UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

Biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTA:
JOSÉ ALBERTO GARCÍA MELO

DIRECTORES DE TESIS:
DRA. GABRIELA ALEJANDRA VÁZQUEZ RODRÍGUEZ
DR. JULIO WAISSMAN VILANOVA (CITIS-UAEH)

Pachuca de Soto, Hgo. 2007

AGRADECIMIENTOS

A Dios
Por dejarme ver la luz de cada nuevo día y darme fuerzas para seguir adelante.

A mis hermanos
Rosa, Enid, Marisol, Luis, Juan C., Por apoyarme moralmente en todo momento, además de darme su amor incondicionalmente.

A mi pequeña Aylen
Porque es la luz que hacía falta en mi familia.

To stargirl
To appear at the right moment, to give me a reason, to believe, to save me.

A Noemy
Gracias a ti tengo esto, sin tu impulso esta tesis y esta carrera no existirían.

A mis amigos

Dora, por habernos partido juntos el alma por este proyecto.

Claus, Violeta, Yose, Hugo, Marco y Chelo por soportarme tanto tiempo y por ayudarme cuando lo necesite.

A mis profesores

Dra. Gaby, por soportarme, guiarme y tenerme paciencia.
Dr. Julio, por su amistad, por su apoyo en todo momento y por todas esas celebraciones y demás que organizó.
Dr. Alejandro, por su amistad, por creer en mí, por impulsarme y por sus consejos.

A una personita
Por todo lo bueno y malo que pasamos juntos, sin tu ayuda no podría haber sido. Gracias!!! (ZNTVOVH)

A todos, Gracias!!!!!!!!!!!

A mis padres

El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para el desarrollo del proyecto de investigación titulado “Optimización de un proceso SBR mediante técnicas de control por aprendizaje iterativo. (Responsable: Dr. Julio Waissman Vilanova; Ref. SEP-2003-C02-45394).

ÍNDICE

	Página
Lista de abreviaturas y símbolos	v
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	xi
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 El fenol como contaminante del agua	3
2.1.1 Propiedades físicas y químicas	4
2.1.2 Fuentes de emisión	4
2.1.3 Destino y efectos ambientales	5
2.1.4 Efectos en la salud humana	6
2.1.4.1 Efectos cardiovasculares	6
2.1.4.2 Efectos gastrointestinales	6
2.1.4.3 Efectos hematológicos	6
2.1.4.4 Efectos musculoesqueléticos	6
2.1.4.5 Efectos renales	6
2.1.4.6 Efectos dérmicos	7
2.1.4.7 Otros efectos	7
2.1.4.8 Eliminación y excreción	7
2.1.5 Legislación ambiental en el medio acuático	8
2.1.6 Métodos de tratamiento	9
2.1.6.1 Tratamientos fisicoquímicos	9
2.1.6.1.1 Incineración	9
2.1.6.1.2 Oxidación húmeda	9
2.1.6.1.3 Oxidación química	10

2.1.6.1.4 Oxidación catalítica 10
2.1.6.2 Tratamientos biológicos 11

2.2 Biodegradación del fenol 13
2.2.1 Fases de Crecimiento bacteriano 13
2.2.2 Biodegradación aerobia 14
2.2.3 Biodegradación anaerobia 17

2.3 Modelos de biodegradación 18
2.3.1 Modelo de Monod 19
2.3.2 Modelo de Haldane–Andrews 21
2.3.3 Modelado de la biodegradación del fenol 22

2.4 Reactores discontinuos de alimentación secuenciada (SBR) 23
2.4.1 Fases de tratamiento en un SBR 27
2.4.1.1 Llenado 23
2.4.1.2 Aireación o reacción 24
2.4.1.3 Sedimentación 24
2.4.1.4 Extracción o vaciado 27

3. Planteamiento del problema y Justificación 29

3.1 Planteamiento del problema 29
3.2 Justificación 29

4. Objetivos 31

4.1 Objetivo general 31
4.2 Objetivos específicos 31

5. Materiales y métodos 32

5.1 Inóculos microbianos 32
5.2 Medios de cultivo 32
5.2.1 Medio de adaptación 32
5.2.2 Agua residual sintética contaminada con fenol 33

5.3. Cultivos de lodos activados 33
5.3.1 Adaptación al fenol 33
5.3.2 Cultivos discontinuos en matraces agitados 34
5.3.3 Cultivos discontinuos de alimentación secuenciada (SBR) 34

5.4. Instrumentación y adquisición de datos en el reactor SBR 38

5.5. Métodos analíticos 39
5.5.1 Determinación de la concentración de biomasa 39
5.5.2 Determinación de la concentración de fenol 39
5.5.2.1 Método colorimétrico de la 4-aminoantipirina 39
5.5.2.2 Método espectrofotométrico UV 40
5.5.3 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno 41
5.5.4 Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno 41

5.6. Métodos computacionales 42

6. Resultados y discusión 43

6.1 Biodegradación aerobia del fenol 43
6.1.1 Adaptación de lodos activados al fenol 43
6.1.2 Estudio cinético de la biodegradación de fenol 44
6.1.3 Modelado de la biodegradación de fenol 48
6.1.4 Biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada 56
6.1.4.1 Biodegradación en condiciones inhibitorias (SBR 1) 58

6.1.4.2 Biodegradación en condiciones limitantes (SBR 2) 62

6.2 Simulación del proceso SBR 65

7. Conclusiones 72

8. Referencias bibliográficas 74

Anexo A: Programas para la simulación del modelo 79

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α	Constante asociada al crecimiento [g/g]
COD	Carbono orgánico disuelto
DBO_5	Demanda bioquímica de oxígeno a 5 días
DQO	Demanda química de oxígeno
ECB	*European Chemicals Bureau*
EPA	*Environmental Protection Agency*
2-hmas	Semialdehído 2-hidroximucónico
K	Constante de inhibición competitiva [g/l]
K_i	Constante de inhibición o de Haldane [g/l]
K_S	Constante de afinidad o de saturación media [g/l]
μ	Velocidad específica de crecimiento microbiano [h^{-1}]
μ_{max}	Velocidad específica máxima de crecimiento microbiano [h^{-1}]
ν_S	Velocidad específica de producción del intermediario [h^{-1}]
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
P	Producto de reacción
ppm	Partes por millón
Q	Velocidad de flujo de alimentación [ml/h]
Q_S	Velocidad de flujo de salida [ml/h]
q_S	Velocidad específica de consumo de sustrato [h^{-1}]
$q_{S\ max}$	Velocidad específica máxima de consumo de sustrato [h^{-1}]
S	Sustrato o concentración de sustrato [g/l]
SBR	*Sequencing batch reactor*
SCAS	*Semi-continuous activated sludge*
SST	Sólidos suspendidos totales
t	Tiempo [h]
V	Volumen de medio de reacción [l]
X	Biomasa o concentración de biomasa [g/l]
Y	Rendimiento de producción de biomasa [g/g]

Subíndices

0	Valor inicial
1	Parámetro relacionado con el sustrato 1 (fenol)
2	Parámetro relacionado con el sustrato 2 (metabolito intermediario)

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 2.1	Estructura química del fenol	3
Figura 2.2	Efectos producidos por exposición al fenol	7
Figura 2.3	Ruta metabólica de eliminación de fenol	8
Figura 2.4	Ruta simplificada de la oxidación catalítica del fenol	11
Figura 2.5	Curva de crecimiento bacteriano	13
Figura 2.6	Rupturas *orto* (A) y *meta* (B) del anillo fenólico	15
Figura 2.7	Ruta *meta* de biodegradación aerobia de fenol	16
Figura 2.8	Ruta de biodegradación anaerobia del fenol	17
Figura 2.9	Relación entre S y μ en las cinéticas de Monod (línea continua) y de Haldane-Andrews (línea punteada)	22
Figura 2.10	Etapas de funcionamiento de un reactor SBR	26
Figura 5.1	Reactor SBR utilizado para los cultivos discontinuos	35
Figura 5.2	Sistema de difusión de aire y control de nivel del SBR	35
Figura 5.3	Bomba de precisión para la alimentación del SBR	36

Figura 5.4 Bomba de extracción del SBR 36

Figura 5.5 Esquema del reactor SBR 37

Figura 5.6 Panel de control del reactor SBR 38

Figura 5.7 Barridos de longitud de onda para la determinación de la concentración de fenol por espectrofotometría 40

Figura 5.8 Curva de calibración para el análisis espectrofotométrico UV de fenol 41

Figura 6.1 Biodegradación de fenol a diferentes relaciones S_0/X_0 [g fenol/g SST]: (●) 0.10; (❍) 0.52; (■) 0.79; (❒) 1.00 44

Figura 6.2 Cinética de crecimiento y de consumo de sustrato por parte de lodos activados adaptados (S_0/X_0 = 0.79 g/g) (●) fenol y (❍) biomasa 46

Figura 6.3 Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (❍). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 0.10 g/g). La línea discontinua (·) representa los posibles intermediarios metabólicos (S_2) calculados por el modelo. 53

Figura 6.4 Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 0.52 g/g). La línea discontinua (·) representa el comportamiento de los posibles intermediarios metabólicos (S_2) calculados por el modelo. 53

Figura 6.5 Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 0.79 g/g). La línea discontinua (·) representa los posibles intermediarios metabólicos (S_2) calculados por el modelo. 55

Figura 6.6 Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 1.0 g/g). La línea discontinua (·) representa los posibles intermediarios metabólicos (S_2) calculados por el modelo. 55

Figura 6.7 Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 0.10 g/g). La línea discontinua (·) representa los posibles intermediarios metabólicos (S_2) calculados por el modelo. 57

Figura 6.8 Perfil de la velocidad de alimentación del experimento SBR-1 59

Figura 6.9 Cantidad de fenol alimentado (–) y consumido (■) en el experimento SBR-1 60

Figura 6.10 Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○) durante el experimento SBR-1. Los resultados de simulación se representan por líneas continuas. La línea discontinua (·) representa los posibles intermediarios metabólicos (S_2) calculados por el modelo. 61

Figura 6.11 Perfil de la velocidad de alimentación del experimento SBR-2 62

Figura 6.12 Cantidad de fenol alimentado (–) y consumido (■) en el experimento SBR-2 63

Figura 6.13 Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○) durante el experimento SBR-2. Los resultados de simulación se representan por líneas continuas. La línea discontinua (·) representa los posibles intermediarios metabólicos (S_2) calculados por el modelo. 64

Figura 6.14 Simulación N° 1 del modelo de biodegradación de fenol 67

Figura 6.15 Simulación N° 2 del modelo de biodegradación de fenol 68

Figura 6.16 Simulación N° 3 del modelo de biodegradación de fenol 69

Figura 6.17 Simulación N° 4 del modelo de biodegradación de fenol 70

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 2.1	Propiedades físicas y químicas del fenol	4
Tabla 2.2	Constantes cinéticas reportadas para la biodegradación de fenol	25
Tabla 5.1	Composición del agua residual sintética contaminada con fenol	33
Tabla 6.1	Tipos de interacciones entre poblaciones microbianas (Atlas y Bartha, 2002)	47
Tabla 6.2	Parámetros cinéticos calculados por el método de Hooke y Jeeves (1961)	52
Tabla 6.3	Parámetros cinéticos calculados por el método de Hooke y Jeeves (1961)	58

1. INTRODUCCIÓN

El problema de la calidad del agua ha sido recurrente a lo largo de la historia, ya que su deterioro ha procedido en muchos casos de actividades antropogénicas. Así, los problemas actuales de contaminación ambiental por especies químicas tienen su origen mayoritario en:

- El desarrollo a gran escala de la química de síntesis desde comienzos del siglo XX. Este desarrollo introdujo y sigue introduciendo en la naturaleza un tipo de enlaces químicos prácticamente desconocidos en la biosfera (xenobióticos), sobre todo de átomos de carbono unidos covalentemente a grupos muy electronegativos (halógenos y grupos nitro y amino), lo que confiere una extraordinaria estabilidad a los productos resultantes.

- Las explotaciones mineras y metalúrgicas masivas.

- Las prácticas de agricultura intensiva.

- La emisión de productos farmacéuticos al medio ambiente como consecuencia de la producción y el consumo creciente de moléculas bioactivas de síntesis o semisíntesis.

Para dar una idea de la magnitud del problema que los compuestos xenobióticos representan, se ha estimado que el número de sustancias químicas sobre la Tierra asciende a alrededor de 16 millones, de las cuales aproximadamente cien mil se comercializan o emplean cotidianamente en actividades productivas. Al número de compuestos químicos existentes se agregan mil nuevas moléculas por año, cuyo conocimiento acerca de su comportamiento y efecto sobre los diferentes ecosistemas es escaso o nulo.

Las aguas residuales provenientes de las industrias contienen un gran número de contaminantes, que pueden ser separados o eliminados utilizando diversos métodos de tratamiento, desde físicos usando rejillas y cribas, hasta sofisticados tratamientos biológicos o químicos. Según el principio de infalibilidad microbiana de Alexander (1994), todos los

compuestos orgánicos de origen natural pueden ser degradados por microorganismos, por lo que resulta factible buscar métodos biológicos eficientes para su eliminación, los cuales son más económicos que los métodos químicos o catalíticos.

Sin embargo, cuando en un efluente se encuentran compuestos orgánicos xenobióticos, el efluente no puede ser tratado con los métodos tradicionales. La presencia de estas sustancias en plantas convencionales de tratamiento biológico de aguas residuales impide el funcionamiento adecuado de dichos sistemas, ya que por lo general son compuestos escasamente biodegradables; además, suelen ser tóxicos e inhibidores de la actividad de los microorganismos responsables del tratamiento. Por añadidura, la acción biológica sobre algunas moléculas puede resultar en productos aún más tóxicos que la molécula de origen. Por estas razones, es imperante encontrar sistemas de tratamiento adecuados para estas moléculas, y promover así su degradación total en compuestos inorgánicos (CO_2 y agua en condiciones aerobias).

Por tal motivo, en el presente trabajo se plantea estudiar la eliminación por vía microbiológica de un compuesto xenobiótico, el fenol, en aguas residuales de origen urbano, utilizando para tal efecto, un reactor discontinuo alimentado (SBR).

Este trabajo se organizó de la siguiente manera. En el capítulo 2 se presenta una revisión bibliográfica acerca de las características moleculares del fenol, las rutas de biodegradación conocidas y los modelos cinéticos reportados por otros investigadores, entre otros temas. Posteriormente, en los capítulos 3 y 4, se presenta el planteamiento del problema y su justificación, así como los objetivos fijados en este trabajo, respectivamente. En el capítulo 5 se describen los materiales y métodos usados durante el trabajo experimental. A continuación, en el capítulo 6, se detallan y discuten los resultados obtenidos respecto a las poblaciones microbianas adaptadas que se obtuvieron, su comportamiento, el modelado cinético y las simulaciones realizadas con el modelo, así como el funcionamiento y análisis del proceso de tratamiento biológico. Y finalmente, en el capítulo 7, se presentan las conclusiones generadas a partir del desarrollo de este trabajo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El fenol como contaminante del agua

El fenol fue aislado por primera vez en 1834 a partir del alquitrán de carbón, el cual constituyó la principal fuente explotada de este compuesto hasta la Primera Guerra Mundial; posteriormente, la producción se llevó a cabo mediante síntesis química y la utilización de catalizadores. El fenol se produce también de manera natural, pues se encuentra en la lignina, y como resultado de la descomposición de materia orgánica o de la degradación de pesticidas clorofenoxicarboxílicos y organofosforados (Lacorte y Barceló, 1995).

El fenol es un producto químico ampliamente usado en la producción de bisfenol-A, que es un intermediario en la producción de resinas epóxicas y fenólicas, la cual ocupa el 70% del fenol producido. Otros usos, con aproximadamente el 25% del total de la producción de fenol, son la Síntesis de caprolactamas, anilina, alquilfenoles y xilenoles. Alrededor de 1% de la producción se destina a otros usos, tales como agente desinfectante y la preparación de medicinas (ungüentos, gotas para oídos y nariz, lociones antisépticas, entre otros; ATSDR, 1998).

La estructura básica de los compuestos fenólicos (Figura 2.1) es el benceno, un anillo aromático de 6 átomos de carbono. La molécula de benceno y sus derivados son menos reactivos y por lo tanto más estables que los compuestos de cadena simple o alifáticos. La localización de sustituyentes en el anillo de benceno afecta significativamente la reactividad de la molécula; estos cambios en estructura y reactividad ejercen gran influencia sobre la biodegradabilidad de esta familia de compuestos (Rodríguez, 2003).

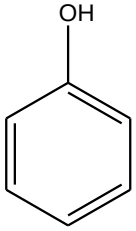


Figura 2.1. Estructura química del fenol

2.1.1 Propiedades físicas y químicas

En la tabla siguiente se muestran algunas de las propiedades físicas y químicas del fenol (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Propiedades físicas y químicas del fenol (OCDE, 2003; Rodríguez, 2003).

Propiedad	
Punto de fusión (°C)	41
Punto de ebullición (°C)	182
Densidad d_4^{20} (gr/cm^3)	1.049
Solubilidad 25 °C (%)	8.7
Coeficientes de partición:	
Log K_{ow}	28.840
Log K_{oc}	52
Presión de vapor a 25 °C (Pa)	47

K_{ow} = Coeficiente octanol/agua,

K_{oc} = Coeficiente de partición octanol/carbono.

2.1.2 Fuentes de emisión

El fenol es liberado al ambiente como resultado de su manufactura y uso, de la quema de madera, tanto intencional como accidental (incendios forestales), así como de la degradación natural de materia orgánica y algunos insecticidas.

De forma antropogénica, los compuestos fenólicos son generados por plantas de carbón, refinerías e industrias que procesan resinas, plásticos, tintas, colorantes, industrias farmacéuticas, entre otras. Debido a su amplio uso, el fenol es considerado un contaminante común de las aguas residuales domésticas, industriales y agrícolas (ATSDR, 1998).

2.1.3 Destino y efectos ambientales

La alta solubilidad del fenol hace que los vapores liberados hacia la atmósfera sean atrapados por la lluvia, ocasionando el transporte de fenol desde zonas industriales hacia el campo, ríos y mares (Rodríguez, 2003). Debido a que el pKa del fenol es 9.68, éste se encontrará en mayor proporción disociado en medios acuáticos naturales, por lo que su transporte hacia otras esferas ambientales dependerá del pH del medio (ATSDR, 1998).

El transporte intercompartimental del fenol ocurre de la siguiente manera: el fenol liberado al medio ambiente, regularmente en fase gaseosa, es lavado por la lluvia y llevado vía deposición húmeda y lixiviación a través del suelo. La evaporación tiende a ser lenta en el agua. Aunque el fenol no es muy persistente en aire, agua superficial u oceánica e incluso en suelo, reacciona fotoquímicamente, teniendo un tiempo de vida media de algunas horas; en cambio, su degradación por vía biológica, es de aproximadamente 2 días.

Tomando en cuenta que el fenol absorbe luz en la región de 290 a 333 nm, es factible su fotooxidación en superficies acuáticas. El fenol es biodegradable en aguas naturales siempre y cuando su concentración no sea muy alta y provoque inhibición en los microorganismos responsables de su descomposición; así mismo, ésta se ve afectada cuando la concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos es alta (WHO, 1994).

El fenol puede ser convertido por bacterias, bajo condiciones aerobias, en CO_2 y H_2O, mientras que en condiciones anaerobias puede transformarse en CO_2 y CH_4. El catecol, *cis-cis* muconato, β-cetoadipato, succinato y acetato son algunos de los intermediarios en la biodegradación del fenol (§ 2.2.2; Rodríguez, 2003).

El tiempo de vida media por degradación biológica en medios lacustres es de 1 día y de 9 en estuarios. Por vía fotoquímica la oxidación de fenol producida por radicales peróxido es de aproximadamente 19 horas, y la constante de velocidad para la reacción del fenol con O_3 en agua es de 1.5×10^{-5} a 6×10^{-5}. Aunque el nivel de bioacumulación del fenol es muy bajo, éste es considerado tóxico para los organismos acuáticos (ATSDR, 1998).

2.1.4 Efectos en la salud humana

La introducción de fenol al organismo por cualquier vía ocasiona diferentes efectos nocivos, que van desde daños sistemáticos hasta la muerte. A continuación se presentan algunos de ellos.

2.1.4.1 Efectos cardiovasculares

Vía inhalación, los principales efectos cardiovasculares por exposición indirecta al fenol son arteriosclerosis y isquemia del corazón (ATSDR, 1998).

2.1.4.2 Efectos gastrointestinales

Efectos como anorexia, pérdida del apetito, náuseas y exceso en la producción de saliva son algunos de los daños provocados a personas por el uso de un aerosol de ácido carbólico (1:40 fenol/agua) usado como antiséptico en salas de operación a mediados del siglo XIX (ATSDR, 1998).

2.1.4.3 Efectos hematológicos

Estudios en humanos han demostrado que la exposición a fenol se refleja en la concentración de células sanguíneas. Se ha reportado 30% de incremento de eosinófilos, 25% más de monocitos y un decremento del 70% de eritrocitos (ATSDR, 1998).

2.1.4.4 Efectos musculoesqueléticos

Se han reportado casos de dolor muscular y debilidad en individuos con exposición crónica intermitente vía inhalación y por contacto dérmico de soluciones de fenol, cresol y xilenol (ATSDR, 1998).

2.1.4.5 Efectos renales

En caso de envenenamiento por fenol se produce un oscurecimiento de la orina, además de la aparición de glucosa en la misma (ATSDR, 1998).

2.1.4.6 Efectos dérmicos

Los daños ocasionados por el fenol se observan por coloración o pigmentación de la piel alrededor de la nariz y pómulos (ATSDR, 1998).

2.1.4.7 Otros efectos

Diversas alteraciones en el organismo humano provocadas por la exposición al fenol son la pérdida progresiva de peso, que posteriormente se convierte en anorexia, dolor de cabeza, vértigo, entre otros, lo cual en algunos casos desencadenan la muerte de la persona. La dosis letal promedio para seres humanos reportada es de 140 mg/kg. A pesar de todos los efectos que el fenol produce a la salud humana, no existe evidencia acerca de su potencial cancerígeno (ATSDR, 1998).

A continuación, en la Figura 2.2 se muestra un resumen sobre los efectos del fenol en la salud humana.

