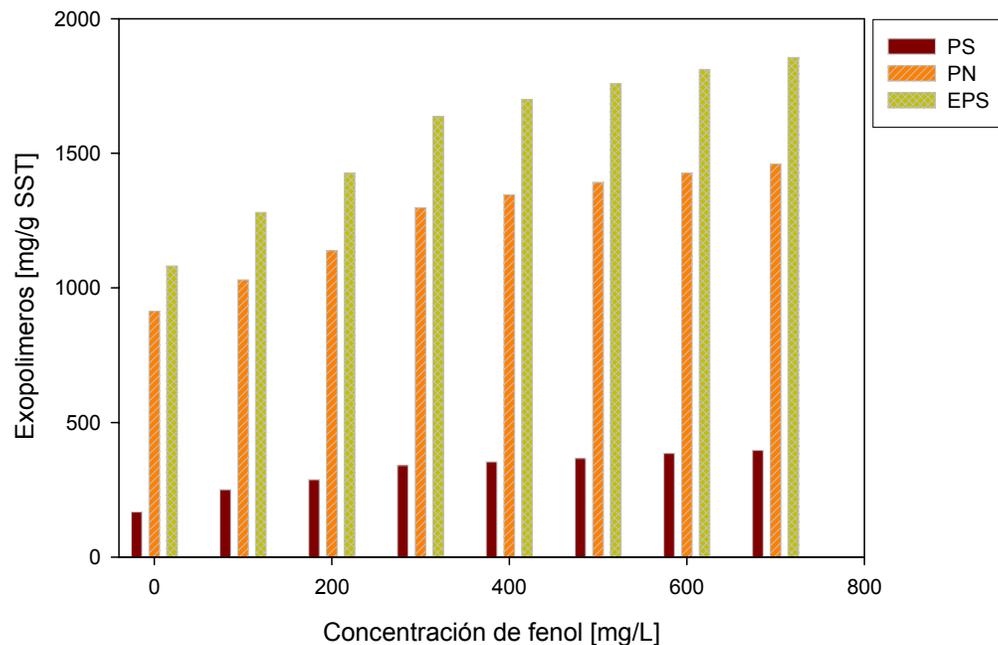


Figura 6.3. Efecto de la concentración de fenol en el influente sobre la cantidad de polisacáridos (PS), proteínas (PN) y exopolímeros totales (EPS)

Primeramente, se constató que la cantidad de EPS producidos por los gránulos aclimatados a 700 mg/L de fenol aumentó aproximadamente en un 70% con respecto a los gránulos cultivados sólo en presencia de etanol. Por otra parte, se observó que al aumentar la concentración de fenol en el influente, también se incrementaron las concentraciones de PS y de PN. Durante la aclimatación se obtuvieron valores de PS que variaron entre 167.6 y 396 mg/g SST, mientras que el intervalo de las PN producidas fue de 913.4-1460 mg/g SST.

Considerando que se determinó experimentalmente una relación promedio de 0.7566 g SSV/g SST, estos intervalos equivalen a 221.5-523.3 mg PS/g SSV y 1207.3-1930.2 mg PN/g SSV. Estos valores son muy superiores a los medidos por Adav y Lee (2008), quienes utilizando ultrasonido, NaOH y formamida para extraer los EPS reportaron  $109.3 \pm 15.3$  mg PS/g SSV y  $537.2 \pm 36.3$  mg PN/g SSV.

En este estudio se utilizó una técnica de extracción con una solución de NaOH 5M seguida de calentamiento a 100°C (Herbert *et al.*, 1971), que es utilizada frecuentemente en muestras de lodos activados (Urbain *et al.*, 1993). Sin embargo, según McSwain *et al.* (2005), la extracción con NaOH y calor produce un contenido más elevado de PN y PS debido a la inducción de lisis celular. Así, es posible atribuir las cantidades de PN y PS obtenidas a la liberación de material celular ocurrida durante el análisis.

A todas las concentraciones de aclimatación aplicadas, se observó que la cantidad de PN fue significativamente superior a la de PS. Lo anterior también se ha reportado en gránulos aerobios cultivados a partir de glucosa y peptona (McSwain *et al.*, 2005) y en gránulos aclimatados a 400 mg/L de fenol (Adav y Lee, 2008). Así mismo, las PN han sido reportadas como más abundantes que los PS en varias biopelículas y utilizando diferentes métodos de extracción (Calvario-Rivera, 2007).

En contraste, Tay *et al.* (2001b) encontraron una abundancia superior de PS en sus gránulos, obtenidos a partir de acetato de sodio en un reactor SBR operado a condiciones similares al del presente estudio. Estos mismos autores atribuyen a los polisacáridos la estabilidad de los agregados, así como su estructura compacta, más que a las proteínas.

Se calcularon las relaciones PN/PS, las cuales se muestran en la Figura 6.4. En ésta, destaca el efecto de la aclimatación inicial a 100 mg/L de fenol, ya que produjo una disminución importante en la relación PN/PS (de 5.4 a 4.1). Luego de adicionar 200 mg/L de fenol al agua residual sintética, la relación PN/PS se mantuvo alrededor de 3.8. Calvario-Rivera (2007) también reporta que la adición de cantidades crecientes de fenol ocasiona la disminución de la relación PN/PS; sin embargo, sus valores son inferiores (2.9-1.1) a los que se encontraron en el presente estudio.

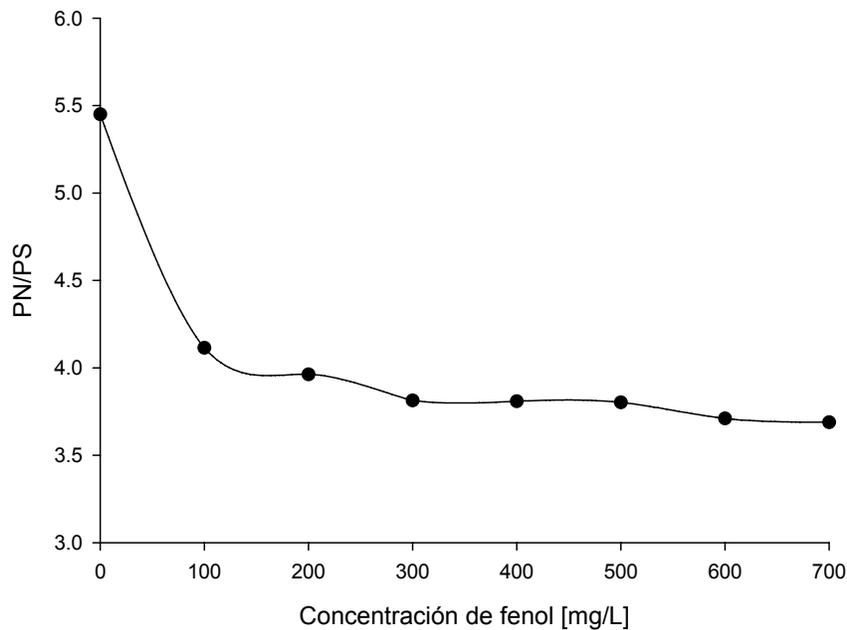


Figura 6.4. Efecto de la concentración de fenol en el influente sobre la relación PN/PS