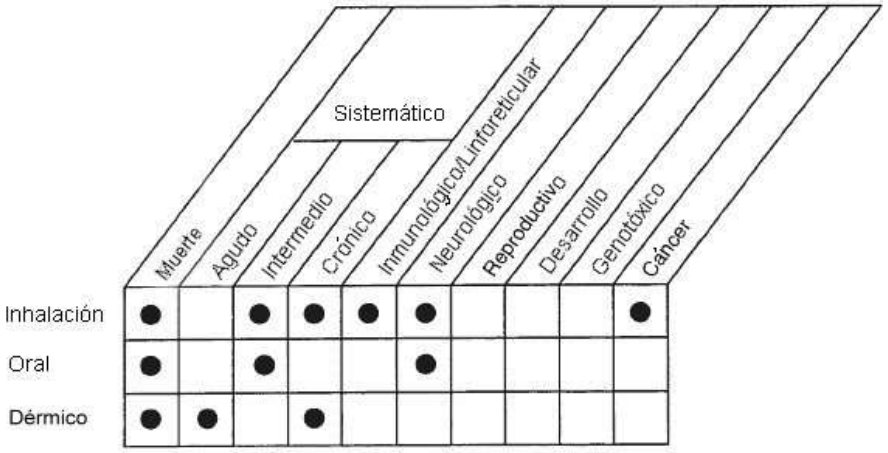


Figura 2.2. Efectos producidos por exposición al fenol (ATSDR, 1998).

2.1.4.8 Eliminación y excreción

Diversos estudios reportan que el fenol y sus formas conjugadas son un constituyente normal de la orina en concentraciones de 8.7 ± 2 mg/día. En la Figura 2.3 se muestra la ruta de eliminación en el organismo humano.

La Figura 2.3 muestra las rutas metabólicas que trasforman al fenol antes de su excreción en la orina. Existen tres sistemas de enzimas encargadas de catalizar las reacciones de transformación de fenol, la fenol sulfotransferasa, UDP-glucoronosil transferasa, y glutatión-5-transferasa. Estas enzimas se encuentran en diferentes tejidos, lo que provoca competencia entre éstos no sólo por el fenol sino por sus productos de oxidación, como la hidroquinona. En consecuencia, la cantidad de productos formados puede variar en base a la especie, la dosis y la ruta de administración. *In vivo*, el tracto gastrointestinal, el hígado, los pulmones y los riñones son los tejidos donde existe mayor conjugación de compuestos fenólicos simples (ATSDR, 1998).

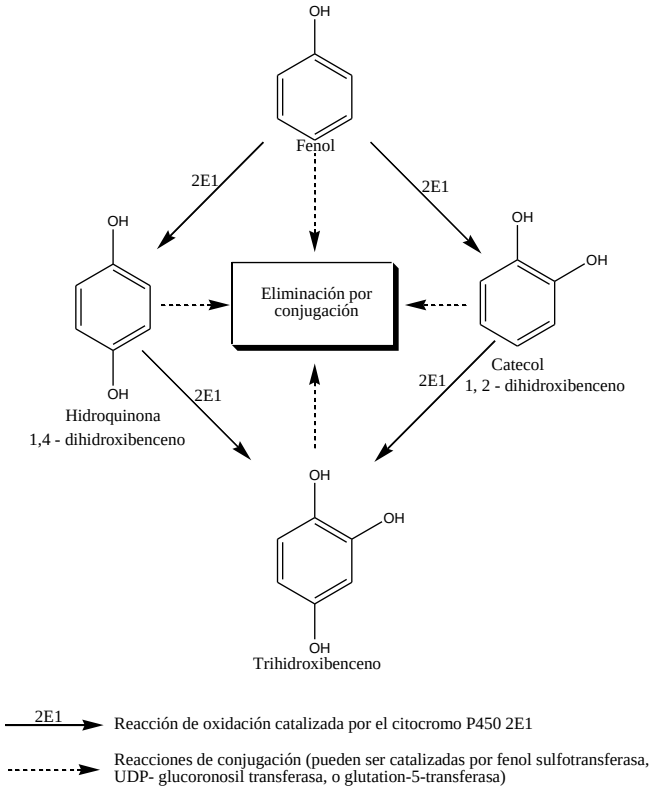


Figura 2.3. Ruta metabólica de eliminación de fenol (ATSDR, 1998).

2.1.5 Legislación ambiental en el medio acuático

Debido a los problemas que ocasiona el fenol, tanto al hombre como a los diferentes ecosistemas, se han establecido diferentes normas, leyes y reglamentos sobre su uso, así como sobre el manejo y disposición de los residuos que lo contengan.

En México, los criterios ecológicos de la calidad del agua establecen para el fenol una concentración máxima de 0.001 mg/l en agua de uso recreativo con contacto primario. En cuanto a la protección a la vida acuática, se ha establecido una concentración máxima de 0.1 mg/l en agua dulce y de 0.06 para agua marina; en lo concerniente al agua potable, se ha fijado un valor guía de 0.3 mg/l para fenoles o compuestos fenólicos (DOF, 1989).

En el ámbito internacional, la EPA ha establecido una concentración límite de 4 mg/l para el agua potable de consumo diario; en el ámbito de protección a la vida acuática, el criterio de calidad es de 3.5 mg/l (ATSDR, 1998).

2.1.6 Métodos de tratamiento

Existen diferentes tipos de tratamiento para la eliminación del fenol, que pueden ser fisicoquímicos o biológicos. A continuación se describen algunos de ellos.

2.1.6.1 Tratamientos fisicoquímicos

2.1.6.1.1 Incineración

Este método es muy usado para tratar pequeñas cantidades de agua residual pero con altas concentraciones de contaminantes; sin embargo, presenta un problema en cuanto a su elevado costo económico. Aun así, algunas empresas usan este método; un ejemplo es la industria textil, cuyos desechos incluyen compuestos fenólicos provenientes de pigmentos y colorantes (Hernández *et al.*, 1998).

2.1.6.1.2 Oxidación húmeda

Este tipo de oxidación es realizada en fase acuosa en presencia de aire u oxígeno a presión y temperatura alta (20 a 200 bar, 150 a 350 °C). Las condiciones dependen de la naturaleza del compuesto a tratar y tiene un porcentaje de remoción del 75 al 90 % de DQO (Demanda Química de Oxígeno). Los resultados experimentales han demostrado que el tratamiento de

fenol y sus derivados por esta vía es muy efectivo, con alrededor del 90% de remoción (Rodríguez, 2003).

2.1.6.1.3 Oxidación química

La oxidación química es un proceso por el cual los electrones son transferidos de una sustancia a otra. Existen diferentes oxidantes químicos, tales como el O_3, luz U.V., H_2O_2, $KMnO_4$, OH^- y en algunos casos mezclas de éstos. El ozono es uno de los principales agentes oxidantes utilizados para el tratamiento de efluentes que contienen compuestos orgánicos como ácidos carboxílicos, fenoles, aminoácidos y compuestos organometálicos (Hernández *et al*., 1998). Sin embargo esta técnica de depuración tiene algunos inconvenientes; uno de ellos es que al tratar caudales de agua muy elevados se emplea demasiado agente oxidante, o lo que es igual, se elevan los costos del proceso. En cuanto al tratamiento de fenol, el efluente no debe contener una carga contaminante muy alta (inferior a cientos de ppm). Otro inconveniente es que al oxidarse el fenol utilizando ozono se producen hasta 22 productos intermediarios (García-Ochoa y Santos, 2001).

2.1.6.1.4 Oxidación catalítica

Como es bien sabido, el uso de catalizadores incrementa la eficiencia de los procesos químicos, por lo cual se han empleado diferentes catalizadores para el tratamiento de aguas residuales o de desechos que contengan fenol.

Para el tratamiento de algunos clorofenoles se ha encontrado que el platino soportado sobre Al_2O_3 y TiO_2 es una de las mejores opciones; en cuanto al fenol, el CuO solo o en combinación con otros óxidos, es el agente catalítico más activo a temperaturas entre 160-250 °C (García-Ochoa y Santos, 2001).

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la oxidación catalítica del fenol es vía radicales libres (Figura 2.4); cabe señalar que en dicha ruta existen varias similitudes con el proceso biológico (§ 2.2.2). Las principales variables que afectan la velocidad de oxidación del

fenol son el pH, la temperatura, la presión de oxígeno y la adición de agentes iniciadores de radicales libres (García-Ochoa y Santos, 2001).

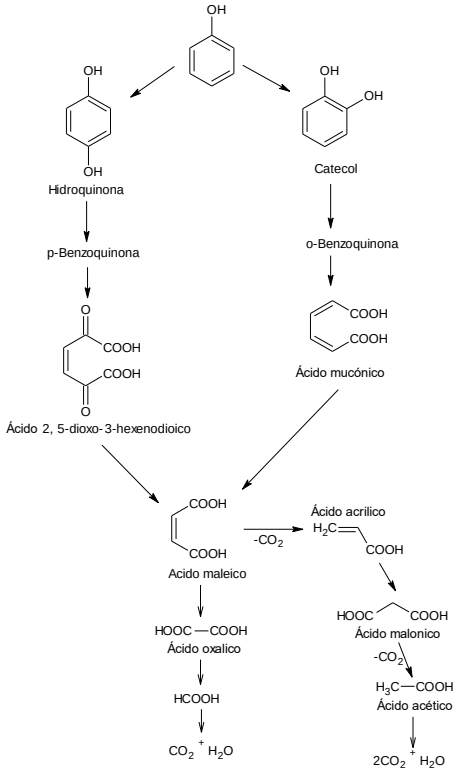


Figura 2.4. Ruta simplificada de la oxidación catalítica del fenol (García-Ochoa y Santos, 2001).

2.1.6.2 Tratamientos biológicos

Los tratamientos biológicos, muy utilizados por sus bajos costos y altas eficiencias, constituyen otra manera de eliminar moléculas orgánicas; pueden ser aerobios o anaerobios, y cada una de estas modalidades presenta distintas ventajas e inconvenientes. A continuación se describen algunos tratamientos biológicos aerobios que han sido utilizados para la remoción de fenol en agua.

Watanabe *et al.* (1996) emplearon un proceso de lodos activados utilizando un tanque de aireación de 5 l equipado con un sistema en línea para el monitoreo de OD (oxígeno disuelto) y pH acoplado a un tanque de sedimentación con una capacidad de 3 l. Los lodos

activados utilizados fueron extraídos de una planta de tratamiento de aguas residuales de una refinería. El proceso de adaptación consistió en la alimentación de 0.3 g/l·d de fenol durante un mes. A partir de los datos de biodegradación obtenidos durante la adaptación y su ajuste a un modelo de Haldane (§ 2.3.2), calcularon la carga máxima para el reactor, que fue establecida en 4 $kg/m^3 \cdot d$ de fenol. Para comprobar los resultados teóricos en el reactor, incrementaron la carga de fenol progresivamente desde 0.3 a 1, 2, 4, 8 $kg/m^3 \cdot d$. Así, la carga máxima real obtenida fue de 2 $kg/m^3 \cdot d$ de fenol, que es sólo la mitad de la carga predicha por el modelo de Haldane. Una de las variables que no fueron contempladas fue la producción de metabolitos intermediarios posiblemente inhibitorios en el proceso de biodegradación de fenol, lo cual pudo influir en este proceso al disminuir considerablemente su rendimiento.

En algunos estudios se ha optado por tratar el fenol con cultivos puros de microorganismos para su degradación; uno de estos estudios es el reportado por Komarkova *et al.* (2003), quienes utilizaron una cepa de *Candida tropicalis* C12 aislada de los lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales industriales. Se utilizó un biorreactor a escala con capacidad de 1.5 l, con alimentación tipo *fed batch*; el pH de trabajo del reactor fue de 5.2 y la concentración de fenol utilizada fue de 100 mg/l. Los resultados obtenidos en este estudio muestran el comportamiento de los microorganismos durante la degradación del fenol. La enzima fenol hidroxilasa es la que se encarga de iniciar la degradación; cuando la actividad de la enzima decae, los microorganismos, en un segundo paso, utilizan sus materiales de reserva para completar la oxidación del fenol a CO_2 y H_2O. Otra observación que este estudio arroja es que bajo condiciones de estrés alimenticio, es decir con bajas concentraciones de nutrientes o en un medio limitante, las células producen metabolitos extracelulares, los cuales pueden inhibir el proceso de respiración. En consecuencia, la actividad de la enzima encargada de iniciar el proceso de degradación decae, con lo que disminuye la velocidad de degradación del fenol y muere una parte de la población microbiana.

En el estudio realizado por Léonard *et al.* (1999), se utilizó una cepa bacteriana de *Ralstonia eutropha* para la biodegradación de fenol, así como 3 tipos de cultivo (*fed batch*,

batch y quimiostato). El cultivo en *fed batch* fue automatizado y monitoreado en línea mediante el acoplamiento de un computadora personal, bombas peristálticas para controlar el llenado y vaciado de los reactores, unidades de filtración, control de agitación, pH, temperatura y oxigeno disuelto, además de un espectrofotómetro encargado de monitorear en tiempo real un metabolito intermediario de la degradación del fenol, el semialdehído 2-hidroximucónico (2–hmas; § 2.2.2). Como resultado, se modeló el comportamiento del intermediario inhibitorio 2-hmas, y se consiguió una alta carga de fenol biodegradado (9.3 kg de fenol/m^3·d). Sin embargo, el modelo presentado en este estudio tiene la desventaja de considerar un cultivo puro, cuyo desempeño difícilmente puede ser extrapolado a sistemas de tratamiento a mayor escala, como por ejemplo a una planta de tratamiento de aguas residuales industriales. La presencia de otros microorganismos, ubicuos en las aguas residuales, modificaría el comportamiento del proceso predicho por el modelo.

2.2 Biodegradación del fenol

2.2.1 Fases del crecimiento bacteriano

La evolución de una población bacteriana en funcion del tiempo se puede representar como la curva de la Figura 2.5, en la que pueden distinguirse cuatro fases.

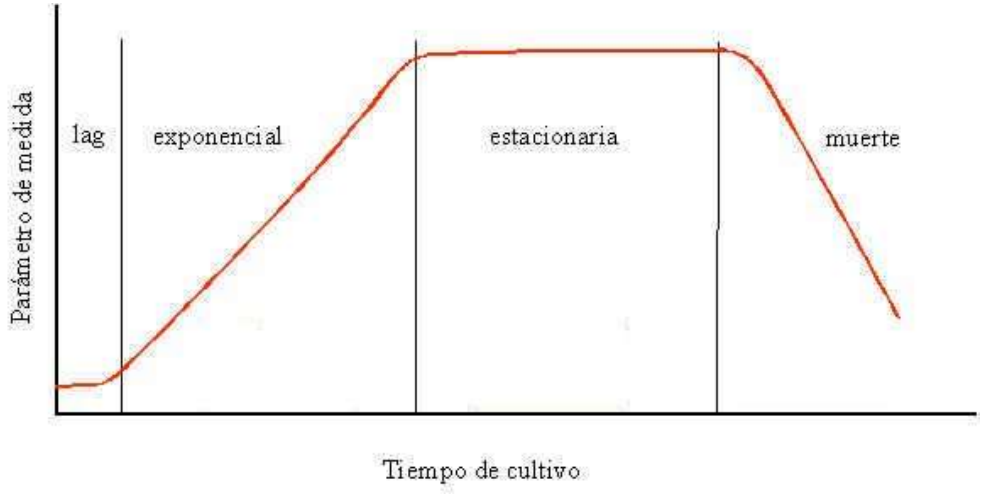


Figura 2.5. Curva de crecimiento bacteriano

La primera región se caracteriza por la baja tasa de reproducción bacteriana y es llamada fase *lag* la cual es debida a la aclimatación de los microorganismos al substrato. Posteriormente viene un periodo de rápido crecimiento, este es conocido como fase *log* o exponencial, durante la cual la población duplica su tamaño en un intervalo de tiempo llamado tiempo de generación.

Cuando la fase *log* termina, comienza la fase estacionaria debida a un factor limitante. Los factores típicos que limitan el crecimiento son el agotamiento de los nutrientes esenciales, liberación de material tóxico o inhibitorio y el consumo del oxígeno. Durante la fase estacionaria, el número de células viables sigue siendo prácticamente constante. Por último, después de la fase estacionaria, las bacterias comienzan a morir, a lo que se conoce como fase de muerte o de lisis celular.

2.2.2 Biodegradación aerobia

Los procesos de tratamiento biológico de la materia orgánica se basan en la utilización de ésta como fuente de carbono y/o de energía por parte de ciertos microorganismos. El estudio de la biodegradación de compuestos fenólicos por vía aerobia ha demostrado que existe una ruta metabólica común para este tipo de compuestos y aun para aquéllos no tan cercanos a la familia de los compuestos fenólicos, como son los bifenilos (Autenrieth *et al*., 1991). En esta etapa se consume oxígeno y por acción de la enzima fenol monooxigenasa se adiciona un grupo $^{-}$OH al anillo fenólico, dando como resultado la formación de catecol. El anillo del catecol puede ser roto de dos maneras distintas; es decir, existen dos rutas de biodegradación posibles, la ruta *orto* y la ruta *meta*.

En la ruta *orto* (Figura 2.6A), existe ruptura del enlace 1–2 del catecol y se produce el ácido mucónico, mientras que en la ruta *meta* la ruptura del anillo ocurre entre los carbonos 2–3, dando como resultado el semialdehído 2-hidroximucónico (Figura 2.6B).

En bacterias, los genes que codifican las enzimas de la ruta *meta*, las cuales son energéticamente más eficientes, por lo general son parte de plásmidos grandes tales como el TOL, mientras que los que codifican las enzimas de la ruta *orto* se encuentran en su mayoría localizados en el DNA (Heesche-Wagner *et al*., 1999). Las enzimas de la vía *meta* pueden degradar también catecoles metilados, por lo que se han estudiado ampliamente por su papel en el catabolismo de hidrocarburos tales como tolueno y el xileno (Harwood y Parales, 1996).

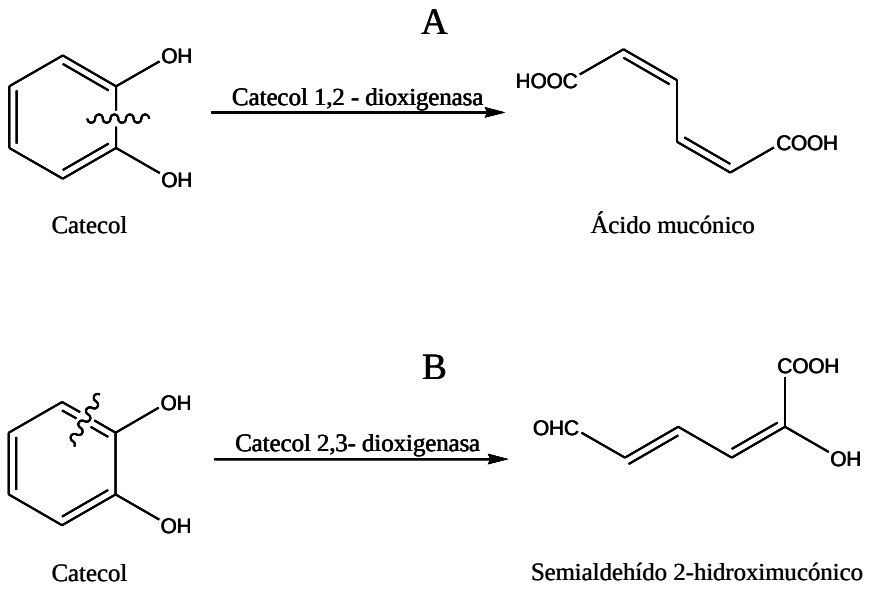
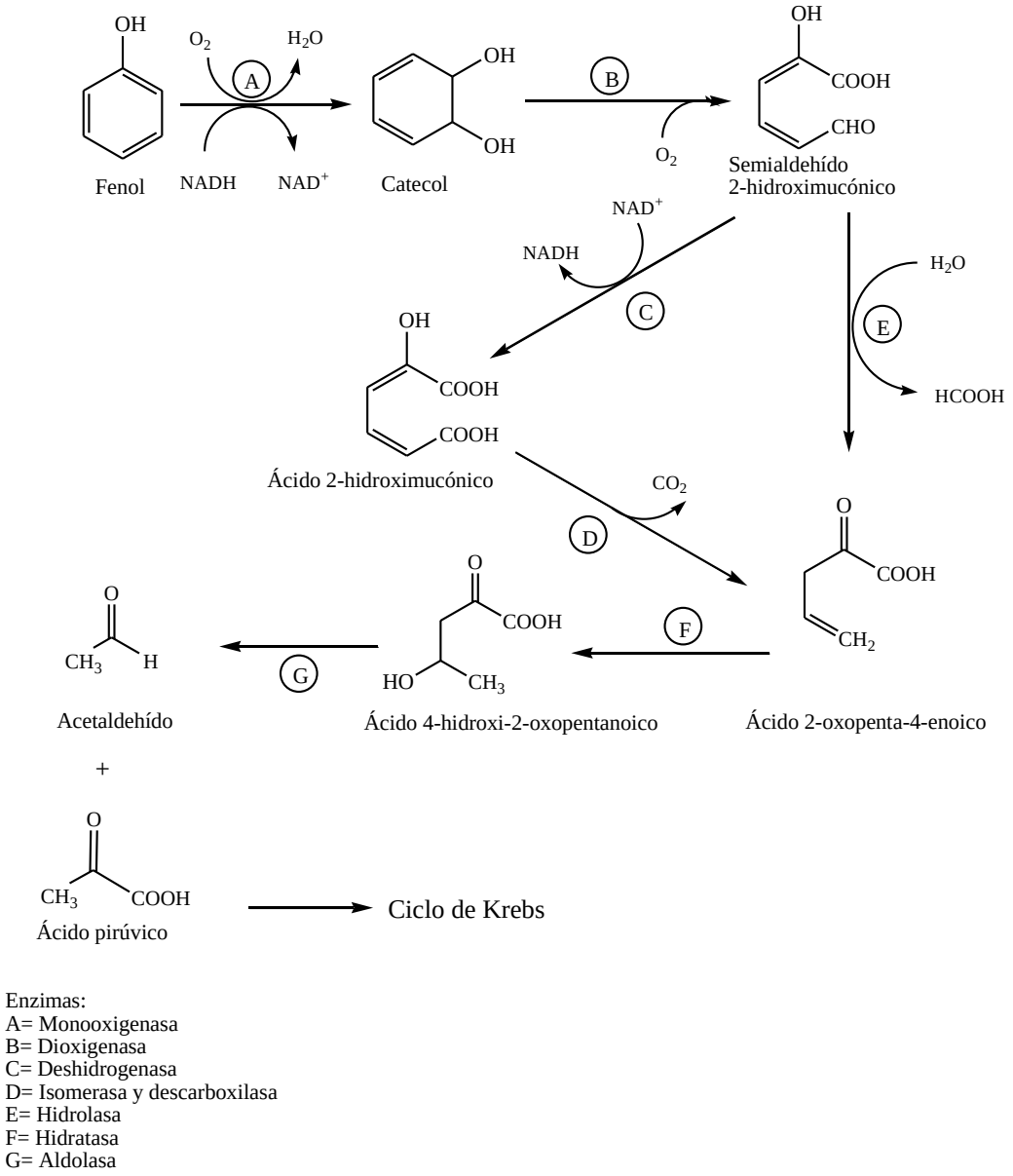


Figura 2.6. Rupturas *orto* (A) y *meta* (B) del anillo fenólico

La ruta *meta* es muy común en el metabolismo de bacterias, microalgas y hongos de diversos tipos (Semple y Cain, 1996; Heesche-Wagner *et al*., 1999). En esta ruta, tras la ruptura del catecol catalizada por la enzima catecol 2,3-dioxigenasa, el 2-hmas puede degradarse en dos formas distintas (Figura 2.7; Bugg y Winfield, 1998). En la primera, el 2-hmas se oxida para dar ácido 2-hidroximucónico, que posteriormente es descarboxilado a través de la acción de dos enzimas, una isomerasa y una descarboxilasa, para dar el ácido 2-oxopenta-4-enoico. Alternativamente, el 2-hmas puede fraccionarse por hidrólisis para producir los ácidos fórmico y 2-oxopenta-4-enoico. Después, este último es degradado por hidratación a ácido 4-hidroxi-2-oxopentanoico y después a acetaldehído y ácido pirúvico por medio de una aldolasa. Estos productos siguen oxidándose al incorporarse al ciclo de Krebs (Ramírez, 2005).



Enzimas:
A= Monooxigenasa
B= Dioxigenasa
C= Deshidrogenasa
D= Isomerasa y descarboxilasa
E= Hidrolasa
F= Hidratasa
G= Aldolasa

Figura 2.7. Ruta *meta* de biodegradación aerobia de fenol (Shalaby, 2003; Bugg y Winfield, 1998)

En lo que respecta a la vía *orto*, ésta se encuentra distribuida en diversas bacterias, levaduras y hongos (Harwood y Parales, 1996). Sin embargo, a pesar de su amplia distribución taxonómica, sólo se le ha identificado en microorganismos del suelo, particularmente en grupos bacterianos asociados a plantas. Frecuentemente concurre en bacterias que presentan la vía *meta* codificada en plásmidos. Asimismo, existen variantes de esta ruta en las especies que degradan compuestos aromáticos clorados (Ramírez, 2005).

2.2.3 Biodegradación anaerobia

En un medio, las condiciones anaerobias prevalecen cuando la velocidad de consumo de oxígeno por parte de los microorganismos sobrepasa su velocidad de difusión en el medio o cuando ésta es nula. La fermentación y la respiración anaerobia constituyen los dos mecanismos básicos del catabolismo anaerobio de compuestos orgánicos.

El metabolismo de los ciclos aromáticos puede llevarse a cabo en anaerobiosis, y permite la ruptura del anillo sin la participación del oxígeno. Aunque el anillo bencénico es una estructura química muy estable, puede ser reducido por hidrogenación completa, hidroxilado por deshidratación y posteriormente romperse por un proceso enzimático no oxidativo (Figura 2.8).

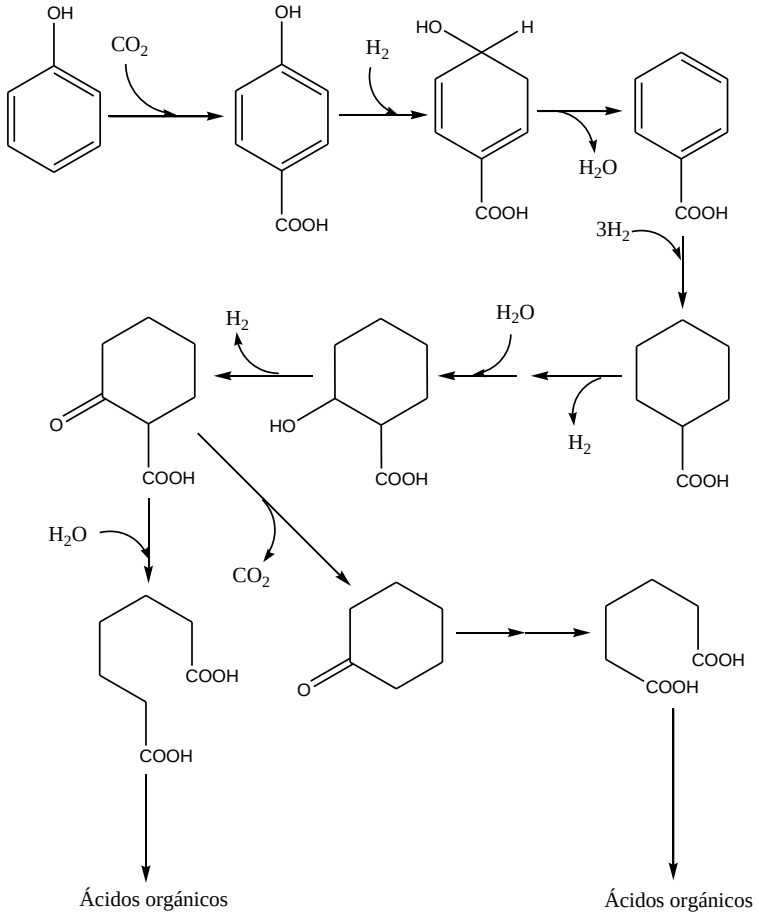


Figura 2.8 Ruta de biodegradación anaerobia del fenol
(Evans y Fuchs, 1988; Borraccino, 1997)

2.3 Modelos de biodegradación

Un modelo cinético microbiano se compone de balances de materia, al menos de la biomasa y del sustrato primario que limita la velocidad de crecimiento de ésta. Considérese un bioreactor con volumen *V* que recibe un flujo que con una concentración *Sa* de un sustrato orgánico y suficientes nutrientes inorgánicos, de modo que la fracción orgánica sea vuelve el sustrato limitante. La concentración del sustrato de entrada, al igual que el pH, temperatura y otras condiciones ambientales se consideran constantes.

Dentro del reactor, la biomasa heterotrófica (*X*) utiliza el sustrato como su fuente de alimento, de tal forma que el crecimiento de la biomasa se refleja en la reducción en la concentración de sustrato *S*. Para describir la dinámica del reactor, las ecuaciones del equilibrio global se deben representar en función del balance de masa de cada uno de los constituyentes de importancia. Lo anterior se expresa de la siguiente forma:

$$Variación = Entrada - Salida + Producción - Consumo - Dilución \tag{2.1}$$

Si utilizamos C_A para representar la concentración de la masa del constituyente *A* en el reactor, la ecuación del equilibrio es:

$$\left(\frac{dC_A}{dt}\right)V = QC_{A0} - Q_w C_A + r_A \cdot V \tag{2.2}$$

Para convertir la ecuación de equilibrio másico en función de la concentración de los constituyentes, utilizamos la relación de densidad y tomando en cuenta que el reactor opera en modo fedbatch (*i.e.* no existe flujo de salida), la ecuación quedaría de la siguiente forma:

$$\frac{dC_A}{dt} = \frac{Q}{V}[C_{A0} - C_A] + r_A \tag{2.3}$$

Para el sistema bajo estudio, se considera que el reactor recibe un substrato S_1, el cual es consumido por la biomasa X. La biomasa produce metabolitos intermediarios S_2, los cuales utiliza como substrato, una vez que la concentración de S_1 se vuelve un factor limitante.

Las tasas de crecimiento microbiano, así como de consumo de substratos y de producción de metabolitos intermediarios se consideran proporcionales a la concentración de X en el reactor. Por lo tanto, para cada uno de los constituyentes (X, S_1 y S_2) se considera:

Para S_1: $A_0 = S_0$, $r_A = q_{S1}(S_1, S_2)\, X$ (2.4)

Para X: $A_0 = X_0$, $r_A = \mu(S_1, S_2)\, X$ (2.5)

Para S_2: $A_0 = 0$, $r_A = [\nu_{S2}(S_1, S_2) - q_{S2}(S_1, S_2)]\, X$ (2.6)

Para completar las ecuaciones, deben proporcionarse expresiones para el crecimiento de la biomasa y el consumo de sustrato. Una vez seleccionado el modelo más apropiado, deben determinarse los valores de las constantes cinéticas. Tal determinación puede ser experimental, o bien mediante un algoritmo basado en técnicas no lineales de ajuste por mínimos cuadrados. Algunas de las expresiones cinéticas más comunes se presentan en las secciones siguientes.

2.3.1 Modelo de Monod

La relación más frecuentemente utilizada para representar la cinética de crecimiento microbiano es la llamada ecuación de Monod. Esta expresión (ecuación 2.7) relaciona la velocidad específica de crecimiento de los microorganismos (μ) con la concentración de un sustrato limitante (S),

$$\mu = \left(\frac{dX}{Xdt}\right) = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \tag{2.7}$$

Donde:

μ = Velocidad específica de crecimiento microbiano [h^{-1}]

X = Concentración de biomasa [g/l]

t = Tiempo [h]

μ_{max} = Velocidad específica máxima de crecimiento microbiano [h^{-1}]

S = Concentración de sustrato limitante del crecimiento [g/l]

K_S = Constante de afinidad o de saturación media [g/l]

La ecuación de Monod proporciona una transición suave desde una relación de primer orden respecto a bajas concentraciones de S a una relación de orden cero a concentraciones elevadas. Dado que a altas concentraciones de sustrato la velocidad de crecimiento se aproxima a un máximo (Figura 2.8), a la expresión de Monod también se le conoce como función de saturación. El valor de K_S representa la afinidad microbiana por el sustrato orgánico que soporta el crecimiento; así, los valores reducidos de K_S indican que los microorganismos necesitan una concentración reducida de dicho sustrato para alcanzar la velocidad máxima de crecimiento, por lo que su afinidad es elevada (Ramírez, 2005).

Dado que el objetivo principal de cualquier proceso de biodegradación es la eliminación del sustrato, comúnmente la ecuación de Monod toma la siguiente forma (ecuación 2.8):

$$q_S = \frac{q_{s\max} S}{K_S + S} \tag{2.8}$$

Donde:

q_s = Velocidad específica de consumo de sustrato [h^{-1}]

q_{smax} = Velocidad específica máxima de consumo de sustrato [h^{-1}]

El consumo de sustrato y el crecimiento de la biomasa están relacionados por la ecuación 2.9,

$$q_s = \frac{\mu}{Y} \tag{2.9}$$

Donde:

Y = Rendimiento de producción de biomasa [g células/g sustrato]

2.3.2 Modelo de Haldane–Andrews

Las velocidades de utilización del sustrato y del crecimiento microbiano pueden reducirse por la presencia de compuestos inhibitorios, tales como metales pesados, antibióticos o pesticidas. La variedad de posibles inhibidores y sus diferentes efectos sobre los microorganismos puede convertir la inhibición en un concepto difuso (Rittmann y McCarty, 2001). En algunos casos, el inhibidor sólo afecta a una enzima que participa en la oxidación del sustrato; en tales casos, el consumo de dicho sustrato se reduce. En otros, el inhibidor afecta alguna función general de la célula, como la respiración, y puede inducir la muerte celular (Ramírez, 2005).

La autoinhibición es un tipo de inhibición muy común, el cual es también llamado inhibición por el sustrato, que exhibe una gran variedad de moléculas. En este caso, la degradación del sustrato es disminuida por la elevada concentración del mismo. La mayoría de las veces esta inhibición se debe a que los complejos enzima-sustrato que se forman ya no sufren posterior degradación (Autenrieth *et al*., 1991). Tales cinéticas de biodegradación suelen representarse con el modelo de Haldane–Andrews, el cual relaciona la velocidad del crecimiento microbiano con la concentración del sustrato inhibitorio (ecuación 2.10).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + (S^2 / K_i)} \tag{2.10}$$

Donde:

K_i = Constante de inhibición o de Haldane [g/l]

La figura 2.9 muestra el efecto de inhibición por el sustrato en el crecimiento de la biomasa. A concentraciones bajas de sustrato, la velocidad de crecimiento aumenta cuando S se eleva, siguiendo lo establecido por la ecuación de Monod. De hecho, cuando la constante de inhibición K_i se acerca al infinito la expresión de Haldane se aproxima a la de Monod. Sin embargo, las concentraciones de S superiores a la necesaria para alcanzar una velocidad de crecimiento máxima se vuelven inhibitorias, lo que ocasiona una disminución en la velocidad de crecimiento de la biomasa (Ramírez, 2005).

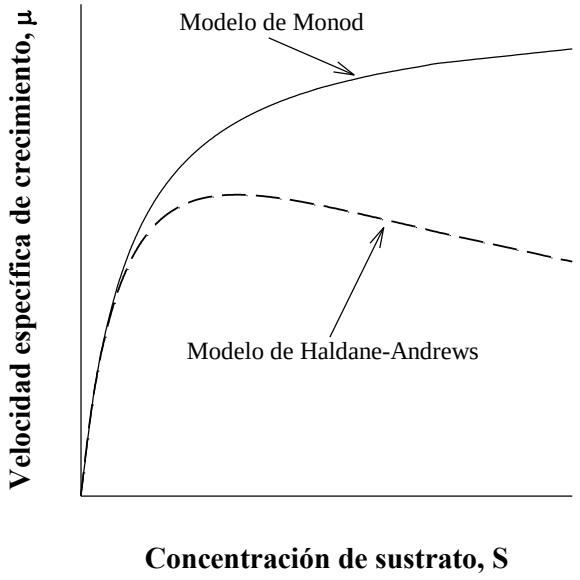


Figura 2.9. Relación entre S y μ en las cinéticas de Monod (línea continua) y de Haldane-Andrews (línea punteada)

2.3.3 Modelado de la biodegradación de fenol

Debido a que el fenol es un sustrato inhibitorio a concentraciones elevadas, y aunque existen algunas aplicaciones del modelo de Monod (Reardon *et al*., 2000), la ecuación de Haldane-Andrews (ecuación 2.10) ha sido la más utilizada para describir el crecimiento microbiano sobre fenol. En la tabla 2.2 se muestran algunos valores de las constantes cinéticas de este modelo reportados.

En varios estudios (Mörsen y Rehm, 1990; Léonard *et al*., 1999; Wang y Loh, 1999) se ha reportado que la ruta *meta* de biodegradación de fenol frecuentemente se acompaña de la acumulación de uno de los metabolitos intermediarios, el semialdehído 2-hidroximucónico (2-hmas; Figura 2.7). Dicha acumulación se ha correlacionado con la concentración de fenol y con la aparición de un color amarillento en el medio de cultivo (Mörsen y Rehm, 1990). Así, la medición espectrofotométrica de la intensidad de esta coloración ha permitido estimar la concentración de 2-hmas e incluso controlar la actividad metabólica de *R. eutropha* en procesos discontinuos alimentados (Léonard *et al*., 1999).

En virtud de lo anterior, Wang y Loh (1999) y Nuhoglu y Yalcin (2005) han propuesto modelos basados en la ecuación de Haldane-Andrews que integran la concentración inicial de fenol (S_0) en la expresión de crecimiento microbiano específico (ecuación 2.10). Estos modelos describen correctamente la cinética de biodegradación de fenol para un amplio rango de concentraciones iniciales de dicha molécula. Sin embargo, no consideran el crecimiento de la biomasa, de las bacterias de la especie *Pseudomonas putida* y lodos activados, respectivamente.

2.4 Reactores discontinuos de alimentación secuenciada (SBR)

El objetivo del tratamiento de aguas residuales es la protección de la calidad de las aguas receptoras y el cumplimiento de la legislación aplicable para la mezcla resultante. Esto se logra reduciendo la DBO_5, DQO, SST, nitrógeno, fósforo y los coliformes totales, entre otros parámetros. En la actualidad, existen diferentes configuraciones de plantas de tratamiento de efluentes por lodos activados, cada una con ventajas y desventajas bien definidas. Los sistemas de tratamiento de aguas residuales más utilizados se dividen en dos grandes grupos, los sistemas de tratamiento continuo y los discontinuos (Bretti-Mandarano, 2002).

Un reactor de alimentación secuenciada (*Sequencing Batch Reactor*, SBR por sus siglas en inglés) es un proceso secuencial de biomasa suspendida en el cual todas las etapas del

tratamiento ocurren en el mismo tanque. Los procesos biológicos que utilizan reactores discontinuos de alimentación secuenciada son procesos que contienen cultivos microbianos mixtos en suspensión, por lo que se denominan como procesos de lodos activados. Sin embargo, a diferencia del proceso de lodos activados clásico, el cual está orientado en relación al espacio, el proceso SBR se orienta respecto al tiempo, ya que tanto el flujo de influente como el volumen del reactor son variables, siguiendo una estrategia de funcionamiento previamente establecida (Buitrón, 1993).

Tabla 2.2. Constantes cinéticas reportadas para la biodegradación de fenol.

Autores	Microorganismos	Sistema	Concentración (mg/l)	Constantes del modelo de Haldane			*Y* [gcélulas/gfenol]	Otras condiciones
				μ_{max} [h^{-1}]	*Ks* [mg/l]	*Ki* [mg/l]		
Nuhoglu y Yalcin (2005)	Lodos activados adaptados	*Batch*	25 – 1450	0.143	87.45	107.06	0.60	25 ± 1°C
Kumar *et al.* (2005)	*Pseudomonas putida* MTCC 1194 adaptadas	*Batch*	10 – 1000	0.305	36.33	129.79	0.65	30 ± 0.3°C pH ~ 7.1
Feitkenhauer *et al*. (2001)	*Bacillus thermoleovorans* sp. A2 (termófila)	*Batch* *Fed batch*	100 – 500	1			0.8 – 1	
Reardon *et al*. (2000)	*P. putida* F1	*Batch*	≤ 54	0.11± 0.01	32.0 ± 2.4	–	0.80 ± 0.07	30°C
Monteiro *et al*. (2000)	*P. putida* DSM 548	*Batch*	1 – 100	0.436	6.19	54.1	–	26°C pH = 6.8
Wang y Loh (1999)	*P. putida* ATCC 49451	*Batch*	25 – 800	0.900	6.93	284.3	0.43 – 0.94	30°C
Léonard *et al*. (1999)	*Ralstonia eutropha*	*Batch/ quimiostato*	< 350	0.410	2	350	0.68	
Şeker *et al*. (1997)	*P. putida*	*Batch*	0.5 – 400	0.539	18.54	99.37	0.521	25°C
Kumaran y Paruchuri (1997)	Lodos activados	*Batch*	60 – 500	0.246	27.4	524	–	
Livingston y Chase (1989)	Cultivo mixto definido	*Batch*	0 – 500	0.418	2.90	370	0.60 ± 0.12	30°C 6.7 < pH < 6.9
D'Adamo *et al.* (1984)	Lodos activados adaptados	*Batch*	50 – 1000	0.131 – 0.363	5 – 266	142 – 1199	–	25 ± 2°C
Hill y Robinson (1975)	*P. putida* ATCC 17484	*Batch/ quimiostato*	0 – 700	0.534	0.015	470	0.52 ± 0.08	30°C 6.2 < pH < 6.7
Pawlowsky y Howell (1973)	Lodos activados no filamentosos	*Batch*	0 – 900	0.260	25.4	173.0	0.545 – 0.616	28 ± 0.5°C pH = 6.6

En su forma más simple, un sistema SBR está constituido por un recipiente que se llena con el agua residual durante un cierto período de tiempo el cual posteriormente funciona como un reactor discontinuo. Después del tratamiento requerido, la suspensión se decanta y el sobrenadante se elimina del recipiente. El ciclo de un sistema SBR se divide en cuatro períodos o fases: llenado, aireación o reacción, sedimentación y extracción o vaciado (Figura 2.10). La duración de cada una de las fases se determina con base en las características del agua residual a tratar y a los requerimientos de depuración del efluente (Ramírez, 2005).

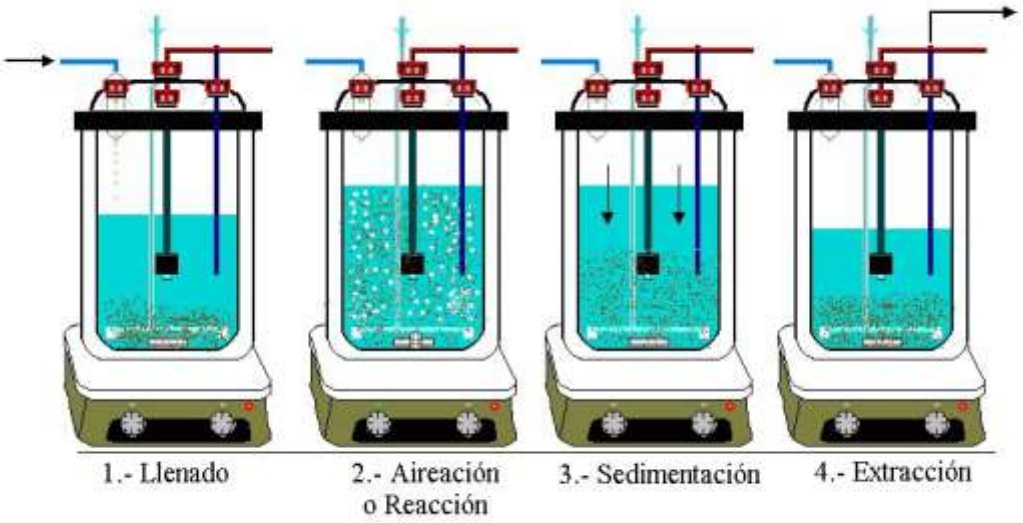


Figura 2.10. Etapas de funcionamiento de un reactor SBR.

Ketchum (1996) utilizó un SBR para tratar agua residual municipal, adaptándolo para maximizar la remoción de materia orgánica, sólidos suspendidos y nitrógeno. Después de un ciclo de 12 horas la concentración de DBO_5, SST y N amoniacal presentó una disminución del 98, 90 y 89%, respectivamente, demostrando su alta eficiencia (Mace y Mata, 2002).

2.4.1 Fases de tratamiento en un SBR

2.4.1.1 *Llenado*

El líquido a tratar es bombeado en forma uniforme para establecer buen contacto entre los microorganismos y el sustrato existente. Este período finaliza cuando se alcanza el tiempo máximo previsto para el ciclo o bien cuando el tanque está lleno. Es recomendable que el proceso de aireación comience en este período.