El valor promedio de la relación PN/PS es congruente con los determinados por Adav y Lee (2008), quienes determinaron relaciones PN/PS comprendidas entre 3.4 y 6.2 en gránulos aclimatados a 400 mg/L de fenol. Para McSwain *et al.* (2005), dicha relación fue muy superior, ya que osciló en el intervalo 6.7-10.9 en gránulos cultivados sobre fuentes de carbono fácilmente asimilables (glucosa y peptona). Presumiblemente, la naturaleza del sustrato influye en la magnitud de esta relación.

### 6.3 Efecto de la aclimatación al fenol sobre su cinética de degradación

#### 6.3.1 Biodegradación en el reactor granular

Para cada concentración de aclimatación, se monitoreó el consumo de fenol dentro del reactor de granulación. Cabe mencionar que la razón de intercambio volumétrico del reactor es del 48% (§ 5.1), debido a lo cual la concentración inicial de fenol dentro del reactor ( $S_0$ ) es inferior (en dicha proporción) a la del agua residual sintética que se alimenta ( $S_{0inf}$ ).

En la Figura 6.5 se muestran los datos cinéticos obtenidos para cada concentración de aclimatación. En todos los casos, se observó que la degradación del fenol fue del 99.999%, y que pudo completarse dentro de la primera hora del ciclo. Lo anterior implica que no se presentaron fenómenos de saturación que pudieran modificar la velocidad de degradación. Todas las cinéticas fueron de orden cero, es decir, con comportamiento de velocidad casi constante. Esto es atribuible a las elevadas concentraciones de biomasa presentes en el reactor, las cuales variaron entre 16.3 y 28 g SST.

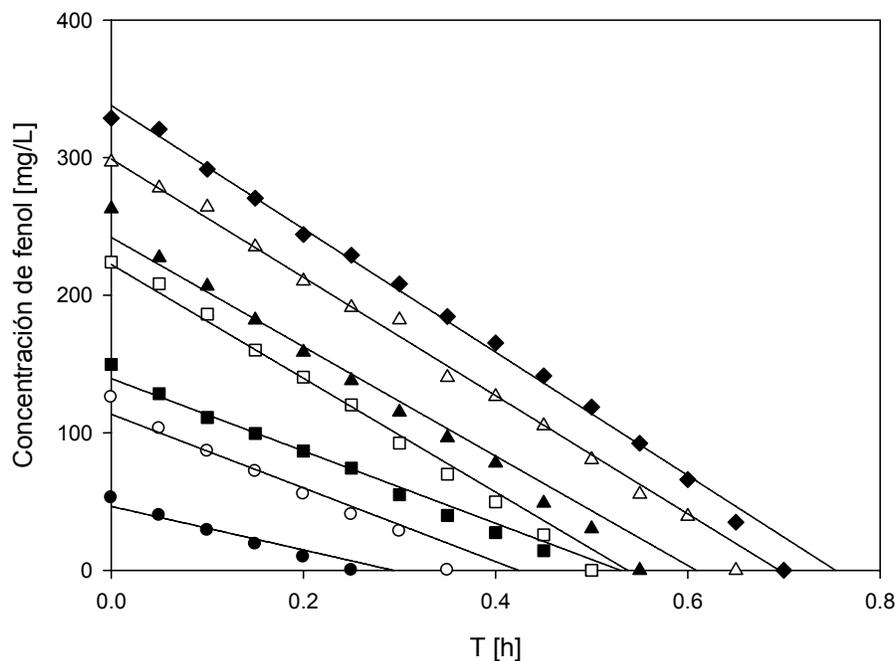


Figura 6.5. Cinéticas de degradación en el reactor con diferentes concentraciones iniciales de fenol: (●) 53; (○) 126; (■) 150; (□) 224; (▲) 263; (△) 297; (◆) 329 mg/L

Cada cinética se caracterizó en términos de la velocidad de degradación ( $r_s$ , en mg/L·h y obtenida por regresión lineal) y de la velocidad específica de degradación ( $q_s$ , en mg/gSST·h y mg/gSSV·h); esta última se obtiene relacionando  $r_s$  con la cantidad total de biomasa contenida en el reactor (como SST o SSV). El cálculo de ambas velocidades de degradación se hace sólo con los datos obtenidos al inicio de cada cultivo, que es cuando puede apreciarse el efecto de la concentración de un sustrato inhibitorio.

En la tabla 6.1 se muestran las velocidades de degradación ( $r_s$  y  $q_s$ ) correspondientes a cada concentración de aclimatación ( $S_{0inf}$ ), así como las cargas volumétricas aplicadas (CVA; Ecuación 5.3).

Tabla 6.1 Velocidades de biodegradación de fenol observadas a distintas concentraciones de aclimatación ( $S_{0inf}$ )

$S_{0inf}$ (mg/L)	$S_0$ (mg/L)	$X^b$ (g SST)	CVA <sup>a</sup> (kg/m <sup>3</sup> ·d)	$r_s$ (mg/L·h)	$q_s$ (mg/g SST·h)	$q_s$ (mg/g SSV·h)
100	53	24.27	0.384	208.3	18.0	23.8
200	126	27.99	0.768	335.5	25.2	33.3
300	150	20.9	1.152	309.8	31.1	45.1
400	224	18.87	1.536	452.3	50.3	66.6
500	263	16.34	1.920	454.4	58.4	77.2
600	297	18.57	2.304	448.7	50.7	67.0
700	329	20.2	2.688	460.6	47.9	63.4

<sup>a</sup> Carga volumétrica aplicada

<sup>b</sup> 1g SST = 0.7566 g SSV

Las cargas volumétricas de fenol que se aplicaron (0.384-2.688 kg/m<sup>3</sup>·d) son comparables a las que reporta la bibliografía para cultivos granulares aerobios. Así, Jiang *et al.* (2004) aplicaron una carga máxima de 2.5 kg/m<sup>3</sup>·d, cuya biodegradación se logró en las primeras dos horas de su ciclo de trabajo, mientras que Tay *et al.* (2005) utilizaron cargas comprendidas entre 0.6 y 2.4 kg/m<sup>3</sup>·d. Por otra parte, Tay *et al.* (2001b) consignan una CVA de 6 kg DQO m<sup>3</sup>·d. Si se considera un rendimiento teórico de 2.38 kg DQO/kg fenol, las cargas aplicadas durante el presente estudio equivalen a

0.91-6.397 kg DQO/ m<sup>3</sup>·d. Lo anterior pone de manifiesto el buen desempeño de los gránulos, sobre todo si se considera que, en sistemas convencionales de lodos activados, los microorganismos se inhiben a CVA del orden de 1 kg/m<sup>3</sup>·d, lo cual se traduce en una acumulación de fenol en el medio (Jiang *et al.*, 2004).

En la tabla 6.1 se muestra que  $r_s$ , como tendencia general, aumentó con cada incremento en la concentración de aclimatación; sin embargo, al considerar  $q_s$ , se puede constatar una disminución en dicho parámetro cuando la concentración de fenol en el influente sobrepasa los 500 mg/L, lo cual es un indicio de la inhibición ejercida por las elevadas concentraciones de fenol. Según Calvario-Rivera (2007), la inhibición de los gránulos se presenta a partir de una concentración de fenol de 200 mg/L, para la cual se determinó una  $q_s$  máxima de 74.2 mg/g SSV·h. Este valor es semejante al determinado en nuestro estudio para una  $S_{0inf}$  de 500 mg/L (Tabla 6.1), lo que resalta cómo la aclimatación a concentraciones elevadas mitiga hasta cierto punto el efecto inhibitor del fenol sobre la velocidad de degradación de los gránulos.

En la figura 6.6 se muestra la relación entre la concentración de fenol añadida al influente ( $S_{0inf}$ ) y el tiempo de degradación de la totalidad del fenol, así como con la velocidad específica de degradación ( $q_s$ ). Es evidente que, en el intervalo de concentraciones estudiado, el aumento en la concentración de fenol tiene un efecto directo en el tiempo de degradación. No obstante, este tiempo nunca sobrepasó la primera hora del ciclo, a diferencia de Tay *et al.* (2005), quienes reportan haber degradado 800 mg/L de fenol en 1.5 horas. En cuanto a  $S_{0inf}$  y  $q_s$ , es posible observar que guardan una relación de tipo Haldane-Andrews (Melin *et al.*, 1998).

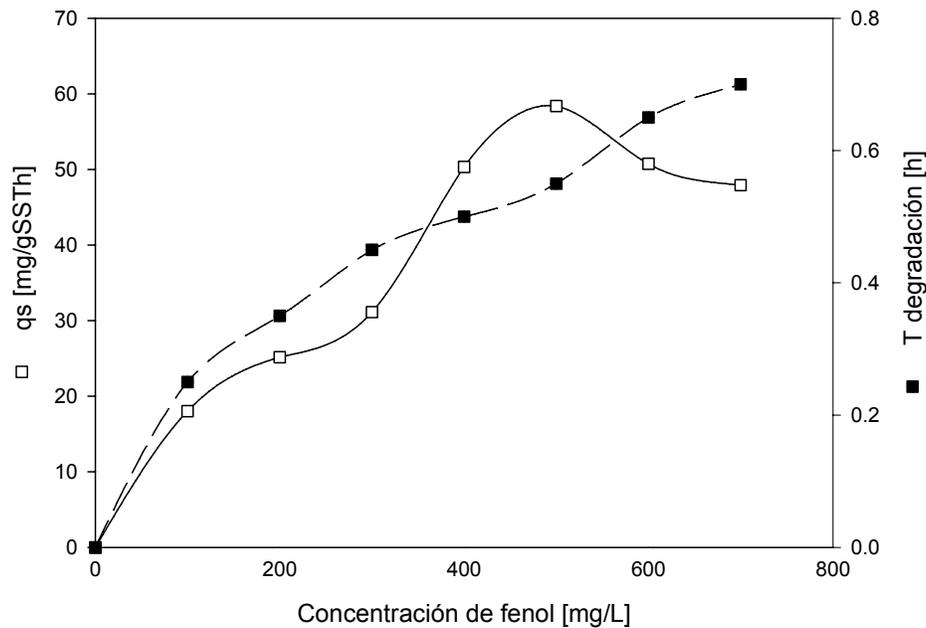


Figura 6.6. Efecto de la concentración de fenol en el influente ( $S_{0inf}$ ) sobre la velocidad específica de degradación ( $q_s$ ) y el tiempo de degradación

En general, los gránulos mostraron velocidades específicas de degradación superiores a las reportadas en la bibliografía. Tay *et al.* (2005) consiguieron valores de  $q_s$  inferiores a 2 mg/g SST·h durante 13 ciclos de operación con una concentración inicial de fenol cercana a los 800 mg/L en un reactor SBR similar al del presente estudio. Estos autores afirman que posteriormente la  $q_s$  se estabilizó en 14.4 mg/g SST·h, la cual es considerablemente inferior a la obtenida en el presente estudio. Por otra parte, Adav *et al.* (2007), Tay *et al.* (2004) y Jiang *et al.* (2002) encontraron valores de  $q_s$  de 49, 41.7, y 58.3 mg/gSSV·h respectivamente. Así, es posible afirmar que los gránulos obtenidos tienen una tolerancia considerable hacia las concentraciones elevadas de fenol.

Al graficar los porcentajes de biodegradación calculados para cada concentración de aclimatación (Figuras 6.7 y 6.8), también es posible observar el efecto inhibitorio del fenol durante el consumo de las dos  $S_{0inf}$  más elevadas, y mayormente acentuada cuando ésta fue de 700 mg/L. Esto es, porque durante el consumo de ambas

concentraciones iniciales se constata un ligero aumento en la velocidad de degradación luego que el fenol empieza a agotarse (después de 0.6 h de cultivo).