2.4.1.2 *Aireación o reacción*

En este período se producen todas las reacciones metabólicas por las cuales la biomasa consume la materia orgánica en presencia de oxígeno. Asimismo, en esta etapa algunos microorganismos mueren por falta de alimento, lo que ayuda a reducir el volumen de lodo a sedimentar. La duración de este período determina el porcentaje de eliminación de DBO_5 logrado.

2.4.1.3 *Sedimentación*

En esta fase se interrumpe la aireación, con lo cual se separan los sólidos por gravedad, básicamente como en un proceso normal de lodos activados. En el tratamiento SBR se elimina la necesidad de transferir los lodos del sedimentador al reactor por recirculación como sucedería en un sistema de tratamiento convencional.

2.4.1.4 *Extracción o vaciado*

Luego de un tiempo suficiente para producirse una buena separación entre el lodo sedimentado y el agua sobrenadante, se activa automáticamente una bomba de extracción. Este período se caracteriza por la eliminación del efluente tratado, logrando excluir los sólidos flotantes. La eliminación del líquido clarificado debe realizarse sin perturbar los lodos sedimentados.

Durante cualquiera de las fases pueden llevarse a cabo varias funciones, dependiendo de los objetivos del tratamiento. Por ejemplo, en función de estos objetivos, el llenado puede ser estático, con agitación o aireado. El llenado estático produce una concentración de substrato muy elevada al final de la etapa, mientras que el llenado con agitación, en presencia de

nitratos, induce la desnitrificación y la subsecuente reducción de la demanda de oxígeno, así como las condiciones anóxicas o anaerobias necesarias para la remoción biológica del fósforo (Ketchum, 1996). Por último, el llenado aireado conlleva el inicio de las reacciones aerobias y una reducción del tiempo del ciclo y de la concentración del substrato, la cual puede ser significativa en el tratamiento de compuestos biodegradables pero tóxicos a altas concentraciones. Igualmente, en un sistema aerobio, la fase de reacción puede ser con agitación o con aireación.

Los ciclos de funcionamiento de un reactor SBR deben ser lo más frecuentes posible, siempre que cada fase se lleve a cabo según los requerimientos de depuración (Ruiz *et al*., 2000). Sin duda, una duración de la fase de reacción basada en el tiempo de degradación de la materia orgánica minimiza el tiempo necesario para completar el ciclo. Sin embargo, si durante la fase de reacción no está previsto un cierto período de carencia nutricional y por consiguiente de respiración endógena, la posibilidad de ocurrencia de *bulking* puede incrementarse (Chiesa *et al*., 1985), al igual que el rendimiento de producción de biomasa.

El modelado y posterior automatización de un proceso SBR permite encontrar la estrategia óptima de operación que cumpla con el doble objetivo de minimizar los tiempos de llenado y reacción y de maximizar la eficiencia del proceso. La posibilidad de controlar la concentración del contaminante dentro del reactor convierte a los procesos SBR en una alternativa interesante para el tratamiento de moléculas xenobióticas que, siendo biodegradables, por su toxicidad pueden impedir que dicha transformación se lleve a cabo.

En estudios recientes, algunos autores han tratado mezclas de lodos contaminados con diesel en reactores SBR, optimizando las condiciones de operación como son la concentración de SST, tiempo de retención, mezclado, etc. La tecnología de los reactores SBR también ha sido usada para la degradación de compuestos tóxicos, como en el tratamiento de aguas residuales que contienen compuestos fenólicos y BTX (benceno, tolueno y xileno) o TNT (trinitrotolueno) y RDX (*Royal Demolition Explosive*, 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina), nitroglicerina y residuos peligrosos (Mace y Mata, 2002).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Planteamiento del problema

El fenol es un compuesto xenobiótico ampliamente utilizado; debido a esto es un contaminante común de aguas residuales de plantas industriales, petroquímicas, de coque, agroquímicas, de resinas, farmacéuticas, refinerías de petróleo, entre otras. Además, es un producto natural de la descomposición de la materia orgánica. Por muchos años estas aguas residuales han sido tratadas en procesos de lodos activados, que son reactores continuos con recirculación de biomasa. Sin embargo, el fenol es un sustrato tóxico e inhibitorio a partir de ciertas concentraciones, por lo que un problema bien conocido de tales procesos es el exceso de carga contaminante, el cual puede comprometer su funcionamiento. Estos efectos negativos sobre el crecimiento microbiano han sido frecuentemente modelados por cinéticas de inhibición por parte del sustrato.

El presente trabajo pretende optimizar el tratamiento biológico de fenol en agua, utilizando para ello una variante del proceso tradicional de lodos activados, el sistema SBR. Se pretende investigar la cinética de la biodegradación, plantear un modelo de degradación y simular el modelo obtenido. Con ayuda de un modelo es posible seleccionar una estrategia de operación del reactor que permita maximizar la velocidad de biodegradación.

3.2 Justificación

Los sistemas de tratamiento convencionales de aguas residuales son una herramienta fundamental utilizada para controlar la contaminación del agua. A través de ellos se mejora la calidad de las aguas residuales propiciando la posibilidad de su reuso, protegiendo el equilibrio ecológico de los cuerpos receptores y la salud pública. Sin embargo, el problema creado por el acelerado incremento en la contaminación ambiental en las grandes ciudades y centros industriales ha llevado a elevar la concentración de sustancias tóxicas recalcitrantes, entre estas el fenol, a niveles mayores a los permitidos, lo que ha hecho que estos sistemas de

tratamiento se vuelvan menos eficientes e incluso obsoletos ante este tipo de contaminantes. Por otra parte, las crecientes demandas sobre la reutilización de aguas industriales y las nuevas reglamentaciones ecológicas, hacen necesario la modificación de las instalaciones existentes y el desarrollo de procedimientos eficientes.

Es por esto, que es necesario desarrollar estrategias y procesos de tratamiento más eficaces, que puedan adaptarse a sustancias difíciles de biodegradar y que ofrezcan una remoción completa de los contaminantes sin elevar los costos del proceso.

El presente proyecto plantea la optimización mediante el desarrollo de modelos de degradación y el uso de reactores de alimentación secuenciada, para la biodegradación aerobia de compuestos difíciles de biodegradar, logrando así disminuir el impacto generado por la descarga de aguas residuales sin tratar hacia los cuerpos acuáticos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aplicar la tecnología de los reactores discontinuos de alimentación secuenciada a la biodegradación de fenol y optimizar el proceso mediante el modelado y automatización del mismo.

4.2 Objetivos específicos

- Instrumentar y automatizar un reactor discontinuo de alimentación secuenciada para la biodegradación de fenol.

- Obtener poblaciones microbianas capaces de biodegradar fenol en condiciones aerobias.

- Estudiar la cinética de biodegradación aerobia del fenol utilizando las poblaciones microbianas obtenidas.

- Desarrollar un modelo cinético que represente los procesos de biodegradación del fenol.

- Seleccionar y validar una estrategia de operación automática del reactor de alimentación secuenciada que maximice la velocidad de biodegradación del fenol.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Inóculos microbianos

Los inóculos microbianos consistieron en muestras de lodos activados provenientes de la recirculación al tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas residuales de San Juan Ixhuatepec, Edo. de México. Esta planta de tratamiento de aguas residuales se ocupa de los efluentes domésticos e industriales de la zona.

5.2 Medios de cultivo

5.2.1 Medio de adaptación

El ensayo SCAS (*Semi-Continuous Activated Sludge*) especifica un método de adaptación de poblaciones microbianas a moléculas xenobióticas, con el objeto de probar su biodegradabilidad (Ramírez, 2005). El método consiste en la exposición de una muestra de lodos activados a la molécula problema y a un efluente doméstico durante 23 horas; después de este tiempo, se retira el sobrenadante ya tratado para su análisis en términos de DQO o de la concentración de la molécula problema (ECB, 1988). Debido al largo tiempo de duración de este proceso (hasta de 6 meses) y al contacto continuo con el efluente, que tiene una función dual, como inóculo y como fuente alterna de carbono, éste es un proceso muy eficiente para la adaptación microbiana a moléculas difícilmente biodegradables (Vázquez-Rodríguez y Beltrán-Hernández, 2004). Durante la adaptación de los lodos activados al fenol, se utilizó agua residual doméstica muestreada del sistema de drenaje de la UAEH (340 – 400 mg DBO_5/l).

5.2.2 Agua residual sintética contaminada con fenol

La preparación de agua residual sintética contaminada con fenol se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Yoong *et al.* (2000). En la tabla 5.1 se muestra su composición para una concentración de fenol de 200 mg/l en el agua residual sintética. Debido a que la mayoría de las veces la concentración de fenol utilizada es mayor, las concentraciones de los demás nutrientes deben adecuarse en la misma proporción para evitar que el crecimiento microbiano se vea afectado (Ramírez, 2005).

Tabla 5.1. Composición del agua residual sintética contaminada con fenol.

Compuesto	**Concentración [mg/l]**
Fenol	200
K_2HPO_4	404
KH_2PO_4	220
$(NH_4)_2SO_4$	50
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.85
$MgSO_4 \cdot 2H_2O$	10
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.5
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.3

5.3 Cultivos de lodos activados

5.3.1 Adaptación al fenol

Para realizar la adaptación de lodos activados al fenol, se utilizo el método SCAS (ECB, 1988). A un litro de lodos activados se le adicionó diariamente 1 litro de agua residual doméstica sedimentada y un volumen de solución concentrada de fenol (20 g/l); éste último se fue incrementando de acuerdo a la adaptación de los lodos activados. Después de 23 horas de aireación y 45 minutos de sedimentación, se elimina 1 litro de sobrenadante. Para reiniciar el ciclo, se adiciona nuevamente agua residual y solución de fenol. Para mantener

estable el proceso de adaptación al fenol, el contenido de sólidos totales en el reactor se mantuvo entre 4 -5 g /L. Con este método, los lodos lograron degradar concentraciones de hasta 1.3 g/l.

5.3.2 Cultivos discontinuos en matraces agitados

Para el estudio de la cinética de biodegradación del fenol se realizaron cultivos discontinuos a temperatura ambiente, en matraces de vidrio de 1 litro, a diferentes concentraciones iniciales de sustrato (S_0) y de biomasa adaptada (X_0). El volumen total de cultivo fue de 600 ml y como medio se utilizó el agua residual sintética contaminada con fenol (§ 5.2.2). Para garantizar que el aporte de oxígeno y el mezclado fueran los adecuados se utilizaron difusores de acuario para la introducción del aire, además de una parrilla de agitación magnética. Las concentraciones de sustrato y de biomasa se monitorearon mediante muestreos periódicos. Cada muestreo consistió en la toma de una alícuota de 10 – 15 ml, la cual se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y se refrigeró para determinar posteriormente su concentración de fenol y de DQO, así como de otra alícuota de 10 ml para la determinación de biomasa como sólidos suspendidos totales (SST).

5.3.3 Cultivos discontinuos de alimentación secuenciada (SBR)

Los cultivos discontinuos de alimentación secuenciada (SBR) se llevaron a cabo en un reactor de vidrio con capacidad de 2.5 litros (Figura 5.1). El reactor está provisto de una chaqueta de vidrio para agua termostatada, agitación magnética y controles de nivel e inyección de aire comprimido (Figura 5.2). Se utilizaron bombas dos peristálticas Masterflex, una con velocidad variable para llevar a cabo la alimentación y otra con velocidad constante para el retiro del efluente (Figuras 5.3 y 5.4).

Figura 5.1. Reactor SBR utilizado para los cultivos discontinuos

Figura 5.2. Sistema de difusión de aire y control de nivel del SBR

Para el inicio del cultivo, se utilizaron lodos activados adaptados a una concentración de fenol de 1 g/l. Del reactor de adaptación se extrajo un volumen de 500 ml de lodos, los cuales fueron lavados y centrifugados a 5000 rpm en dos ocasiones con medio de Yoong libre de fenol (§ 5.2.2) para eliminar la materia orgánica. La biomasa lavada fue

resuspendida en 1 litro de medio, el cual constituyó el volumen inicial de los cultivos discontinuos de alimentación secuenciada.

Figura 5.3. Bomba de precisión para la alimentación del SBR

Figura 5.4. Bomba de extracción del SBR

Con el objetivo de probar el efecto del patrón de alimentación en la biodegradación de fenol, se programó la bomba de entrada para proporcionar una velocidad constante (350

ml/h) de medio de alimentación, o bien una velocidad creciente con un patrón exponencial (§ 6.1.4.1). En ambos casos, la concentración de fenol en el medio de entrada fue de 1 g/l, el cual se alimentó durante 3 horas. Una vez alcanzado el volumen final (2 l), la alimentación fue suspendida y el biorreactor se mantuvo en aireación hasta completar un ciclo de 24 horas. Este ciclo incluye 45 minutos de sedimentación, 5 minutos para la extracción del efluente y un periodo de 2 minutos entre cada operación para evitar el traslape de procesos. Los cultivos se efectuaron a temperatura ambiente, con velocidades de agitación y de aireación de 300 rpm y 3 l/min, respectivamente. Durante el proceso, se extrajeron muestras para la determinación de la concentración de biomasa y de fenol (§ 5.5.1 y 5.5.2.1, respectivamente). La tarjeta de adquisición de datos y el software se encuentran instalados en una computadora personal, como muestra la Figura 5.5.

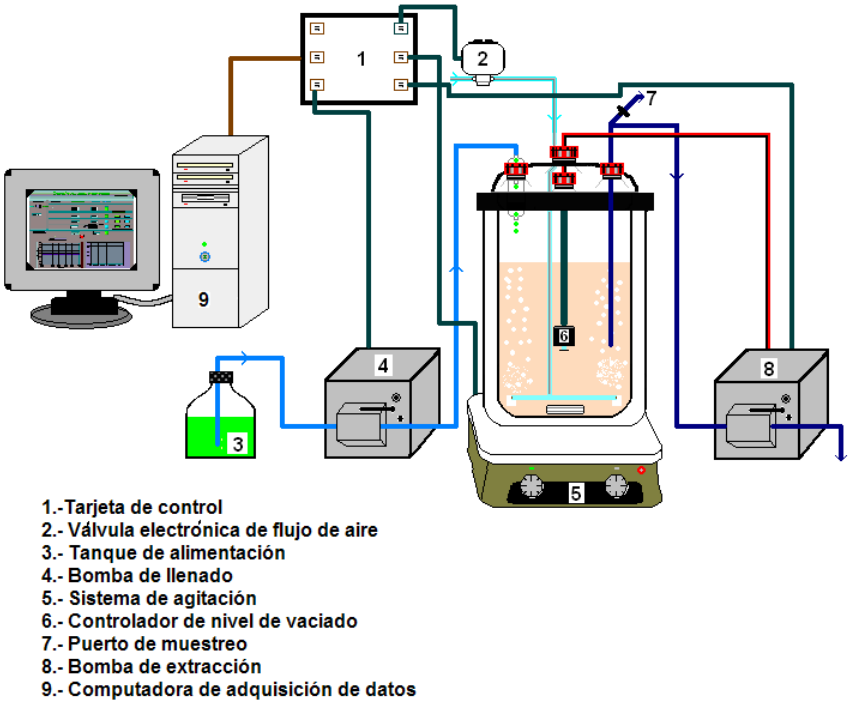


Figura 5.5 Esquema del reactor SBR

5.4 Instrumentación y adquisición de datos en el reactor SBR

El funcionamiento de las bombas y la adquisición de datos se llevaron a cabo mediante una tarjeta *National Instruments* NI6024-E que cuenta con salidas analógicas (control de bomba de llenado) y digitales (encargadas de controlar la válvula de aire, la parrilla de agitación y la bomba de extracción), la cual era utilizada mediante una aplicación desarrollada con el software LabView 7 (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench; National Instruments*, E. U. A.) por alumnos del Centro de Investigación en Tecnologías de la Información y Sistemas (CITIS-UAEH). La interfaz gráfica o panel de control (Figura 5.6) permite programar el inicio y la duración de las diferentes etapas de los ciclos del SBR, simplemente programando la hora de encendido y apagado de cada dispositivo. Así mismo, cuenta con un control manual, para que la acción de los dispositivos pueda ser modificada en cualquier momento.

La tarjeta de adquisición de datos esta provista de una salida de voltaje analógica, con la que es posible controlar la bomba de llenado. El voltaje depende de una ecuación que genera un perfil de llenado, es decir, que el flujo de entrada de la bomba depende del perfil calculado. El panel de control permite visualizar la gráfica con el perfil de llenado programado.

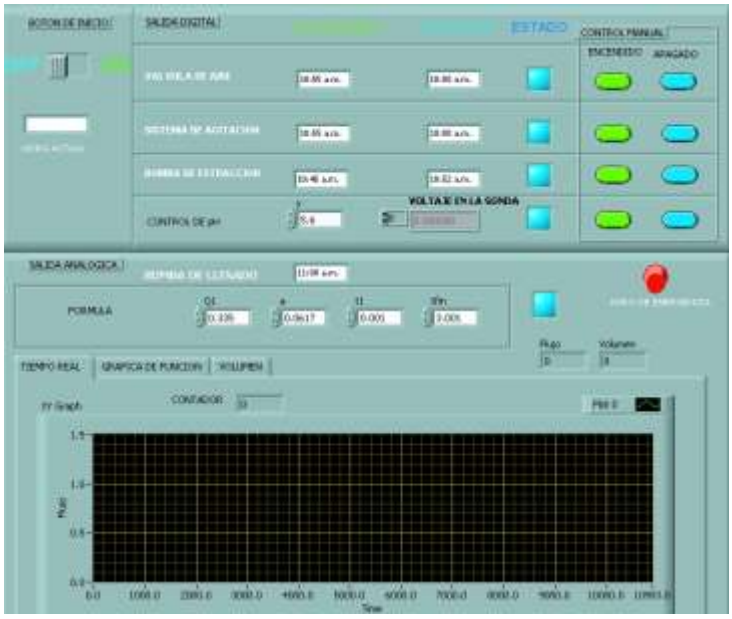


Figura 5.6. Panel de control del reactor SBR

5.5 Métodos analíticos

5.5.1 Determinación de la concentración de biomasa

La concentración de biomasa se determinó gravimétricamente mediante la técnica de sólidos suspendidos totales (SST) en cápsulas de porcelana mantenidas a peso constante. Para la determinación, se evapora un volumen conocido de muestra (aproximadamente 10 ml) a 105°C durante 12 horas, tras las cuales se deja enfriar la cápsula en un desecador y se pesa. El método tiene un límite de detección de 0.284 g SST/l y un coeficiente de variación de 2.676%.

5.5.2. Determinación de la concentración de fenol

5.5.2.1 Método colorimétrico de la 4-aminoantipirina

El método utilizado es el descrito por Woolard e Irvine (1995). A 2 ml de muestra centrifugada, se adicionan 0.2 ml de solución de $K_3Fe(CN)_6$ al 5% (m/v) en glicina 0.1 M. Se agita y se deja reaccionar por 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se agregan 2 ml de solución de 4-aminoantipirina al 0.25% (m/v) disuelta en solución tampón de glicina (preparada por disolución de 5.58 g de hidrocloruro de glicina y de 3.75 g de glicina en 0.91 l de agua destilada, ajustando el pH a 9.7 con una solución de NaOH 6N para un volumen final de 1 l). La mezcla se agita y se deja reaccionar durante 20 minutos. La absorbancia a 506 nm se mide en un lapso no mayor a 30 minutos, ya que una lectura posterior a este tiempo provoca una disminución en la respuesta del análisis. La concentración de fenol de la muestra se obtiene por comparación con una curva de calibración (0-25 mg/l). El método tiene un límite de detección de 0.0726 mg/l y un coeficiente de variación promedio de 1.06%.

5.5.2.2 Método espectrofotométrico UV

Este método se utilizó como un ensayo rápido para la cuantificación de fenol durante el desarrollo de cinéticas de biodegradación. Como primer paso, se realizaron dos barridos de longitud de onda (200-600 nm) con soluciones de distintas concentraciones de fenol (50 y 100 mg/l), para identificar la longitud de onda a la cual la absorbancia es máxima. Dicho valor correspondió a 267 y 269 nm (Figura 5.7), respectivamente. Algunos datos arrojados por la bibliografía consultada muestran que la longitud de 269 nm es la más utilizada (Woolard e Irving, 1995; Kumar *et al*., 2005), por lo cual se decidió adoptarla como la de trabajo.

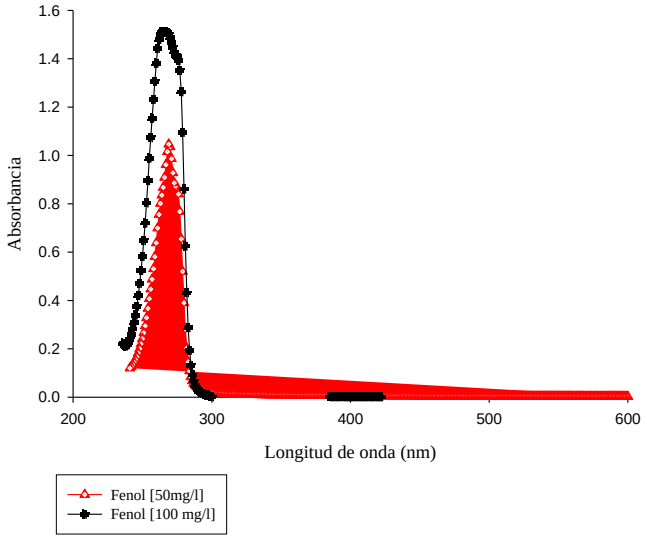


Figura 5.7 Barridos de longitud de onda para la determinación de la concentración de fenol por espectrofotometría

Para la realización de los análisis, se utilizaron 2.5 ml de muestra centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos, a la cual se le midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Lambda 40 UV-Vis (Perkin Elmer, E.U.A.). Las concentraciones de fenol se calcularon por comparación de una curva de calibración que relaciona la absorbancia de los patrones con su contenido de fenol (Figura 5.8). Se utilizó una curva de calibración para concentraciones inferiores a 200 mg/l. En cuanto a las muestras que excedían dicha concentración, éstas eran diluidas y posteriormente analizadas, puesto que a concentraciones mayores o iguales a 200 mg/l la absorbancia resultante era mayor a 2, valor que no es aceptado.