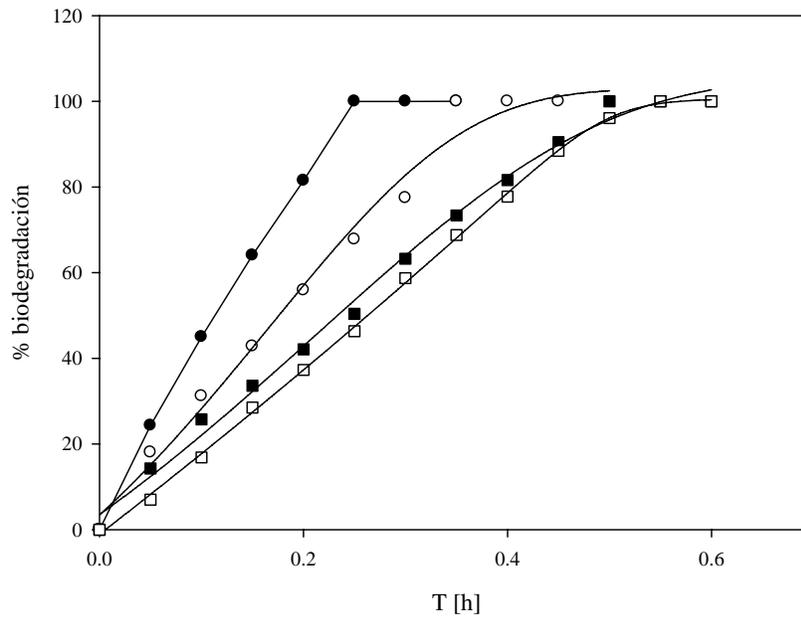


Figura 6.7. Biodegradación de bajas concentraciones de fenol ( $S_{0inf}$ ) en el reactor:  
(●) 100; (○) 200; (■) 300; (□) 400 mg/L

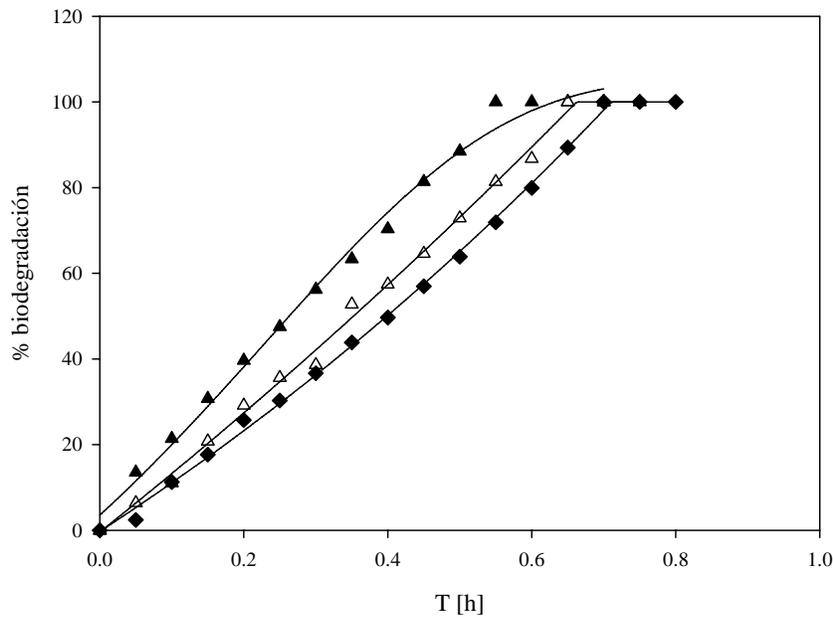


Figura 6.8. Biodegradación de altas concentraciones de fenol ( $S_{0inf}$ ) en el reactor:  
(▲) 500; (△) 600; (◆) 700 mg/L

### 6.3.2 Biodegradación en matraces agitados

Para conocer el potencial de degradación de los gránulos aclimatados a concentraciones elevadas de fenol, se realizaron estudios cinéticos en matraces agitados, tal y como se detalla en el apartado 5.3. Se emplearon los gránulos aclimatados a una concentración de fenol de 700 mg/L en el influente ( $S_{0inf}$ ), que se inocularon en los matraces a razón de 2 g SST aproximadamente. Se monitorearon en total ocho matraces, cuyas concentraciones iniciales de fenol variaron desde los 50 hasta los 1250 mg/L.

En la figura 6.9 se observan los porcentajes de degradación correspondientes a las concentraciones iniciales inferiores (50, 100, 250 y 400 mg/L). Todas estas cinéticas son de orden cero, lo que indica que en este intervalo de concentraciones no se presenta inhibición por parte del fenol hacia los gránulos.

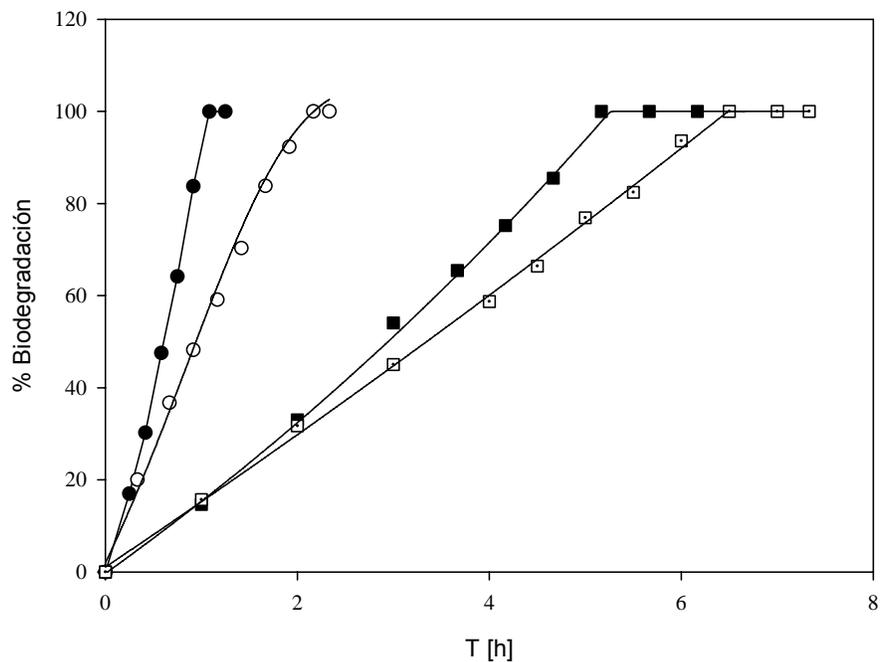


Figura 6.9. Biodegradación de fenol en matraces agitados a diferentes concentraciones iniciales: (●) 50; (○) 100; (■) 250; (□) 400 mg/L

En la figura 6.10 se presenta la biodegradación de fenol a las concentraciones iniciales más altas (500, 750, 1000 y 1250 mg/L de fenol). Se puede apreciar que las cinéticas no son de orden cero, puesto que en cada ensayo se presenta un aumento progresivo en la velocidad de degradación conforme la concentración de fenol disminuye en el matraz. Además, a mayor concentración inicial de fenol, esta tendencia es más marcada. Lo anterior también puede deberse a la acumulación de metabolitos intermedios, en particular del semialdehído 2-hidroximucónico. Este compuesto se genera durante la ruptura del anillo fenólico por vía *meta*, y tiene un efecto inhibitor significativo y ampliamente reportado en la bibliografía (Mörsen y Rehm, 1990; Wang y Loh, 1999; Vázquez-Rodríguez *et al.*, 2006). Cabe mencionar que la remoción de fenol siempre alcanzó el 100%, aún cuando se emplearon concentraciones iniciales superiores a las de la aclimatación.

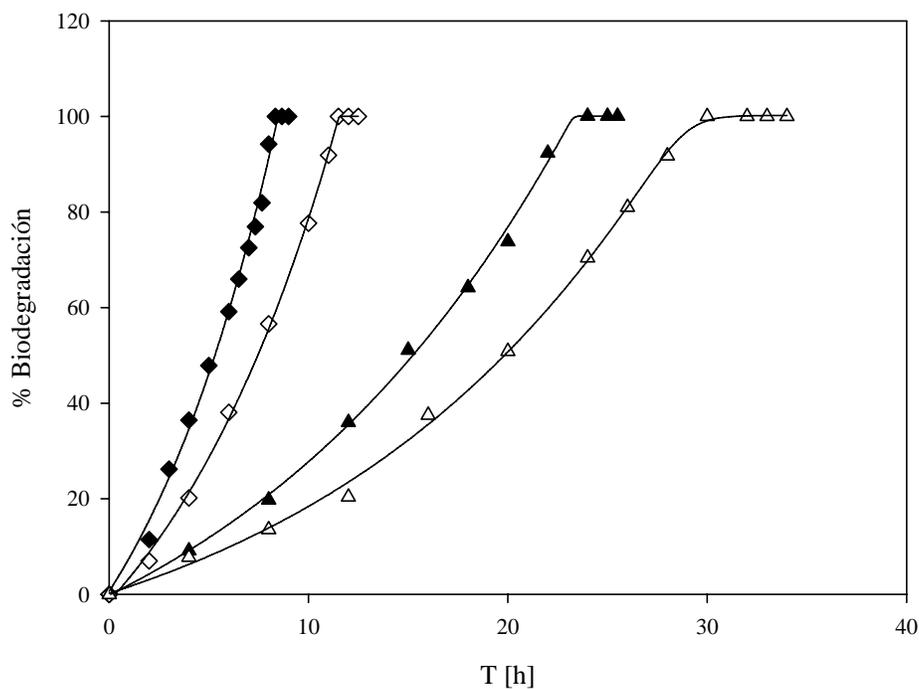


Figura 6.10. Biodegradación de fenol en matraces agitados a diferentes concentraciones iniciales: (◆) 500; (◇) 750; (▲) 1000; (△) 1250 mg/L

Para cada ensayo se estimó, mediante regresión lineal, la velocidad inicial de degradación de fenol ( $r_s$ ). Al relacionar estas velocidades con la cantidad de biomasa introducida al matraz, se obtuvieron los valores de  $q_s$ . Estos valores se presentan en la figura 6.11, al igual que los obtenidos en estudios previos con gránulos aclimatados (Valera-Damián, 2006; Calvario-Rivera, 2007).

En la Figura 6.11, es evidente que la aclimatación a elevadas concentraciones de fenol reflejó varios efectos en la cinética de biodegradación. Primeramente, la aclimatación permitió alcanzar velocidades de degradación más elevadas. Por otra parte, se disminuyó la afinidad por el fenol, de tal manera que las velocidades de degradación elevadas se obtuvieron a concentraciones de fenol mayores. Así mismo, los gránulos aclimatados a 700 mg/L mostraron velocidades de degradación semejantes en un amplio rango de concentraciones de fenol (100-800 mg/L), lo que muestra que lograron superar en cierto grado la toxicidad de dicho compuesto.

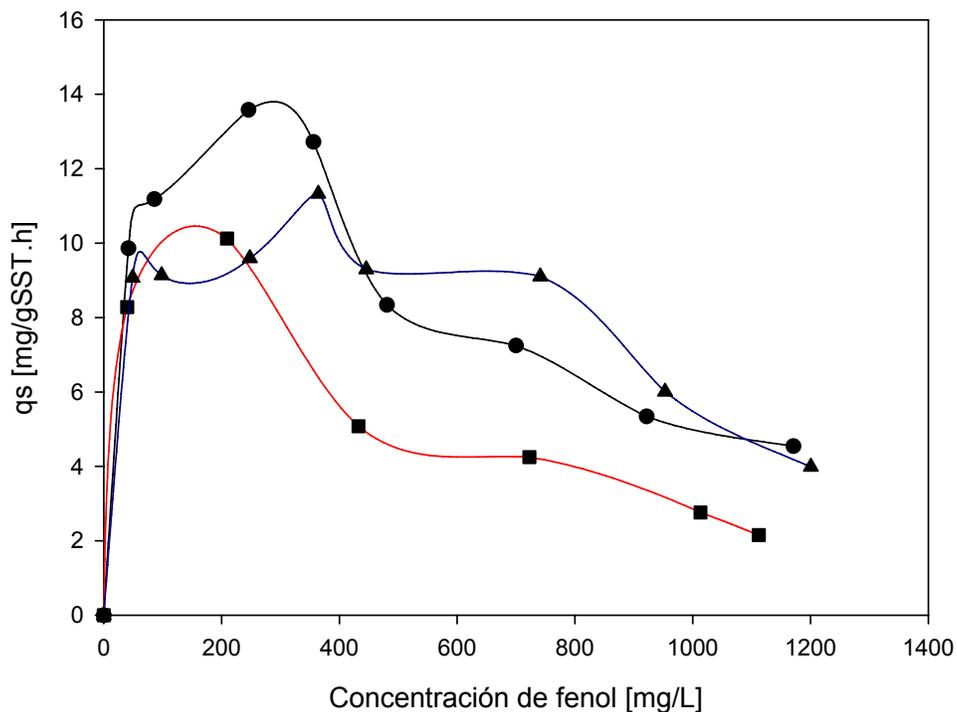


Figura 6.11. Efecto de la concentración de fenol en matraces agitados sobre la velocidad específica de degradación ( $q_s$ ) en matraces agitados. Gránulos aclimatados a (■) 100, (●) 500 y (▲) 700 mg/L

### 6.3.2.1 Producción de metabolitos intermediarios

En los matraces agitados se pudo observar la producción de metabolitos intermediarios por la aparición de un color amarillo. Esta coloración se produjo cuando la concentración de fenol estaba por agotarse. Así mismo, se notó un ligero aumento en la concentración de metabolito conforme se aumentaba la concentración de fenol. Este experimento sólo se realizó con cuatro concentraciones iniciales de fenol (50, 100, 250 y 400 mg/L) con los gránulos aclimatados a 700 mg/L.