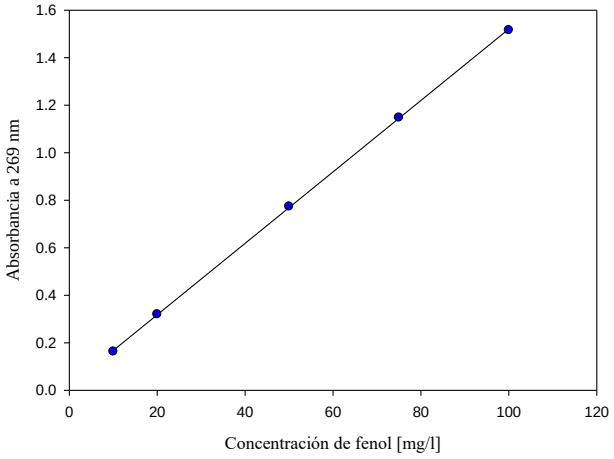


Figura 5.8. Curva de calibración para el análisis espectofotométrico de UV de fenol

5.5.3 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Para la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) se utilizó la técnica de la EPA 5220 D (APHA, 1989). Se utilizaron tubos de vidrio (16x100 mm) con tapón de teflón, a los cuales se agregaron 2.5 ml de muestra, 1.5 ml de solución digestora (10.216 g de $K_2Cr_2O_7$, 33.3 g de $HgSO_4$ y 167 ml de H_2SO_4/l) y 3.5 ml de solución de ácido sulfúrico (10.142 g de Ag_2SO_4/l de H_2SO_4). Una vez preparadas las muestras, se digieren dentro de un bloque de calentamiento (COD Reactor 45600, Hach Co., E.U.A.) a 150°C durante 2 horas. Posteriormente se dejan enfriar las muestras a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 600 nm. Los valores de DQO se obtienen a partir de una curva de calibración realizada con biftalato de potasio (0-600 mg/l, equivalentes a 0-705 mgDQO/l).

5.5.4 Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5)

Para esta medición se utilizó el sistema OxiTop (WTW Measurements Systems, Alemania), el cual registra la DBO_5 de modo automático durante 5 días. Dicho sistema utiliza botellas cerradas en las que la despresurización provocada por el consumo de oxígeno relacionado a la biodegradación de la materia orgánica es registrada por sensores electrónicos piezoresistivos. En función de su carga orgánica, se coloca un volumen determinado de agua residual en la botella (22.7-432 ml) y aliltiourea para inhibir la nitrificación. Los

valores de DBO_5 (0-4000 mg/l) se obtienen al multiplicar las lecturas diarias por un factor que depende del volumen del ensayo (Ramírez, 2005).

5.6 Métodos computacionales

Con el fin de explicar los mecanismos de degradación y crecimiento microbiano, así como estudiar el posible efecto de diferentes estrategias de operación del sistema SBR, es necesario desarrollar un modelo analítico del proceso. Este modelo se realiza típicamente mediante un sistema de ecuaciones diferenciales no lineales, que representan el balance de masa del proceso biotecnológico. La simulación de este modelo se realiza a través de un método de integración numérica. Para este trabajo se seleccionó el método de integración Runge-Kutta de cuarto y quinto orden, con paso variable de integración. La simulación del proceso se realizó en el entorno de programación matemática MatLab 6.5.0 release 13 (The MathWorks Inc., E.U.A.).

Los modelos que representan la cinética del proceso cuentan con una gran cantidad de parámetros, los cuales deben ser ajustados, dentro de ciertos rangos, para que los resultados de la simulación del modelo se asemejen a los resultados experimentales. Sólo de esta forma se puede afirmar que el modelo es una explicación del proceso real. Para encontrar los valores de los parámetros del modelo se utilizaron técnicas de optimización. El problema de optimización consiste en seleccionar los valores de algunas variables de manera que se maximice o minimice una función dada, que puede estar o no sujeta a un conjunto de restricciones de igualdad y/o desigualdad. En el caso del modelado, la función a minimizar es el error cuadrado medio entre los datos experimentales y los obtenidos por el modelo en simulación.

Una manera de resolver este tipo de problemas es mediante los métodos de búsqueda directa, o de orden cero, que requieren conocer los valores de la función objetivo pero no de las derivadas de la función para poder encontrar el punto óptimo. Uno de los métodos más usuales es el método de Hooke y Jeeves (1961). En este método se modifican uno a uno los parámetros del sistema para minimizar la función objetivo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Biodegradación aerobia del fenol

6.1.1 Adaptación de lodos activados al fenol

La adaptación de los lodos al fenol se llevo a cabo mediante la metodología SCAS (§ 5.2.1; ECB, 1988). Una vez que el cultivo microbiano presentó una sedimentabilidad adecuada a partir de agua residual doméstica, se comenzó la exposición al fenol con una concentración inicial de carbono orgánico disuelto de 20 mg/l, equivalente a 26 mg/l de fenol. Cuando el sobrenadante en el reactor fue claro, es decir, cuando la lisis celular y muerte fue poca o nula en el reactor, se fue incrementando gradualmente la concentración de sustrato hasta alcanzarse una eliminación de 200 mg/l de fenol al cabo de 45 días.

Para conocer la capacidad de biodegradación de estas poblaciones adaptadas, se estudió la cinética de degradación de fenol a una concentración de 50 mg/l y a la concentración de adaptación (200 mg/l). En 24 horas los lodos activados lograron degradar sólo la menor concentración de fenol (50 mg/l), razón por la cual se continuó la adaptación aumentando muy lentamente la concentración de fenol añadida. Finalmente, al cabo de tres meses más, se obtuvieron poblaciones microbianas capaces de eliminar diariamente 700 mg/l de fenol, las cuales fueron utilizadas para el estudio cinético de la biodegradación de la molécula de fenol en cultivos discontinuos (§ 6.1.2).

Debido a la contaminación presente en el sistema de aire comprimido, este cultivo de lodos activados fue desechado por la alta lisis celular que presentaba, ocasionando que se reiniciara el proceso de adaptación con un cultivo nuevo. El tiempo de adaptación de la segunda población fue más rápido y más eficiente, pues se logró degradar una concentración mayor de fenol (1 g/l) después de 6 semanas de adaptación. Esta biomasa fue utilizada para los cultivos discontinuos de alimentación secuenciada (§ 6.1.4).

6.1.2 Estudio cinético de la biodegradación de fenol

Una vez adaptados los cultivos microbianos (700 mg/l de fenol), se realizaron cuatro experimentos discontinuos a diferentes concentraciones iniciales de fenol (0.18 – 0.80 g/l) y de biomasa adaptada (0.74–1.74 g SST/l), como fue descrito en la sección 5.3.2. Esto equivale a las siguientes relaciones sustrato-biomasa (S_0/X_0): 0.1, 0.52, 0.79 y 1 g fenol/g SST. El consumo de fenol se monitoreó durante 15 horas y fueron calculados los porcentajes de biodegradación con respecto a la concentración inicial de fenol. Los resultados de las cinéticas obtenidas se presentan en la figura 6.1.

Se puede observar cómo la relación S_0/X_0 tuvo un efecto sobre la velocidad de biodegradación del fenol. El cultivo que consumió primero el fenol introducido, aproximadamente después de 3 horas, fue el de menor relación S_0/X_0 (1 g fenol/g SST), mientras que el ensayo con la mayor relación (1 g fenol/g SST) necesitó 9 horas aproximadamente para degradar completamente el fenol. Debido a que la biomasa fue adaptada a una concentración de fenol de 0.7 g/l y a que las relaciones S_0/X_0 empleadas fueron reducidas (Chudoba *et al*., 1992), no se observaron fases de latencia en ninguno de los cultivos.

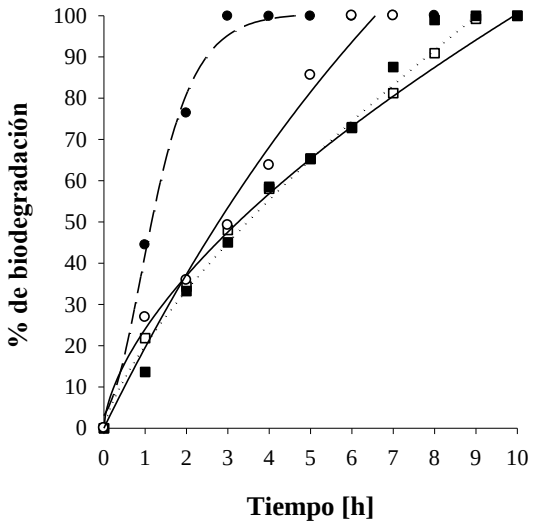


Figura 6.1. Biodegradación de fenol a diferentes relaciones S_0/X_0 [g fenol/g SST]: (●) 0.10; (❍) 0.52; (■) 0.79; (❒) 1.00

En varias de las cinéticas realizadas se observó un crecimiento de la biomasa aun cuando el sustrato había sido agotado; en la figura 6.2 se presenta el crecimiento de la biomasa y el decremento del fenol correspondientes al cultivo para el cual este hecho fue más notorio. Un crecimiento de este tipo va contra todo lo propuesto por los modelos de Monod y de Haldane-Andrews tradicionales, para los cuales la biomasa no debería crecer en ausencia del sustrato, *i.e.* $\mu = 0$ cuando $S = 0$.

En estudios realizados con bacterias del género *Pseudomonas putida* F1, Reardon *et al*. (2000) observaron crecimiento de la biomasa 10 horas después que el fenol fue eliminado totalmente del medio de cultivo. Dichos autores atribuyeron lo anterior a un intermediario metabólico producido en el momento que dio inicio la degradación de fenol; cuando se comenzó a consumir este intermediario existió un crecimiento residual de los microorganismos incluso luego de que el fenol hubiera sido consumido totalmente.

Las expresiones estequiométricas y cinéticas más usuales consideran que la degradación del sustrato original procede en un solo paso, ya sea hasta su mineralización o bien hasta la formación de productos recalcitrantes. Sin embargo, la formación y posterior degradación de metabolitos intermediarios también es común. En muchos casos, los intermediarios son rápidamente mineralizados por las mismas poblaciones microbianas, por lo que no es necesario considerarlos en el modelo estequiométrico o cinético. Sin embargo, la acumulación de intermediarios biodegradables puede ser significativa cuando las distintas etapas de la biodegradación suceden a velocidades diferentes o requieren la participación de otros microorganismos. Aunque en último término los intermediarios sean mineralizados a CO_2, NH_4^+ y H_2O, se convierten en receptáculos importantes de carbono y electrones en cuanto la velocidad de una etapa de la biodegradación se ralentiza. De este modo, la pérdida del sustrato original no conduce a los productos esperados en una mineralización completa, por lo que se modifican profundamente la cinética y la estequiometría del proceso (VanBriesen y Ritmann, 2000).

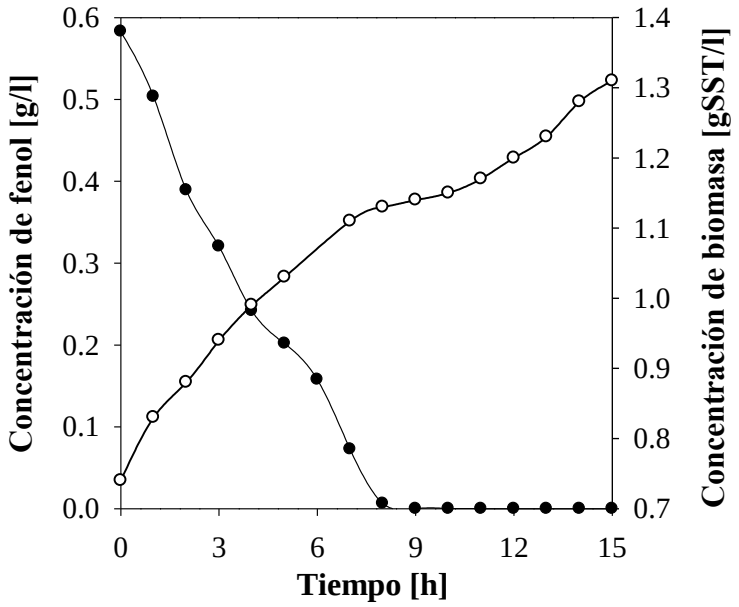


Figura 6.2. Cinética de crecimiento y de consumo de sustrato por parte de lodos activados adaptados (S_0/X_0 = 0.79 g/g) (●) fenol y (○) biomasa

En los experimentos aquí reportados, la adaptación al fenol fue llevada a cabo en presencia de agua residual doméstica, con la finalidad de mantener una elevada diversidad microbiana. En poblaciones de este tipo ocurren interacciones simbióticas complejas, las cuales pueden clasificarse como interacciones negativas (competencia y amensalismo), positivas (comensalismo, sinergismo y mutualismo) o positivas para una población pero negativas para la otra (parasitismo y depredación según Atlas y Bartha, 2002). Las interacciones negativas entre poblaciones fungen como mecanismos de control que limitan la densidad de las poblaciones, mientras que las positivas aumentan la capacidad de sobrevivencia de algunas poblaciones en un hábitat determinado. En la Tabla 6.1 se resume esta clasificación.

En una relación de tipo comensal, una población obtiene un beneficio en tanto que la otra no resulta perjudicada. Se trata de una relación unidireccional, en la que la población receptora puede necesitar el beneficio obtenido de la población no afectada, pero que también podría recibir dicho beneficio de otras poblaciones con capacidades metabólicas parecidas (Atlas y Bartha, 2002).

Tabla 6.1. Tipos de interacciones entre poblaciones microbianas (Atlas y Bartha, 2002)

Nombre de la interacción	**Efecto de la interacción**	
	Población A	**Población B**
Neutralismo	No existe	No existe
Comensalismo	No existe	+
Sinergismo (protocooperación)	+	+
Mutualismo (simbiosis)	+	+
Competencia	-	-
Amensalismo	No existe o +	-
Depredación	+	-
Parasitismo	+	-

El comensalismo puede tener lugar mediante diversos mecanismos, uno de los cuales es la conversión de moléculas orgánicas, por parte de una población microbiana, en sustratos para otra población. Un ejemplo de este tipo de mecanismo lo constituyen algunos hongos productores de exoenzimas capaces de convertir polímeros complejos, como la celulosa, en compuestos fácilmente asimilables, como la glucosa. Estos azúcares simples pueden ser utilizados por otros microorganismos que no posean las enzimas necesarias para usar las moléculas complejas; así, mientras los hongos no se ven afectados por la segunda población microbiana, esta última sí se beneficia de la acción de la primera.

De esta manera, el crecimiento residual de los lodos activados posterior al consumo de fenol podría explicarse por una cepa predominante que crece en modo semejante al de *P. putida* F1 (Reardon *et al*., 2000), o bien por dos poblaciones que establecen una relación comensal. En este último escenario, el fenol actúa como la fuente de carbono y de energía de la primera población, la cual la transformaría en un metabolito intermediario. El carácter inhibitorio de este metabolito impediría su mineralización inmediata a CO_2 y H_2O, por lo que el crecimiento de la segunda población a partir de dicho metabolito se produce diferido

en el tiempo. Ambas poblaciones, al ser consideradas conjuntamente, mostrarían el mismo comportamiento que el señalado para *P. putida* F1.

6.1.3 Modelado de la biodegradación de fenol

La contradicción entre los datos experimentales y lo establecido por el modelo convencional de Haldane-Andrews, para el cual el crecimiento es nulo una vez que el sustrato ha sido consumido, puede deberse a que dicho modelo no considera el efecto de la producción de metabolitos intermediarios inhibitorios, su eventual acumulación y consumo durante la biodegradación del fenol.

Diversos estudios (Mörsen y Rehm, 1990; Léonard *et al*., 1999; Wang y Loh, 1999) han reportado que la ruptura de fenol por la vía *meta* frecuentemente es acompañada de la acumulación de un metabolito, el semialdehído ácido 2-hidroximucónico (2-hmas). Esta acumulación se ha correlacionado con la cantidad de fenol consumido y con la aparición de un color que va desde el amarillento hasta el marrón oscuro en el medio de cultivo (Mörsen y Rehm, 1990). De hecho, la concentración del 2-hmas ha sido estimada mediante una correlación lineal con la intensidad de esta coloración medida espectrofométricamente, permitiendo el control de la actividad metabólica de *Ralstonia eutropha* durante la biodegradación de fenol en un proceso de alimentación discontinuo (Léonard *et al*., 1999). No obstante, en ninguno de estos trabajos se ha identificado específicamente al 2-hmas.

Wang y Loh (1999) y Nuhoglu y Yalcin (2005) han propuesto modelos modificados a partir de la ecuación de Haldane-Andrews que consideran el efecto inhibitorio de la producción y acumulación de metabolitos tales como el 2-hmas. Dado que se ha encontrado que la concentración de los metabolitos intermediarios es proporcional a la cantidad inicial de fenol (S_0) o a la cantidad de fenol degradado ($S_0 - S$), estos modelos se basan en la integración directa de tales términos en la expresión de la velocidad específica de crecimiento (Ecuación 2.10). Así, para Wang y Loh (1999) y Nuhoglu y Yalcin (2005) la expresión de Haldane-Andrews toma la forma de las ecuaciones 6.1 y 6.2, respectivamente.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S_0}{K_0 + S_0 + (S_0^2 / K_i)} \tag{6.1}$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + [(S_0 - S)^2 / K_i]} \tag{6.2}$$

Considerando el efecto de la acumulación de los intermediarios metabólicos, Wang y Loh (1999) describieron adecuadamente la biodegradación de fenol por parte de *P. putida* en un amplio rango de concentraciones iniciales de fenol (25 – 800 mg/l). El éxito de su modelo es notable para las concentraciones mas elevadas de fenol, las cuales no son modeladas adecuadamente según la ecuación de Haldane-Andrews. De igual manera, Nuhoglu y Yalcin (2005) obtuvieron un buen ajuste de su modelo a la degradación de fenol en un rango todavía mayor de concentraciones iniciales (25 – 1450 mg/l) utilizando lodos activados adaptados. No obstante, ninguno de los modelos descritos considera el crecimiento de la biomasa.

En vista de que los resultados de los experimentos discontinuos descritos en la sección 6.1.2 sugieren la producción de metabolitos intermediarios, en este trabajo se propone un nuevo modelo matemático que explícitamente toma en cuenta el efecto de tales metabolitos, tanto en el crecimiento de la biomasa como en la biodegradación de fenol. Con este objetivo, se ha asumido que la biodegradación de fenol es un proceso que sucede en dos etapas consecutivas. En la primera etapa, el fenol (S_1) es degradado por la biomasa (X), la cual crece y produce uno o varios intermediarios metabólicos (S_2), así como eventuales productos desconocidos (P_1; Ecuación 6.3). Durante esta etapa la biodegradación de fenol es inhibida por éste, como se ha descrito anteriormente (§ 2.3.2).

En la segunda etapa, los posibles intermediarios son mineralizados por la población microbiana a través de una reacción que genera energía para su crecimiento (Ecuación 6.4). Así, la asimilación de estos intermediarios explica el crecimiento residual de la biomasa

observado cuando el fenol ya se ha agotado del medio. Las siguientes reacciones representan el proceso descrito.

$$S_1 \rightarrow X + S_2 + P_1 \tag{6.3}$$

$$S_2 \rightarrow X + P_2 \tag{6.4}$$

Donde S_1 es la concentración de fenol; X es la concentración de biomasa; S_2 es la concentración de los posibles intermediarios metabólicos principales y P_1 y P_2 son productos desconocidos de la biodegradación, o bien intermediarios de menor importancia que no interfieren en dicho proceso.

El modelo dinámico propuesto para la biodegradación de fenol en un sistema discontinuo está constituido por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{Q_0}{V} X \tag{6.5}$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -q_{S1} X + \frac{Q_0}{V}(S_1^0 - S_1) \tag{6.6}$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \nu_{S2} X - q_{S2} X - \frac{Q_0}{V} S_2 \tag{6.7}$$

$$\frac{dV}{dt} = Q_0 - Q_S \tag{6.8}$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento de la biomasa, q_{S1} y q_{S2} son las velocidades específicas de consumo de fenol y de los posibles intermediarios metabólicos, respectivamente, y ν_{S2} es la velocidad específica de producción de los intermediarios. Este conjunto de ecuaciones puede adaptarse en función del modo de cultivo empleado. Así, en

un quimiostato, el flujo de alimentación de la entrada (Q_0) es igual al de salida (Q_S); en un cultivo en modo *batch* $Q_0 = Q_S = 0$ y en un cultivo de alimentación discontinua $Q_S = 0$.

El modelo considera que la biomasa crece sobre el fenol y los intermediarios metabólicos a las velocidades μ_1 y μ_2, respectivamente, por lo que su velocidad específica de crecimiento total, μ, se modela de la siguiente manera:

$$\mu = \mu_1 + \mu_2 \tag{6.9}$$

El fenol se considera como un sustrato inhibitorio, debido a lo cual μ_1 se modela según la expresión de Haldane-Andrews (Ecuación 6.10), mientras que para μ_2 se utiliza una ecuación de Monod (6.11). Ambas expresiones se han modificado con un factor, con el objeto de representar el efecto de la producción de los intermediarios sobre la degradación de fenol (Ecuación 6.10) y el efecto de la concentración de fenol sobre la producción de los intermediarios (Ecuación 6.11).

$$\mu_1 = \mu_{\max 1} \frac{S_1}{K_{S1} + S_1 + (S_1^2 / K_{i1})} \cdot \frac{K_2}{K_2 + S_2} \tag{6.10}$$

$$\mu_2 = \mu_{\max 2} \frac{S_2}{K_{S2} + S_2} \cdot \frac{K_1}{K_1 + S_1} \tag{6.11}$$

Las velocidades específicas de crecimiento (μ) se relacionaron con las de consumo de sustrato (q_S) de la siguiente manera:

$$q_{S1} = \frac{\mu_1}{Y_1} \tag{6.12}$$

$$q_{S2} = \frac{\mu_2}{Y_2} \tag{6.13}$$

La velocidad específica de producción de los metabolitos intermediarios se correlacionó de modo lineal a la velocidad específica de crecimiento de la biomasa sobre fenol mediante la constante α, como se muestra en la Ecuación 6.14.

$$\nu_{S2} = \alpha\mu_1 \tag{6.14}$$

Existen varias maneras de estimar los valores de los parámetros utilizados en el modelo. Un modelo puede ajustarse mediante métodos numéricos, tales como los de mínimos cuadrados o los de regresión no lineal, o mediante métodos heurísticos. En este trabajo los diez parámetros cinéticos utilizados se estimaron por medio del método de búsqueda directa de Hooke y Jeeves (1961), el cual es muy utilizado para modelos con un número elevado de variables y parámetros. Los valores de los parámetros cinéticos se encuentran listados en la tabla 6.2.