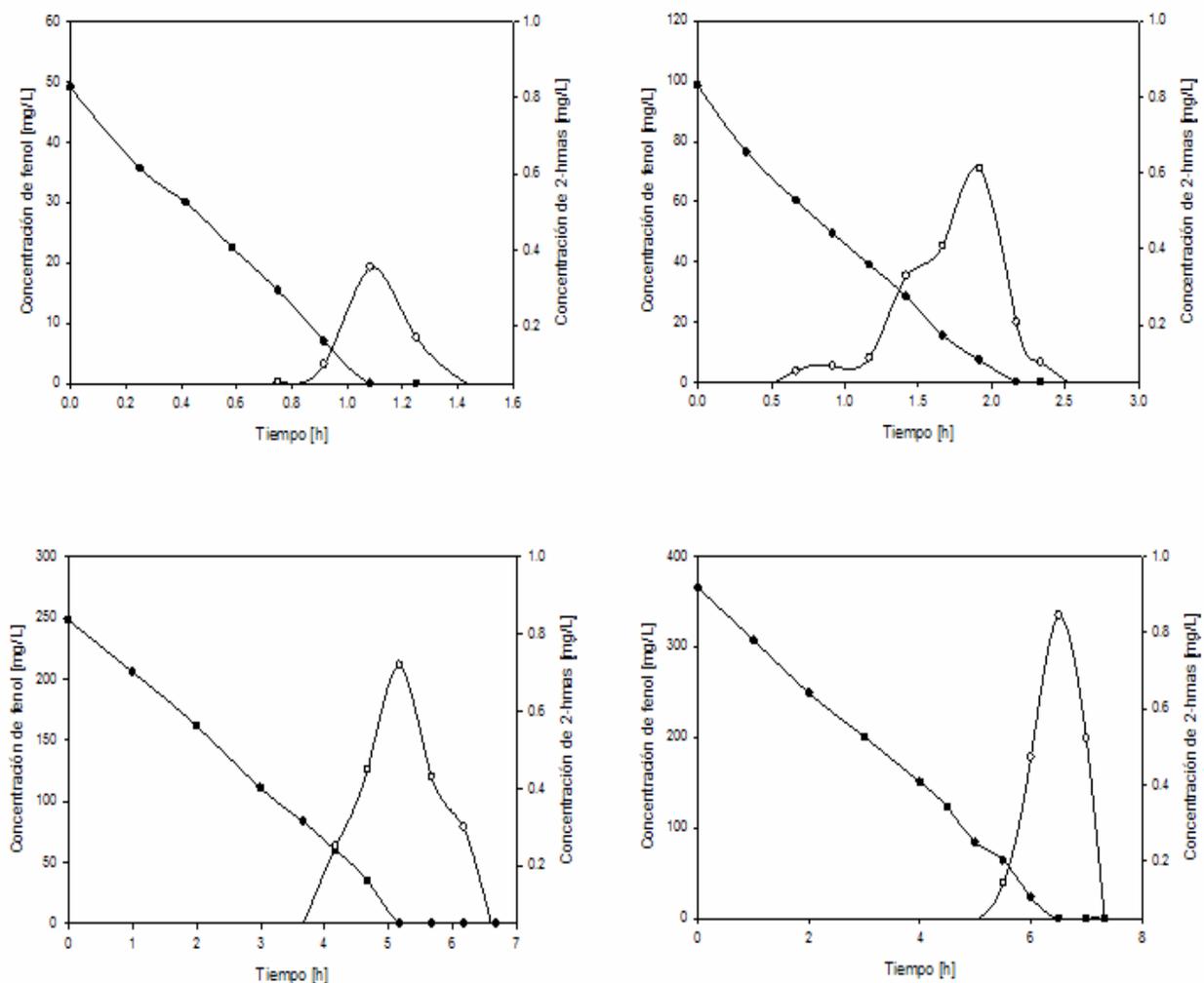


Figura 6.12. Biodegradación de fenol (●) y producción del metabolito intermediario (2-HMAS) (○) con diferentes concentraciones iniciales de fenol

La bibliografía reporta que la producción del metabolito inhibe la degradación del fenol. Si se compara la cantidad de metabolito producido durante la degradación de 400 mg/L de fenol por los gránulos aclimatados a 700 mg/L y la que producen gránulos aclimatados a 500 mg/L (Calvario-Rivera, 2007), es posible notar que los primeros produjeron una cantidad menor. Así, la aclimatación a una concentración mayor de fenol habría disminuido la acumulación de este metabolito inhibitorio, y por ende la toxicidad asociada a las elevadas concentraciones de fenol.

# ***CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS***

---

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con lo planteado en este trabajo, se ha observado que es posible degradar fenol con gránulos aerobios en un SBR hasta una concentración de 700 mg/L. El reactor granular operó a cargas volumétricas semejantes e incluso superiores a las aplicadas en otras investigaciones y más aún a las que se utilizan en sistemas de lodos activados

Las cinéticas de biodegradación que se realizaron en matraces agitados mostraron que hubo una adaptación de los gránulos a cada incremento de concentración de fenol. La aclimatación de los gránulos a estos incrementos permitió observar un buen efecto sobre la velocidad específica de degradación, con lo cual se podría probar un tiempo más corto en el ciclo del reactor.

Las cinéticas en matraces a bajas concentraciones de fenol fueron de orden cero, lo que indica que no se presentó inhibición por parte del compuesto. A altas concentraciones se observó todo lo contrario ya que las velocidades específicas de degradación disminuyeron notablemente conforme la concentración de fenol aumentaba.

De acuerdo con trabajos anteriores, los gránulos aclimatados a bajas concentraciones de fenol degradan más rápidamente concentraciones pequeñas de fenol, lo cual se debe a una afinidad a sus concentraciones de aclimatación.