Tabla 6.2. Parámetros cinéticos calculados por el método de Hooke y Jeeves (1961)

Parámetro	**Valor**	**Unidades**
μ_{max1}	0.39	h^{-1}
K_{S1}	0.03	g/l
K_{i1}	0.17	g/l
K_2	0.16	g/l
Y_1	0.57	g/g
μ_{max2}	0.028	h^{-1}
K_{S2}	0.35	g/l
K_1	-	g/l
Y_2	0.67	g/g
α	1.6	g/g

Debido a la naturaleza novedosa de este modelo, no es posible comparar estos valores con los que han sido reportados en la literatura (Tabla 2.2). Sin embargo, puede observarse que los parámetros análogos son del mismo orden de magnitud. Los parámetros de la Tabla 6.2 se utilizaron para simular las ecuaciones 6.5 – 6.8, mediante un algoritmo Runge-Kutta de cuarto orden para la integración numérica de las ecuaciones diferenciales ordinarias con el paquete matemático MatLab 6.5.0 release 13 (The MathWorks Inc., E.U.A.).

En las figuras 6.3 – 6.6 se muestra la evolución de los datos experimentales y de los obtenidos por simulación del modelo, correspondientes a las relaciones sustrato-biomasa medidas en los cuatro experimentos discontinuos (§ 6.1.2). Así mismo, se muestra la concentración de los posibles metabolitos intermediarios calculada por el modelo.

Las figuras muestran que el modelo en dos etapas que aquí se propone describe adecuadamente los datos experimentales de los cultivos que se desarrollan a relaciones S_0/X_0 más elevadas (0.52 – 1 g fenol/g SST). Para el cultivo con menor relación S_0/X_0 (0.1 g fenol/g SST) se observó una biodegradación menos rápida de lo que predice el modelo, mientras que el ajuste de la biomasa es semejante al observado en el resto de los cultivos.

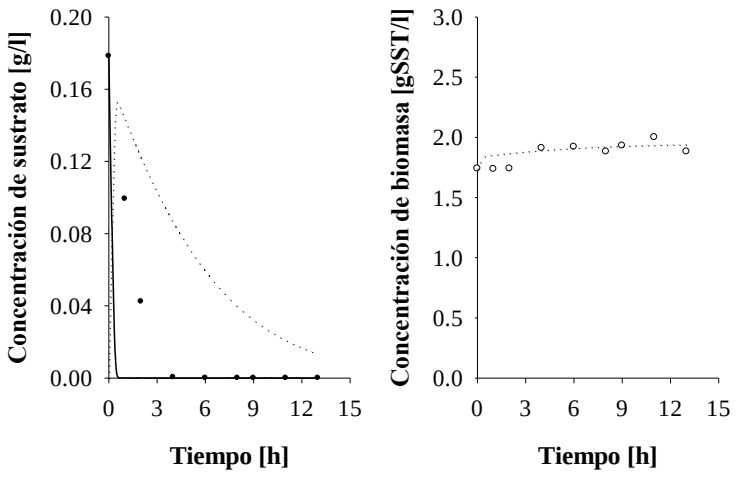


Figura 6.3. Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (❍). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 0.10 g/g). La línea discontinua (·) representa el comportamiento de los intermediarios metabólicos (S_2) calculado por el modelo.

En los experimentos llevados a cabo a las relaciones S_0/X_0 más elevadas (Figuras 6.4 – 6.6), se observa mayormente marcado el crecimiento de la biomasa posterior al consumo total de fenol, lo cual puede atribuirse a una mayor acumulación de los metabolitos intermediarios de la biodegradación. Esta observación confirma que la cinética de biodegradación de fenol es controlada por la velocidad de producción de tales metabolitos, lo que a su vez fortalece la elección de un modelo basado en el esquema de reacción dado por las ecuaciones 6.3 y 6.4.

Por otra parte, aunque los datos de simulación de los metabolitos intermediarios no pudieron ser verificados experimentalmente, los niveles que alcanzan según el modelo son consistentes con la literatura. En efecto, Chudoba (1985) establece que la producción de metabolitos aumenta conforme se incrementa la relación S_0/X_0. No obstante, la ausencia de mediciones directas de las concentraciones de dichos intermediarios metabólicos no permite conclusiones más realistas a este respecto.

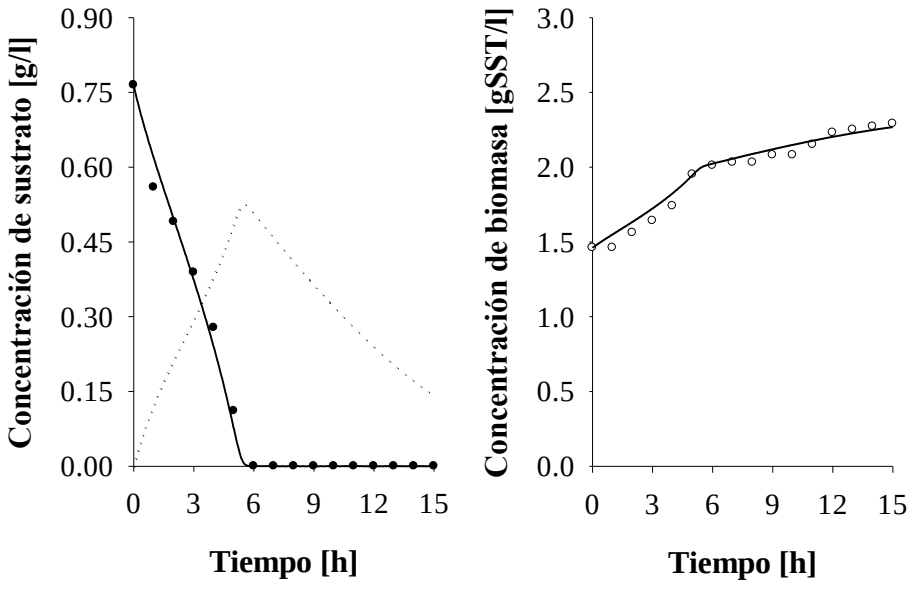


Figura 6.4. Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 0.52 g/g). La línea discontinua (·) representa el comportamiento de los intermediarios metabólicos (S_2) calculado por el modelo.

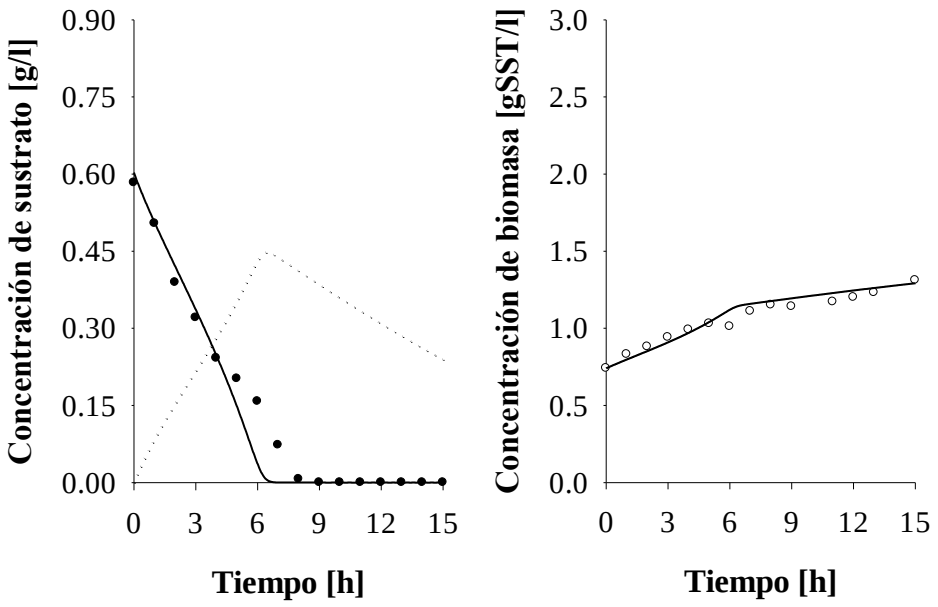


Figura 6.5. Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 0.79 g/g). La línea discontinua (·) representa el comportamiento de los intermediarios metabólicos (S_2) calculado por el modelo.

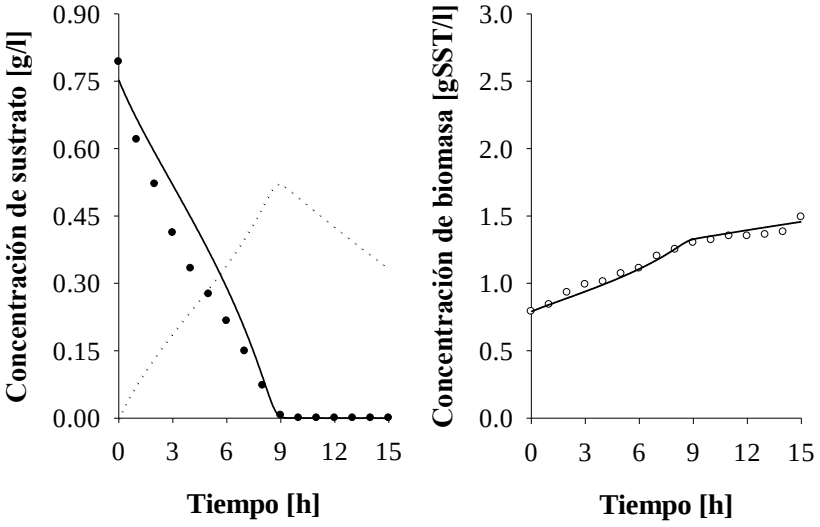


Figura 6.6. Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 1.0 g/g). La línea discontinua (·) representa el comportamiento de los intermediarios metabólicos (S_2) calculado por el modelo.

Los perfiles simulados correspondientes a los metabolitos intermediarios muestran que su degradación es más lenta que la del fenol. Lo anterior es consecuencia de haber constatado un crecimiento microbiano más lento en la segunda etapa del proceso, lo que se tradujo en una menor afinidad de los lodos activados por el metabolito intermediario que por el fenol ($K_{S2} >> K_{S1}$). Wang y Loh (1999) modelan este mismo hecho considerando que los metabolitos ejercen un efecto inhibitorio mayor que el fenol e incorporan una doble inhibición por el sustrato en su modelo.

6.1.4 Biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada

Los cultivos discontinuos de alimentación secuenciada se efectuaron según el procedimiento descrito en la sección 5.3.3, con lodos activados adaptados a una concentración de fenol de 1 g/l. Con estos experimentos se pretendió alcanzar los siguientes objetivos:

- Validar el modelo de biodegradación obtenido.
- Identificar un patrón de alimentación que permitiera una velocidad de degradación máxima.

Para ello, se llevaron a cabo dos experimentos. En el primero (SBR-1), se buscó forzar a los microorganismos a biodegradar el fenol en condiciones inhibitorias, cercanas a la velocidad máxima de biodegradación, mientras que en el segundo experimento (SBR-2) se mantuvo la biomasa en condiciones de limitación por el sustrato.

Los parámetros del modelo debieron ajustarse de nuevo debido a que los microorganismos con los que se llevaron a cabo estos experimentos fueron distintos a los utilizados en los cultivos discontinuos, como ya se explicó en la sección 6.1.1. Para el ajuste, se obtuvo un cultivo discontinuo en el reactor SBR, cuyos resultados se muestran en la Figura 6.7. En dicha figura también se presentan los datos que se obtienen por simulación del modelo utilizando los nuevos parámetros cinéticos.

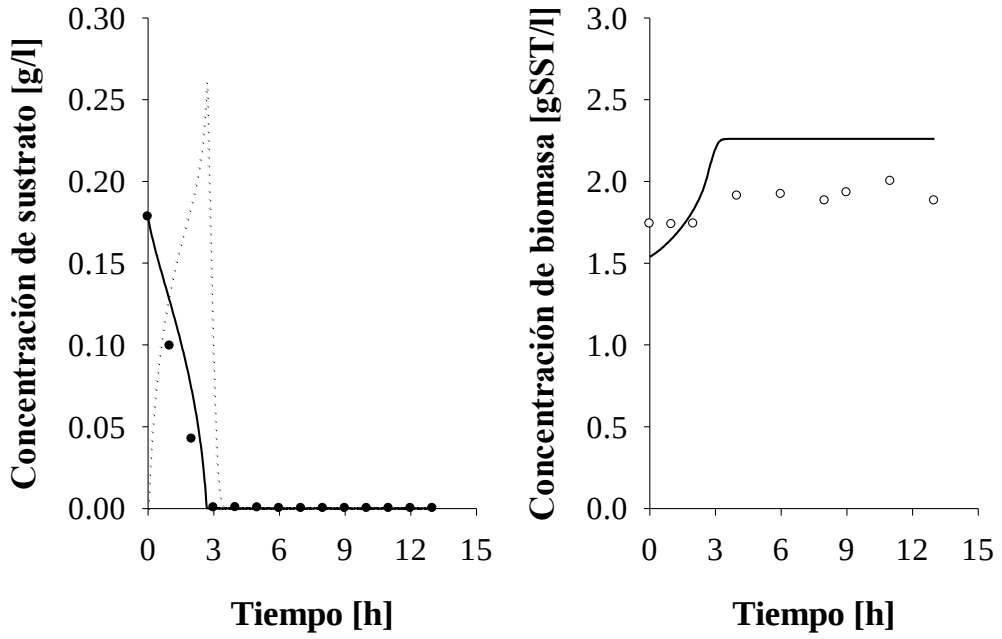


Figura 6.7. Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○). Los resultados de simulación se representan por líneas continuas (S_0/X_0 = 0.10 g/g). La línea discontinua (·) representa el comportamiento de los intermediarios metabólicos (S_2) calculado por el modelo.

El ajuste de los parámetros del modelo se realizó mediante el método de Hooke y Jeeves (1961). Los nuevos parámetros del modelo se presentan en la tabla 6.3. Una de las diferencias que existen entre ambos conjuntos de parámetros reside en que se incorpora al modelo la constante K_1, que designa una inhibición de la degradación del sustrato S_2 debida al fenol (S_1). En ambos modelos se considera una inhibición de la degradación del fenol ejercida por los intermediarios metabólicos, representada por la constante K_2.

En la figura 6.7 puede observarse que con este juego de parámetros se describe mejor el cultivo discontinuo a una relación S_0/X_0 reducida. Sin embargo, el ajuste del modelo es menor en lo que respecta a la biomasa.

Tabla 6.3. Parámetros cinéticos calculados por el método de Hooke y Jeeves (1961)

Parámetro	Valor	Unidades
μ_{max1}	0.40	h^{-1}
K_{S1}	0.002	g/l
K_{i1}	0.017	g/l
K_2	0.091	g/l
Y_1	0.67	g/g
μ_{max2}	0.3	h^{-1}
K_{S2}	0.075	g/l
K_1	0.066	g/l
Y_2	0.75	g/g
α	6.7	g/g

6.1.4.1 Biodegradación en condiciones inhibitorias (SBR-1)

Para llevar a cabo este experimento, fue necesario identificar la concentración de fenol a la cual la velocidad de crecimiento microbiano es máxima (40 mg/l). A esta concentración es posible degradar el sustrato a máxima velocidad. No obstante, dadas las características dinámicas de un cultivo alimentado, también es posible situarse en condiciones de inhibición por el sustrato si la concentración de éste es ligeramente superior (Figura 2.8).

El modelo permitió predecir que luego de añadir fenol a una concentración aproximada de 125 mg/l, los lodos activados (5g SST/l) podían degradarlo hasta que alcanzara la concentración adecuada luego de transcurridos 23 minutos. Una vez que lo anterior se puso en práctica con 1 litro de cultivo como volumen inicial, se arrancó la bomba de alimentación. Esta bomba fue programada para que aumentara la velocidad de flujo siguiendo un patrón exponencial durante las siguientes 3 horas. La función que siguió la velocidad de flujo es la que se muestra en la Ecuación 6.15.

$$Q = \begin{cases} 0 & \text{si } t < t_i \\ Q_0 e^{a(t-t_i)} & \text{si } t_i \leq t \leq 3 \\ 0 & \text{si } t > 3 \end{cases} \tag{6.15}$$

Donde t_i = 0.383 h, Q_0 = 335 ml/h y a = 0.0617. La función de llenado está representada en la figura 6.8.

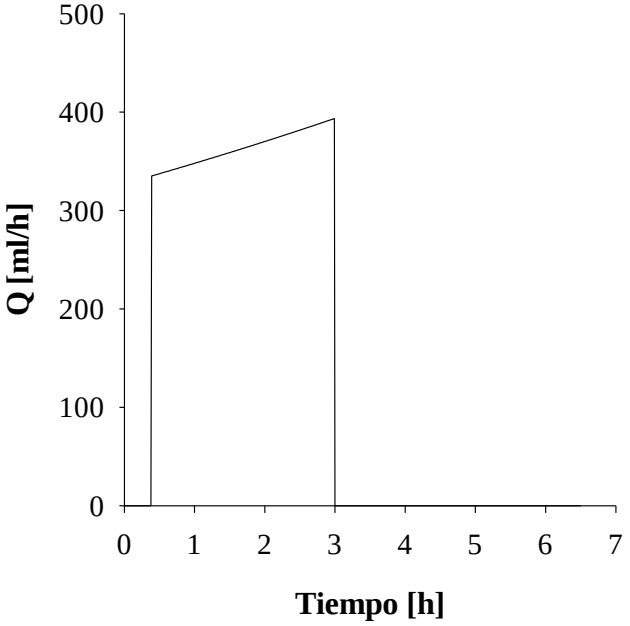


Figura 6.8. Perfil de la velocidad de alimentación del experimento SBR-1

Luego de analizar los niveles de fenol en el reactor durante el periodo de alimentación (Figura 6.9), se confirma que el cultivo se encuentra inhibido, tanto por la concentración de este compuesto como por la de los metabolitos intermediarios. Como muestra la figura, los microorganismos se encuentran inhibidos desde que inicia la entrada del influente, ya que existe una cantidad de fenol que no se alcanza a biodegradar y que por lo tanto se acumula a través de todo el periodo de alimentación. Esta cantidad de fenol no biodegradado disminuye la eficiencia del proceso.

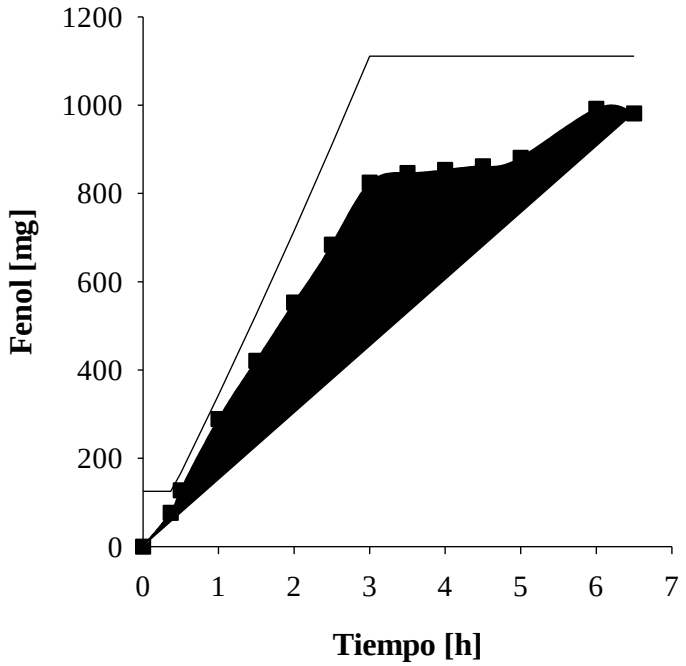


Figura 6.9. Cantidad de fenol alimentado (–) y consumido (■) en el experimento SBR-1

Luego de haber concluido la alimentación del reactor se observa un decaimiento en la velocidad de degradación de fenol, que se mantiene aproximadamente durante dos horas más. Durante este periodo, no obstante, la concentración de fenol disminuye en el reactor (Figura 6.10), hasta casi alcanzar 130 mg/l luego de 3.5 horas de que cesara la alimentación de fenol.

Los datos experimentales y los obtenidos por simulación correspondientes a la concentración de fenol (S_1), de los intermediarios metabólicos (S_2) y de la biomasa (X) durante el experimento SBR-1 se muestran en la Figura 6.10.

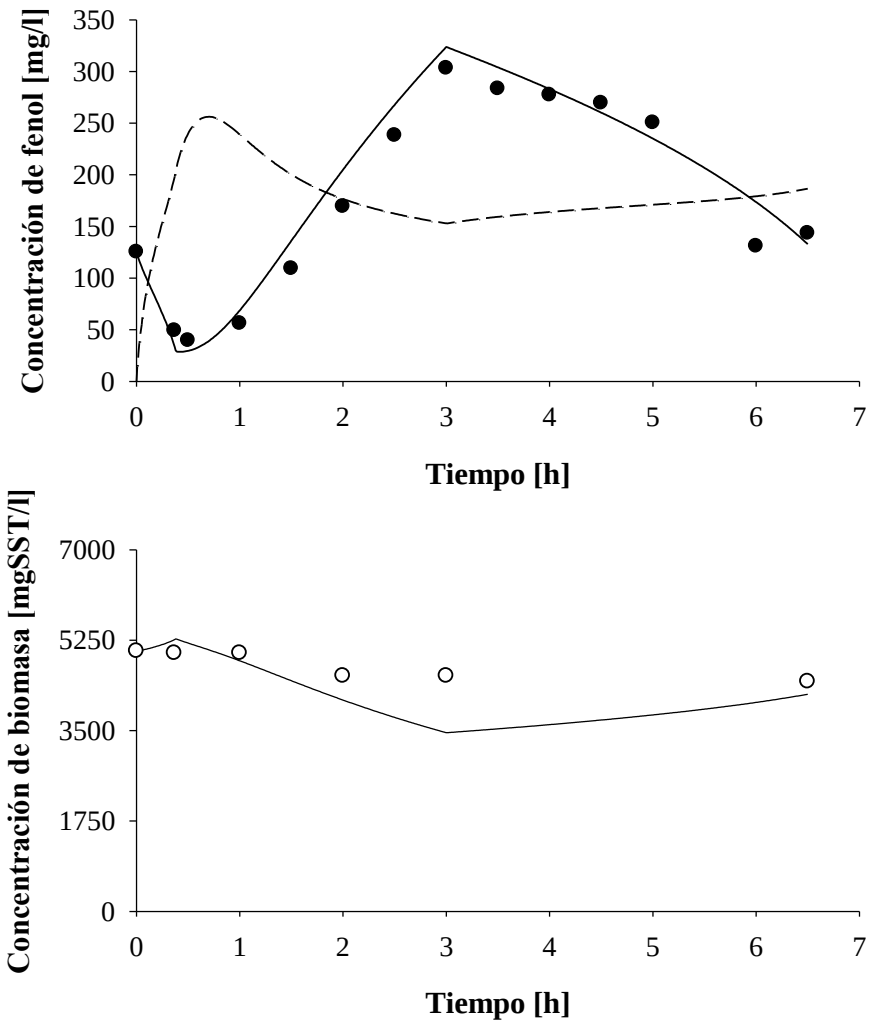


Figura 6.10. Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○) durante el experimento SBR-1. Los resultados de simulación se representan por líneas continuas. La línea discontinua (·) representa el comportamiento de los intermediarios metabólicos (S_2) calculado por el modelo.

La figura anterior muestra el adecuado del modelo con los datos obtenidos durante la operación dinámica del reactor. Cabe mencionar que la mayor parte de los modelos de biodegradación de fenol que se reportan en la bibliografía se obtuvieron a partir de cultivos discontinuos, los cuales no son muy sensibles a las variaciones de los parámetros cinéticos ni a la naturaleza del modelo (García-Sánchez *et al*., 1998).

Si se considera una duración de la alimentación de 5 horas, que permita una duración total del ciclo SBR de 6 horas, se tiene una velocidad de consumo de fenol de 3.17 kg fenol/m^3·d, la cual es semejante a la reportada por Yoong *et al*. (2000; 3.12 kg fenol/m^3·d). No obstante, se tendría una concentración de fenol en el efluente de aproximadamente 250 mg/l, lo que impide considerar esta alternativa como ambientalmente aceptable (§ 2.1.5).

6.1.4.2 Biodegradación en condiciones limitantes (SBR-2)

A partir del experimento anterior, se conoce la concentración de fenol que acota las zonas de limitación e inhibición de la biomasa por parte del sustrato. Así cualquier concentración inferior a 40 mg/l teóricamente coloca a la biomasa en condiciones limitantes para su crecimiento. Para mantener tales condiciones, el experimento SBR-2 se inició con un volumen de 1 litro y con una velocidad de alimentación constante (350 ml/h), la cual se mantuvo durante las siguientes 3 horas (Figura 6.11). La función de llenado corresponde a la Ecuación 6.15, donde para este experimento t_i = 0 h, Q_0 = 350 ml/h y a = 0. La concentración inicial de la biomasa fue de 6.7 g SST/l.

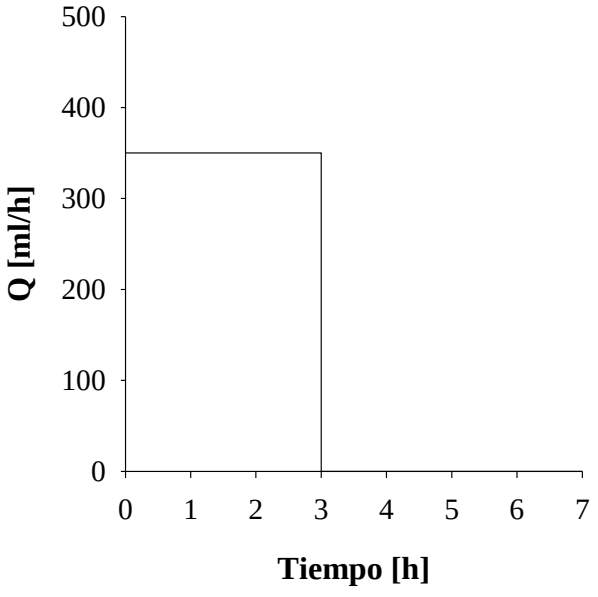


Figura 6.11. Perfil de la velocidad de alimentación del experimento SBR-2

Con este perfil de alimentación se logra biodegradar por completo el fenol añadido (Figura 6.12), lo que corresponde a un estado de limitación por el sustrato y confirma lo que el modelo propuso.

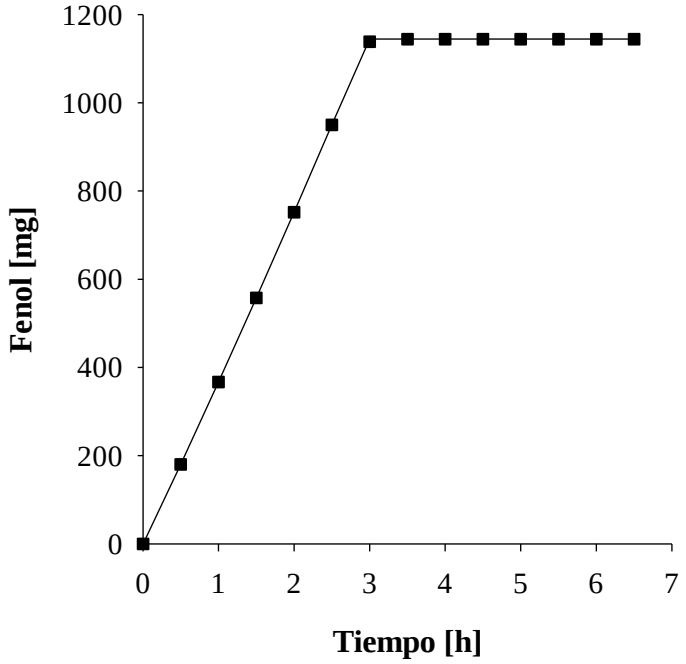


Figura 6.12. Cantidad de fenol alimentado (–) y consumido (■) en el experimento SBR-2

La Figura 6.13 presenta una comparación entre los datos experimentales y los obtenidos por simulación correspondientes a la concentración de fenol (S_1), de los intermediarios metabólicos (S_2) y de la biomasa (X) durante el experimento SBR-2. Nuevamente, el ajuste del modelo es bueno y confirma la pertinencia de su aplicación al sistema biológico estudiado.

Aunque los niveles de los intermediarios (S_2) no se determinaron experimentalmente, puede compararse lo que predice el modelo para los experimentos dinámicos SBR-1 y SBR-2. En este último se produciría una menor cantidad de intermediarios, lo que podría explicar que no se constata ninguna inhibición de la degradación del fenol. Lo anterior es significativo ya que las velocidades de alimentación (Q) son muy semejantes en los dos experimentos. La principal diferencia entre ambos reside en las condiciones de arranque de la alimentación ya que en el SBR-1 parte de una concentración cercana a la inhibitoria (la cual posteriormente aumenta y conduce efectivamente a dicho estado) que disminuye

notoriamente la eficiencia del proceso, mientras que en el SBR-2 mantiene la concentración del sustrato muy por debajo de los niveles que podrían inhibir a los microorganismos.

Bajo las condiciones de este experimento, la eliminación del fenol alcanza 100% y conservadoramente se podría disminuir la duración total del ciclo SBR de 6 a 4 horas con respecto al experimento SBR-1. La velocidad de consumo de fenol corresponde entonces a 6.19 kg fenol/m^3·d, la cual es aproximadamente el doble de la reportada por Yoong *et al*. (2000).

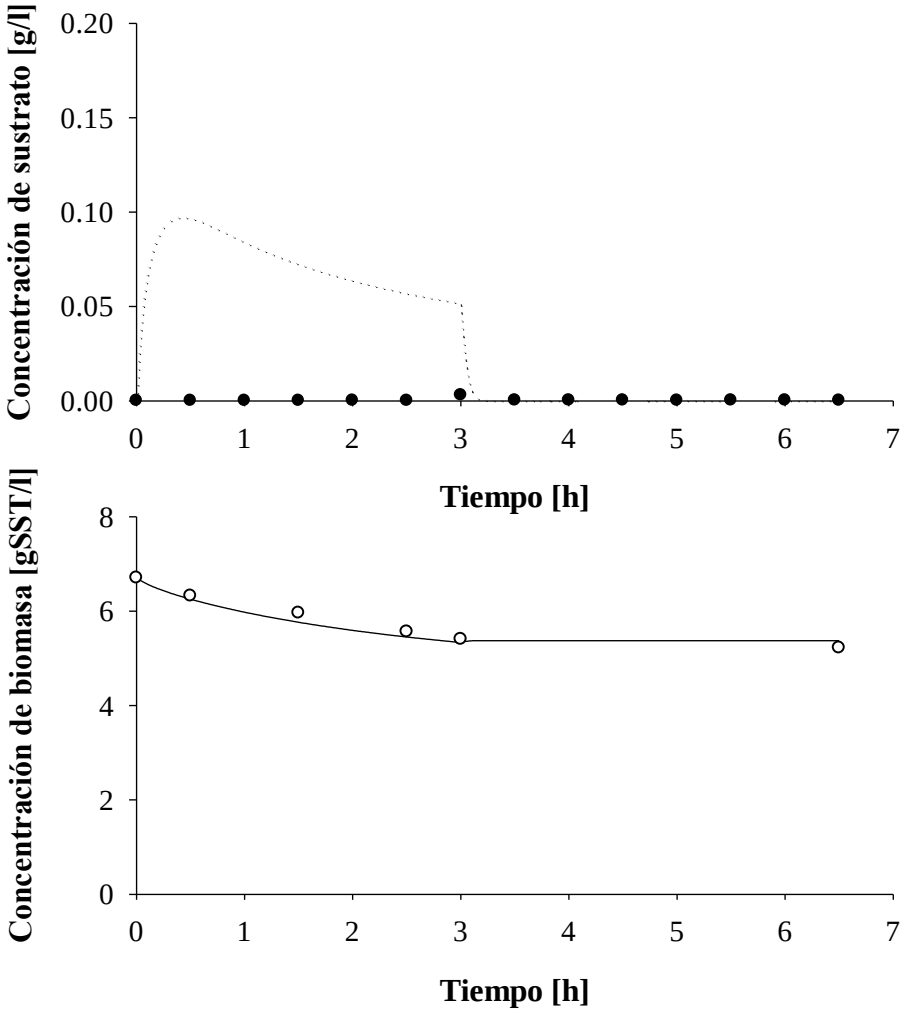


Figura 6.13. Concentraciones medidas de fenol (●) y de biomasa (○) durante el experimento SBR-2. Los resultados de simulación se representan por líneas continuas. La línea discontinua representa el comportamiento de los intermediarios metabólicos (S_2) calculado por el modelo.

6.2 Simulación del Proceso SBR

Con base en las observaciones realizadas durante el desarrollo del proyecto y los resultados obtenidos de las cinéticas, se deduce que el perfil de llenado o la alimentación del reactor es uno de los puntos clave para lograr maximizar la velocidad de biodegradación de fenol (Yu *et. al.*, 1996). Es por esto que se realizaron simulaciones con diferentes perfiles de alimentación, concentraciones de fenol y de biomasa para encontrar una estrategia de alimentación más adecuada para el reactor SBR y aumentar la eficiencia de su operación. Las simulaciones se realizaron utilizando el modelo de biodegradación desarrollado y el software MatLab 6.5.0 release 13 (The MathWorks Inc., E.U.A).

Para la realización de dichas simulaciones se modificó en varios puntos el modelo desarrollado. Primero, el proceso de alimentación se cambió de modo *batch* a *fed batch* para representar mejor la operación del reactor, ya que en el proceso real se utilizó una bomba peristáltica a una velocidad constante de alimentación, lo cual afecta directamente la dinámica del proceso aumentando la eficiencia de remoción. Segundo, la concentración de fenol dentro del reactor se puso en función de la concentración del influente. Además, se incluyó en el modelo la dilución en la concentración de fenol que se llevaría a cabo durante la alimentación, así también la de la concentración de SST. Las ecuaciones modificadas del modelo serían las siguientes:

$$\frac{dx_1}{dt} = \mu_1 * x_1 - (\frac{Q}{V}) * x_1 - kd_1 * x_1$$

$$\frac{dx_2}{dt} = \mu_2 * x_2 - (\frac{Q}{V}) * x_2 - kd_2 * x_2$$

$$\frac{ds_1}{dt} = \frac{-\mu_1}{Y_{x/s_1}} * x_1 - (\frac{Q}{V}) * s_1 + (\frac{Q}{V}) * Sa$$

$$\frac{ds_2}{dt} = \frac{\mu_1 * \alpha * x_1 - \mu_2 * x_2}{Y_{x/s_2}} - (\frac{Q}{V}) * s_2$$

$$\frac{dV}{dt} = Q$$

Donde:

dx_1= Ecuación de dilución de la biomasa 1

dx_2= Ecuación de dilución de la biomasa 2

ds_1= Ecuación de dilución del sustrato 1

ds_2= Ecuación de dilución del sustrato 2

Q = Velocidad de flujo de alimentación

El proceso a considerar es el mismo, con un reactor con un volumen inicial de 1 litro, conteniendo diferentes concentraciones de SST, alimentación del agua residual sintética con fenol hasta alcanzar el volumen final (2 l). Luego, la alimentación se suspende y se mantiene la aireación hasta completar un ciclo de 24 horas, en el que se incluyen 45 minutos de sedimentación y 15 minutos para la extracción del efluente.

A continuación se presentan algunas de las simulaciones que presentaron un buen rendimiento del proceso:

Simulación N°1

Condiciones de simulación:

X_0= 1000 mg/l

S_0= 2000 mg/l

Q= 0.1 l/h

Perfil: Pulsos de una hora espaciados cada hora

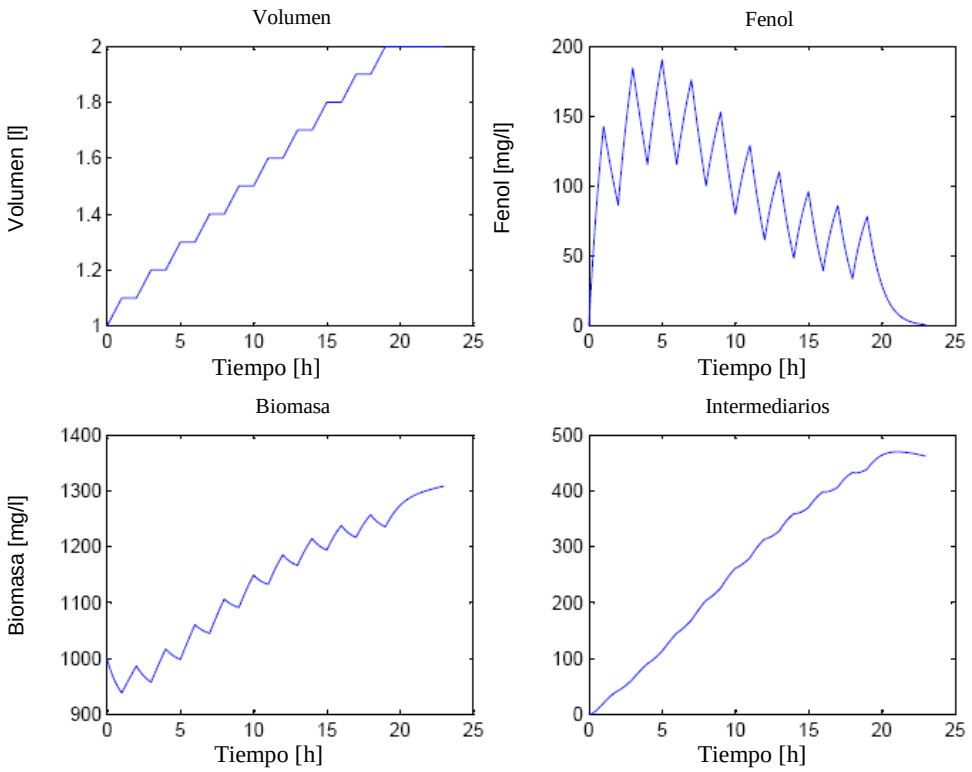


Figura 6.14. Simulación N° 1 del modelo de biodegradación de fenol

Como puede observarse en la Figura 6.14, la degradación del fenol es total, no así la de los intermediarios que se acumulan a lo largo de 21 horas. Si se continuara con varios ciclos más con el mismo perfil de alimentación podríamos tener una acumulación muy alta de los intermediarios, lo cual sería dañino para el consorcio microbiano. Por esta razón, no se considera viable dicho perfil de alimentación.

Simulación N° 2

Condiciones de simulación:

X_0= 1000 mg/l

S_0= 2000 mg/l

Q= 0.2 l/h

Perfil: Un pulso de una hora, espaciado de 11 horas y un pulso de 4 horas

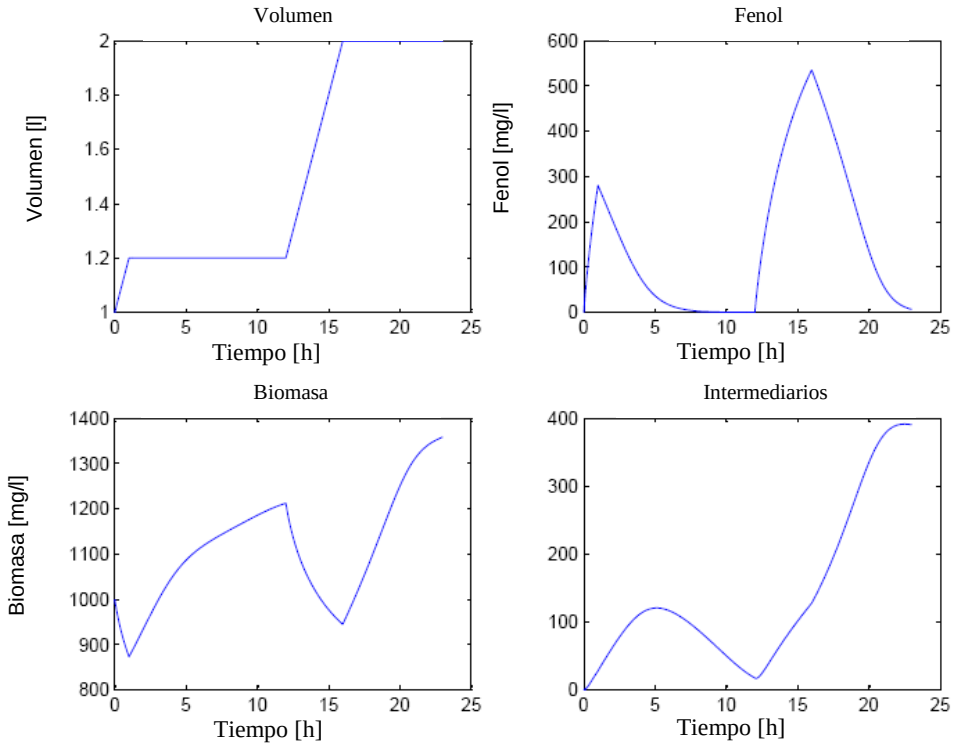


Figura 6.15. Simulación N° 2 del modelo de biodegradación de fenol

En este perfil (Figura 6.15) se aprecia, como en el anterior, que la degradación del fenol es completa. La presencia de los intermediarios, a pesar de haber disminuido, aún sigue siendo alta, lo cual lleva a los mismos resultados: una posible muerte de los microorganismos o una disminución importante en el rendimiento del proceso.

Con base en el análisis de los resultados anteriores, se encontró que la concentración de fenol era muy alta y se optó por disminuir la concentración del mismo a 1 g/l; además, como se observó una disminución en la producción de intermediarios, se decidió seguir probando el mismo perfil (alimentación de 200 ml de agua residual en 1 hora, 11 horas de reacción, alimentación de 800 ml de fenol en 4 horas y finalmente 7 horas de reacción).

Simulación N° 3

Condiciones de simulación:

X_0= 1000 mg/l

S_0= 1000 mg/l

Q= 0.2 l/h

Perfil: Un pulso de una hora, espaciado de 11 horas y un pulso de 4 horas

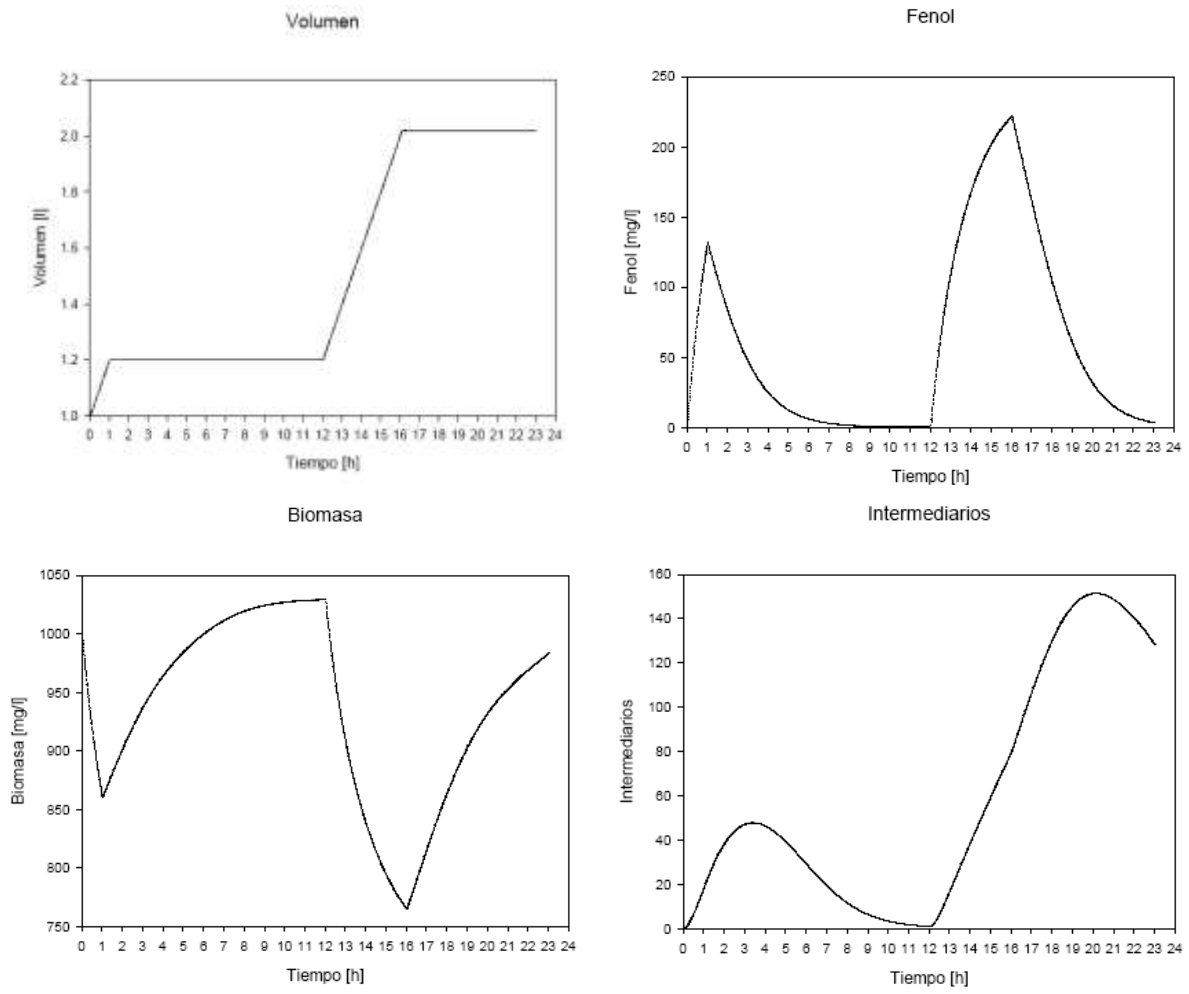


Figura 6.16. Simulación N° 3 del modelo de biodegradación de fenol

Como se observa en las gráficas de la Figura 6.16, la degradación del fenol sigue sin representar mayor problema, mientras que la concentración de los intermediarios es considerablemente menor; además, muestra una tendencia a disminuir con el paso del

tiempo. Tomando en cuenta lo anterior, se decidió probar un proceso de 3 ciclos continuos de 23 horas; a continuación se presentan los resultados obtenidos.