Por otra parte, se observó la presencia del metabolito intermediario por la aparición de un color amarillo en el medio de cultivo cuando la concentración de fenol estaba por agotarse. No obstante, la aclimatación a 700 mg/L condujo a una acumulación menor del metabolito, lo que constituye otro efecto positivo de la exposición de los gránulos a concentraciones elevadas de fenol.

El estudio de los exopolímeros a distintas concentraciones de aclimatación mostró que a altas concentraciones de fenol, se incrementaba la producción de PN; al mismo tiempo, se presentó un aumento en la producción de PS, lo cual indica que los gránulos aerobios secretan más exopolímeros como método de defensa al medio en el que se encuentran.

Como perspectivas principales de este trabajo, se encuentra la disminución del tiempo de los ciclos y la introducción de concentraciones aún más elevadas de fenol en la alimentación, con la finalidad de aumentar las cargas aplicadas y en consecuencia, la capacidad de tratamiento de aguas fenólicas de los sistemas granulares aerobios

# ***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adav S.S., Chen M-Y., Lee D-J. y Ren N-Q. (2007) Degradation of phenol by aerobic granules and isolated yeast *Candida tropicalis*. *Biotechnology and Bioengineering* 96 (5): 844-852.
- Adav S.S., Lee D.J. y Tay J.H. (2008) Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Research* (En prensa). doi: 10.1016/j.watres.2007.10.013.
- Adav S.S. y Lee D.J. (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *Journal of Hazardous Materials* (En prensa). doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.11.058.
- APHA (1989) Standard methods for the examination of water, 17<sup>a</sup> Edición. American Public Health Association, Baltimore.
- ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1998) Toxicological Profile for Phenol. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health, Atlanta.
- Beun J.J., Hendricks A., van Loosdrecht M.C.M., Morgenroth E., Wilderer P.A. y Heijnen J.J. (1999) Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research* 33(10): 2283-2290.
- Branda S.S., Vik A., Friedman L. y Kolter R. (2005) Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology* 13(1): 20-26.
- Bravo J. y Páez E. (1998) Catalizadores para purificación de aguas industriales que contengan compuestos resistentes a la biodegradación. Centro de Investigaciones en Catálisis. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Bugg T.D.H. y Winfield C.J. (1998) Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports* 15(5): 513-530.
- Bura R., Cheung M., Liao B., Finlayson J., Lee B.C., Droppo I.G., Leppard G.G. y Liss S.N. (1998) Composition and extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Water Science and Technology* 37: 325–333.

- Calvario-Rivera C.L. (2007) Biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada (SBR) con biomasa granular aerobia. *Tesis de Maestría*, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Dubois M., Pilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Egli T. y Fietcher A. (1981) Theoretical analysis of media used in the growth of yeasts on methanol. *Journal of General Microbiology* 123: 365-369.
- Fang H.H. y Chen O. (1997) Toxicity of phenol towards aerobic biogranules. *Water Research* 31: 2229-2242.
- Flemming H.C. y Wingender J. (2003) The crucial role of extracellular polymeric substances in biofilms En: Biofilms in wastewater treatment: an interdisciplinary approach (Wuerts S., Bishop P.L. y Wilderer P.A., eds). IWA Publishing, Londres, p. 178.
- Gibson D.T., Kock J.R. y Kallio R.E. (1968) Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *Biochemistry* 7: 2356-2662.
- Henry J.G. y Heinke W. (1996) Environmental Science and Engineering, 2<sup>nd</sup> Edition. Prentice-Hall, Upper Saddle River, pp. 457-461 y 470-472.
- Herbert D., Phipps P.J. y Stange R.E. (1971) Chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology* 5B: 324-328.
- INE (2000) Norma Oficial Mexicana Nom-127-SSA1-1994. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Jiang H.L., Tay J.H. y Tay S.T.L. (2002) Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. *Letters in Applied Microbiology* 35(5): 439-445.
- Jiang H.L., Tay J.H., Liu Y. y Tay S.T.L. (2003) Ca<sup>2+</sup> augmentation for enhancement of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors. *Biotechnology Letters* 63: 95-99.

- Jiang H.L., Tay J.H. y Tay S.T.L. (2004) Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 602-608
- Jiménez B.E. (2002) Procesos biológicos. En: La contaminación ambiental en México. Causas, efectos y Tecnología Apropriada. Editorial Limusa, México, pp. 268-271.
- Komarkova E., Paca J., Klapkova E., Stiborova M., Soccol C.R. y Sobotka M. (2003) Physiological changes of *Candida tropicalis* population degrading phenol in fed batch reactor. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46(4): 537-543.
- Kumar A., Kumar S. y Kumar S. (2005) Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal* 22: 151-159.
- Liu Y. y Tay J.H. (2002) The essential role of hydrodynamic shear force en the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36 (24): 1653-65
- Liu Y., Yang S.F., Liu Q.S. y Tay J.H. (2003) The role of cell hydrophobicity in the formation of aerobic granules. *Current. Microbiology* 46: 270-274
- Liu Y. y Tay J.H. (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances* 22: 533-563.
- McSwain B.S., Irvine R.L., Hausner M. y Wilderer P.A. (2005) Composition and distribution of extracellelar polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied Enviromental and Microbiology* 71 (2): 1051-1057.
- Melin E.S., Puhakka J.A. y Ferguson J.F. (1998) Enrichment and operation strategies for polychlorophenol degrading microbial cultures in an aerobic fluidized-bed reactor. *Water Enviromental Research* 70: 171-180.
- Morgan J.W., Forster C.F. y Evison I. (1990) A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludge. *Water Research* 24 (6): 743-750.
- Mörsen A. y Rehm H.-J. (1990) Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33: 206-212.

- Murialdo S. E., Fenoglio R., Haure P.M. y González, J. F. (2003) Degradation of phenol and chlorophenols by mixed and pure cultures. *Water SA* 29(4): 457-463.
- Nicolella C., van Losdrecht M.C.M. y Heijnen J.J. (2000) Wastewater treatment with particulate biofilms reactors. *Biotechnology and Bioengineering* 80: 1-33.
- Qin L., Tay J.H. y Liu Y. (2004) Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in a sequencing batch reactors. *Process Biochemistry* 39: 579-84.
- Quarmby J. y Forster C.F. (1995) An examination of the structure of UASB granules. *Water Research* 29: 2449-2454.
- Ramírez-Cerón I.L. (2005) Biodegradación de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada. *Tesis de Maestría*, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Rigola-Lapeña M. (1999) Tratamiento de aguas residuales. En: Tratamiento de aguas industriales-Aguas de proceso y residuales. Alfaomega, Barcelona, pp. 144-146.
- Rippen G., Handbuch U. y Stoffdaten P.V. (1989). Umweltkonzentrationen organischer chemikalien. Ergänzbares Loseblattwerk. Landsberg: Ecomed Verlagsgesellschaft II-25. Disponible en: [http://www.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/en\\_vs\\_p/Vol\\_326.htm](http://www.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/en_vs_p/Vol_326.htm)
- Rosenberg S. (2003) Charakterisierung von belebtem Schlamm in Membranbelebungsreaktoren zur Abwasserreinigung. *Tesis doctoral*, Universidad de Berlín, Alemania.
- Sarfaraz S., Thomas S., Tewari U.K. e Iyengar L. (2004) Anoxic treatment of phenolic wastewater in sequencing batch reactor. *Water Research* 38: 965–971.
- Semple K.T. y Cain R.B. (1996) Biodegradation of phenols by the algae *Ochromonas danica*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(4): 1265–1273.
- Shalaby M. (2003) Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4. *Tesis doctoral*, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Alemania.
- Sutherland I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 47: 3-9.

- Tay J.H., Liu Q.S. y Liu Y. (2001a) Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 91: 168-75.
- Tay J.H., Liu Q.S. y Liu Y. (2001b) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33: 222-6.
- Tay J.H., Ivanov V., Pan S. y Tay S.T.L. (2002) Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Letters in Applied Microbiology* 34: 254-257.
- Tay J.H., Tay S.T.L. Ivanov V., Pan S. y Liu Q.S. (2003) Biomass and porosity profile in microbial granules used for aerobic wastewater treatment. *Letters in Applied Microbiology* 36: 297-301.
- Tay J.H., Jiang H-L. y Tay S.T-L. (2004) High-rate biodegradation of phenol by aerobically grown microbial granules. *Environmental Engineering* 130(12): 1415-1423.
- Tay S.T.L., Moy B.Y.P., Jiang H.L. y Tay J.H. (2005) Rapid cultivation of stable aerobic phenol-degrading granules using acetate-fed granules as microbial seed. *Journal of Biotechnology* 115: 387-395.
- Urbain V., Phys E., Block J. C. y Manem J. (1993) Composition and activity of activated sludge under starvation conditions. *Environmental Technology* 14: 731-740.
- Valera-Damián V. (2006) Obtención de un consorcio microbiano granular para la biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada. *Tesis de Licenciatura*, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, México.
- Vázquez-Rodríguez G., Ben Youssef C. y Waisman-Vilanova J. (2006) Two-step modeling of the biodegradation of phenol by acclimated activated sludge. *Chemical Engineering Journal* 117: 245-252.
- Wang S.J. y Loh K.C. (1999) Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 117-184.
- Wang Z.W., Liu Y. y Tay J.H. (2005) Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 469-473.

- Wingender J., Neu T.R. y Flemming H.C. (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? En: Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function (Wingender J., Neu T.R. y Flemming H.C., eds). Springer, Berlín, pp. 1-19.
- Woolard C.R. e Irvine R.L. (1995) Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Research* 29 (4): 1159-1168.
- Yan J., Jianping W., Hongmei L., Suliang Y. y Zongding H. (2005) The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal* 24: 243-247

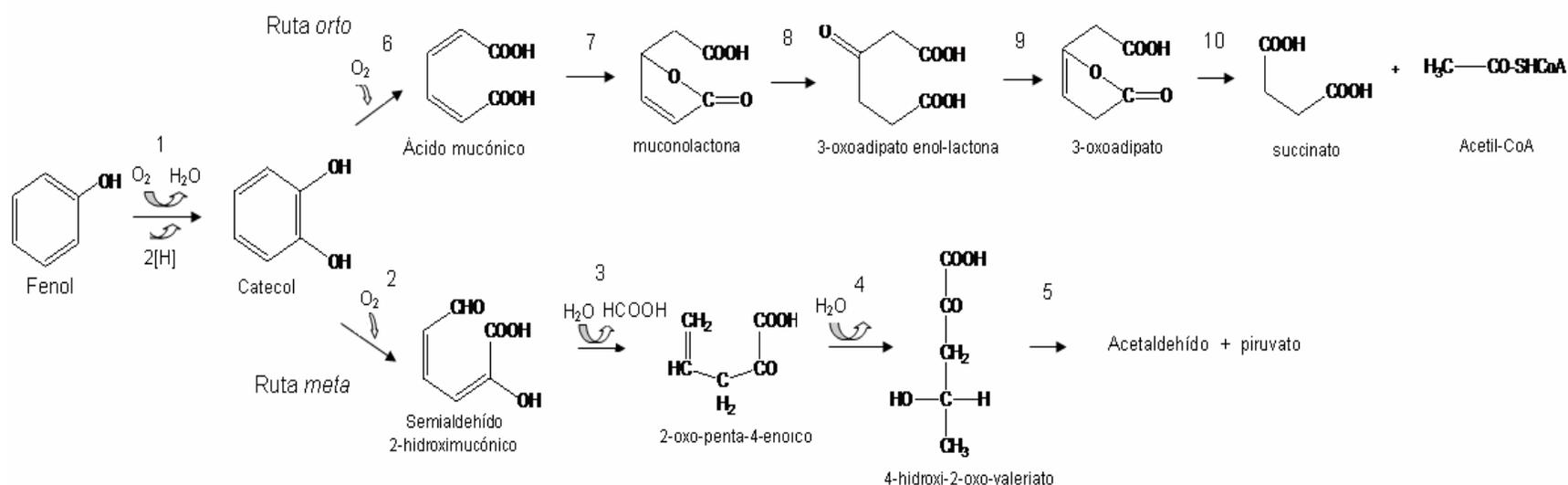
# ***ANEXOS***

---

---

## 9. ANEXOS

## Anexo 9.1. Rutas de biodegradación aerobia del fenol



Enzimas que catalizan estas reacciones:

- |   |  |
|---|--|
| 1: Fenol monooxigenasa                    | 6: Catecol 1,2 dioxigenasa             |
| 2: Catecol 2,3-dioxigenasa                | 7: Enzima ciclo-isomerasa              |
| 3: Semialdehído hidroximucónico hidrolasa | 8: Muconolactona isomerasa             |
| 4: Ácido 2-oxo-penta-4-enoico hidrolasa   | 9: Oxoadipato enol-lactona hidrolasa   |
| 5: 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa       | 10: Oxoadipato succinil-CoA trasferasa |