Simulación N° 4

Condiciones de simulación:

X_0= 1000 mg/l

S_0= 1000 mg/l

Q= 0.2 l/h

Perfil: Un pulso de una hora, espaciado de 11 horas y un pulso de 4 horas

N° de Ciclos: 3

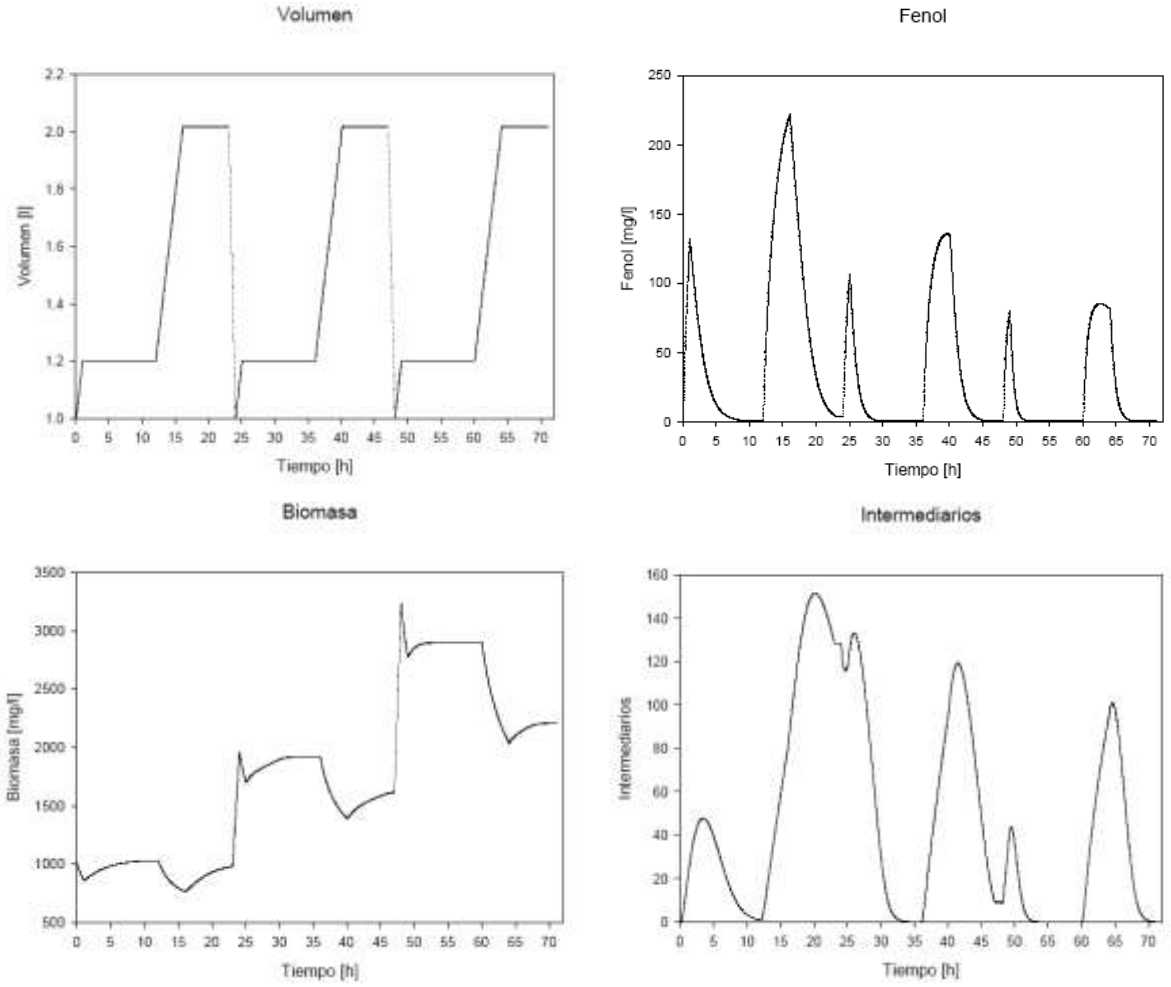


Figura 6.17. Simulación N° 4 del modelo de biodegradación de fenol

Las gráficas anteriores (Figura 6.17) muestran cómo la degradación de los intermediarios producidos es total después de 3 ciclos del proceso, esto gracias a que después de cada ciclo, al llegar a la etapa de vaciado del reactor, la concentración de biomasa se duplica y por ende el fenol y los intermediarios son degradados con mayor facilidad, evitando la acumulación de estos. Una de las recomendaciones que surgirían en torno a este perfil de alimentación sería que después de cada 3 ciclos se realizara una purga de la biomasa, primero, para mantener una población microbiana joven y segundo, para mantener la concentración de biomasa debajo de 1.0 g/l y volver las condiciones iniciales del proceso.

Los resultados obtenidos por la simulación del modelo sugieren que, después de varios ciclos de trabajo a altas concentraciones de fenol, la operación del proceso podría verse afectada debido a una acumulación importante de los intermediarios producidos, lo que ocasiona la muerte progresiva de los microorganismos. Una situación similar se presentó cuando se operó el reactor con un perfil de alimentación que mantenía un flujo de entrada igual a 0.2 l/h durante 5 horas con una concentración de fenol de 1 g/l, donde, después de varios ciclos con el mismo perfil de alimentación y a la misma concentración, la eficiencia del reactor fue disminuyendo hasta volverse casi nula en ciclos posteriores.

7. CONCLUSIONES

- **Instrumentación y automatización de un reactor discontinuo de alimentación secuenciada para la biodegradación de fenol:** *Se instrumentó y automatizó el reactor SBR, lo que permitió controlar procesos de degradación con patrones de alimentación y ciclos de funcionamiento controlados.*

- **Obtención de poblaciones microbianas capaces de biodegradar fenol en condiciones aerobias:** *Se logró la adaptación de dos poblaciones de lodos activados para degradar fenol en rangos de concentraciones de 20 – 700 y de 20 – 1300 mg/l utilizando el método SCAS.*

- **Estudio de la cinética de biodegradación aerobia del fenol utilizando las poblaciones microbianas obtenidas:** *Se realizaron varios ensayos discontinuos a distintas condiciones iniciales de concentración de sustrato y de biomasa (S_0 y X_0). Los resultados de dichos ensayos muestran un comportamiento atípico de la biomasa, ya que se detectó un crecimiento residual luego de la remoción completa de fenol, lo cual según el modelo de Haldane–Andrews no es factible, pues el crecimiento de los microorganismos termina cuando éstos degradan por completo el sustrato disponible. Este comportamiento se atribuyó a que el proceso de degradación del fenol no se lleva a cabo en un solo paso, sino que al iniciarse la biodegradación se produce un metabolito intermediario, presumiblemente el 2-hmas, cuyo consumo se traduce en el mencionado crecimiento residual de los microorganismos. En virtud de lo anterior, se propuso un esquema de biodegradación en dos etapas.*

- **Desarrollo de los modelos cinéticos que representen los procesos de biodegradación del fenol:** *Debido a que el modelo de Haldane-Andrews no considera el efecto de la producción de metabolitos intermediarios inhibitorios y su eventual acumulación y consumo durante la biodegradación del fenol, en este trabajo se propone un nuevo modelo matemático en el cual este aspecto sí se considera. El modelo demostró describir adecuadamente la evolución de la biomasa y del fenol, tanto en cultivos*

discontinuos como discontinuos alimentados, lo que apoya el esquema de reacción propuesto. Dado que en la bibliografía existen muy pocos modelos de biodegradación para cultivos discontinuos alimentados, el modelo propuesto constituye la principal aportación del presente trabajo. El modelo permitió evaluar dos estrategias distintas de alimentación de un reactor SBR, una de las cuales consiguió remover el fenol a una velocidad mayor (6.19 kg fenol/m^3·d) a la reportada en procesos controlados mediante respirometría.

Sin duda alguna el modelo matemático puede optimizarse, ya que se constató que su capacidad de predicción a relaciones S_0/X_0 reducidas es limitada. Para lo cual, debería mejorarse la técnica de cuantificación de la biomasa, la cual tiene un límite de detección muy alto. El análisis de la absorbancia a 600 nm de suspensiones diluidas de biomasa estabilizadas con glicerina podría contribuir a lograr este objetivo.

- **Selección y validación de una estrategia de operación automática del reactor de alimentación secuenciada que maximice la velocidad de biodegradación del fenol:** *En cuanto a la optimización del proceso de biodegradación, existen varios detalles por concluir, uno de ellos y tal vez el más importante es la puesta en marcha de estrategias de funcionamiento del reactor, previamente simuladas con ayuda del modelo. Así, los ciclos podrían ser más cortos, para aumentar las velocidades de degradación de fenol. Estos puntos deberán plantearse en futuros trabajos de investigación.*

- **Simulación del proceso de biodegradación utilizando el modelo desarrollado**
  Una de las ventajas generadas al simular el proceso de biodegradación permiten probar diferentes condiciones sustrato-biomasa y predecir lo que se puede esperar al realizar las pruebas experimentales, pudiendo traducirse en ahorro de tiempo y reactivos.

Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que el empleo de diferentes perfiles de alimentación es de gran ayuda, tanto para aumentar la velocidad de degradación como para incrementar la concentración de la molécula contaminante con el que se esté trabajando y de esta manera hacer más eficiente el proceso de biodegradación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander M. (1994) Recalcitrant molecules. En: Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego, pp. 272-286.

APHA (1989) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17ª Edición. American Public Health Association, Washington D.C.

Atlas R.M. y Bartha R. (2002) Interacciones entre poblaciones microbianas. En: Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Addison Wesley, Madrid, pp. 59–96.

ATSDR (1998) Toxicological profile for phenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, pp. 127–133.

Autenrieth R.L., Bonner J.S., Akgerman A., Okaygun M. y McCreary E.M. (1991) Biodegradation of phenolic wastes. *J. Hazard. Mat.* 28: 29–53.

Borraccino R. (1997) Biodégradation couplée aérobie/anaérobie de composés phénoliques toxiques. Tesis doctoral, Université de Technologie de Compiègne, Francia.

Bretti-Mandarano J. F. (2002) *Sistema de Tratamiento SBR*. Reporte técnico, Facultad de Ciencias Fisicomatemáticas e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica Argentina.

Bugg T.D.H. y Winfield C.J. (1998) Enzymatic cleavage or aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Nat. Prod. Reports* 15(5): 513–530.

Buitrón G. (1993) Biodégradation de composés xénobiotiques par un procédé discontinu de type SBR. Tesis doctoral, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Francia.

Chiesa S.C., Irvine R.L. y Manning J.F. (1985) Feast/famine growth environments and activated sludge population selection. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 562-569.

Chudoba J. (1985) Quantitative estimation in COD units of refractory organic compounds produced by activated sludge microorganisms. *Water Res.* 19: 37–43.

Chudoba P., Capdeville B. y Chudoba J. (1992) Explanation of biological meaning of the S_0/X_0 ratio in batch cultivation. *Water Sci. Technol*. 26: 743–751.

D'Adamo P.D., Rozich A.F. y Gaudy A.F. (1984) Analysis of growth data with inhibitory carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 397–402.

DOF (1989). Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos de calidad del agua. Diario Oficial de la Federación, México, 13 de diciembre.

ECB (1988) C.12. Biodegradation. Modified SCAS test. Directriz 88/303/EEC. Disponible en: http:// ecb.jrc.it/DOCUMENTS/ Testing-Methods/ANNEXV/C12web1988.pdf

Evans C. y Fuchs G. (1988) Anaerobic degradation of aromatic compound. *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 289-317.

Feitkenhauer H., Schnicke S., Müller R. y Märkl H. (2001). Determination of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus thermoleovorans* sp. A2. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 57: 744–750.

García-Ochoa F. y Santos A. (2001) Oxidación catalítica de compuestos fenólicos en aguas residuales. En: Catalizadores y adsorbentes para la protección ambiental en la región iberoamericana. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, pp. 275–284. Disponible en: http://www.icp.csic.es/cyted/

García-Sánchez J.L., Kamp B., Onysko K.A., Budman H. y Robinson C.W. (1998) Double inhibition model for degradation of phenol by *Pseudomonas putida* Q5. *Biotechnol. Bioeng.* 60: 560–567.

Harwood C.S. y Parales R.E. (1996) The β-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 553–590.

Heesche-Wagner K., Schwarz T. y Kaufmann M. (1999) Phenol degradation by an enterobacterium: a *Klebsiella* strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase. *Can. J. Microbiol*. 45(2): 162–171.

Hernández P.I., Aguilar P.J., López S.E. y Schifter S.I. (1998) Descomposición de fenol en medio acuoso con peróxido de hidrógeno catalizada por cenizas provenientes de la combustión de carbón mineral. En: Catalizadores y adsorbentes para la protección ambiental en la región iberoamericana. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, pp. 271-274. Disponible en: http://www.icp.csic.es/cyted/

Hill G.A. y Robinson C.W. (1975) Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng*. 17: 1599–1615.

Hooke R. y Jeeves T.A. (1961) Direct search solution of numerical and statistical problems. *J. Assoc. Comp. Machinery* 8: 212–229.

Ketchum L.H. (1996) Design and physical features of sequencing batch reactors. *Water Sci. Technol.* 35(1): 11–18.

Komarkova E., Klapkova E., Stiborova M., Soccol C.R. y Sobotka M. (2003) Physiological changes of *Candida tropicalis* population degrading phenol in fed batch reactor. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46(4): 537-543.

Kumar A., Kumar S. y Kumar S. (2005) Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.* 22: 151–159.

Kumaran P. y Paruchuri Y.L. (1997) Kinetics of phenol biotransformation. *Water Res.* 31: 11–22.

Lacorte S. y Barceló D. (1995) Determination of organophosphorous pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 712: 103–112.

Léonard D., Ben Youssef C., Destruhaut C., Lindley N.D. y Queinnec I. (1999) Phenol degradation by *Ralstonia eutropha*: colorimetric determination of 2-hydroxymuconate semialdehyde accumulation to control feed strategy in fed-batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng*. 65(4): 407–415.

Livingston A.G. y Chase H.A. (1989) Modeling phenol degradation in a fluidized-bed bioreactor. *AIChE J.* 35: 1980–1992.

Mace S. y Mata A. J. (2002). Utilization of SBR technology for wastewater treatment: an overview. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41: 5539-5553.

Monteiro A.A.M.G., Boaventura R.A.R., Rodriguez A.E. (2000) Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DSM 548 in a batch reactor. *Biochem. Eng. J.* 6: 45–49.

Mörsen A. y Rehm H.-J. (1990) Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 206–212.

Nuhoglu A. y Yalcin B. (2005) Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochem.* 40: 1233–1239.

OCDE (2003) SIDS Initial Assessment Report For SIAM 16, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, Francia.

Pawlowsky U. y Howell J.A. (1973) Mixed culture biooxidation of phenol I. Determination of kinetic parameters. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 889–896.

Ramírez C.I. (2005) Biodegradación de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada. Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Reardon K.F., Mosteller D.C. y Bull Rogers J.D. (2000) Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 385–400.

Rittmann B.E. y McCarty P.L. (2001) Biotecnología del medio ambiente – Principios y aplicaciones, 1ª Edición. McGraw-Hill, Madrid.

Rodríguez M. (2003) Fenton and UV-vis based advanced oxidation processes in wastewater treatment: Degradation, mineralization and biodegradability enhancement. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, España.

Disponible en: http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0718103-115659/TOL208.pdf

Ruiz C., Torrijos M., Sousbie P., Lebrato-Martínez J. y Moletta R. (2000) The anaerobic SBR process: basic principles for design and automation. Actas del *2nd International Symposium on Sequencing Batch Reactor Technology*, Narbonne, Francia.

Şeker Ş., Beyenal H., Salih B. y Tanyolaç A. (1997) Multi-substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 610–614.

Semple K.T. y Cain R.B. (1996) Biodegradation of phenols by the algae *Ochromonas danica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 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.

Disponible en: http://opus.tu-bs.de/opus/volltexte/2003/431/pdf/Dissertation.pdf

VanBriesen J.M. y Ritmann B.E. (2000) Mathematical description of microbiological reactions involving intermediates. *Biotechnol. Bioeng.* 67: 35–52.

Vázquez-Rodríguez G.A. y Beltrán-Hernández R.I. (2004) Pruebas normalizadas para la evaluación de la biodegradabilidad de sustancias químicas. Una revisión. *Interciencia* 29(10): 568–573.

Wang S.J. y Loh K.C. (1999) Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 177–184.

Watanabe K., Hino S. y Takahashi N. (1996) Responses of activated sludge to an increase in phenol loading. *J. Ferment. Bioeng*. 82(5): 522-524.

WHO (1994) Phenol Environmental Health Criteria 161. World Health Organization. Disponible en: http://www.inchem.org/

Woolard C.R. e Irvine R.L. (1995) Treatment of hypersaline wastewater in the SBR. *Water Res.* 29(4): 1159–1168.

Yoong E.T., Lant P.A. y Greenfield P.F. (2000) *In situ* respirometry in an SBR treating wastewater with high phenol concentrations. *Water Res.* 34(1): 239–245.

Yu H.Q., Gu G.W. y Song L.P. (1996) The effect of fill mode on the performance of sequencing-batch reactors treating various wastewaters. *Bioresource Technol*. 58: 49–55.

ANEXO A. PROGRAMAS PARA LA SIMULACIÓN DEL MODELO

```
function [ydot] = perfil_modelo(t,y, Q, Sa, Qa)
%-----------------------------------------------------------------------
% Función que se utiliza para simular el modelo
%-----------------------------------------------------------------------

% Lee las variables del modelo
x1=y(1); % Biomasa 1
x2=y(2); % Biomasa 2
s1=y(3); % Fenol
s2=y(4); % Intermediario
v =y(5); % Volumen

% Lee los parámetros del modelo
mu_max1    = 0.25;
K_s1       = 300;
K_i1       = 450;
Y_x_s1     = 0.67;
kd1        = 0;

mu_max2    = 0.1;
K_s2       = 70;
K_i2       = 90;
alfa       = 0.95;
Y_x_s2     = 0.8;
kd2        = 0;

% Calculo de velocidades de crecimiento y consumo
mu1 = mu_max1 * s1/(K_s1 + s1 + s1^2/K_i1);
mu2 = mu_max2 * s2/(K_s2 + s2 + s2^2/K_i2);

%Simulación del flotador
if v >= 2
      Qa = 0;
end

% Cálculo de las ecuaciones diferenciales
dx1 = mu1*x1 - ((Qa*Q)/v)*x1 - kd1*x1;
dx2 = mu2*x2 - ((Qa*Q)/v)*x2 - kd2*x2;
ds1 = -mu1/Y_x_s1*x1 - ((Qa*Q)/v)*s1 + ((Qa*Q)/v)*Sa;
ds2 = mu1*alfa*x1 - mu2/Y_x_s2*x2 - ((Qa*Q)/v)*s2;
dv  = Qa*Q;

ydot= [ dx1; dx2; ds1; ds2; dv];
```

```
%perfil.m
%prueba diferentes perfiles de llenado
%Utiliza condiciones iniciales 0

clear all
close all

% Condiciones iniciales
x0=[  1000*0.6;...  % Biomasa1 inicial (mg)
      1000*0.4;...  % Biomasa2 inicial (mg)
       0;...        % Fenol inicial   (mg)
       0;...        % Intermediario inicial
       1;...        % Volumen inicial del SBR (l)
    ];

%Condiciones de simulación: tiempo inicial, final, paso de integración
t0 = 0;   % inicia tiempo cero
tf = 23;  % 23 horas de operación
h  = .01; % Se simula con un paso máximo de integración de .01 horas

%Perfil de llenado
Qt = [0 1 12 16 23]; % Tiempos de prendido y apagado
Qa = [1 0 1  0  0 ]; % Acción 1 = prender bomba, 0 = apagar bomba
Q =  .200            % Velocidad de flujo de llenado;
Sa = 2000;           % Concentración de fenol en el influente

% Realiza la simulación del modelo con Rungge-Kutta 4/5, utilizando el
% modelo que se encuentra en el archivo "perfil_modelo.m".
% Los parámetros del modelo se encuentran en el modelo mismo
% El modelo utiliza los parámetros de control externos.

% Valores para ir llenando para graficar
Xp = [1000];
Sp = [   0];
Ip = [   0];
Vp = [   1];
tp = [   0];

% Simulación por periodos de tiempo marcados en el perfil de llenado
for i = 2:length(Qt)
      [t_sim,x] = ode45(@perfil_modelo,[t0:h:Qt(i)],x0, [], Q, ...
                        Sa, Qa(i-1));

      % Recupera Información de la simulación

      % Biomasa total es la suma de las dos biomasas
      X1_sim = x(2:end,1);
      X2_sim = x(2:end,2);
      X_sim  = X1_sim + X2_sim;

      S_sim  = x(2:end,3);
      I_sim  = x(2:end,4);
      V_sim  = x(2:end,5);

      % Se agrega a los datos existentes
      Xp = [Xp;X_sim];
      Sp = [Sp;S_sim];
      Ip = [Ip;I_sim];
      Vp = [Vp;V_sim];
      tp = [tp;t_sim(2:end)];
```

```
      % Nuevas condiciones iniciales
      x0 = x(end,:);
      t0 = Qt(i);
end
```

% GRAFICAS Y ALMACENAMIENTO DE INFORMACIÓN

```
% G R A F I C A S

figure(1);

% Gráfica del fenol
subplot(2,2,2);
plot(tp,Sp);
title('Fenol');

% Gráfica de biomasa
subplot(2,2,3);
plot(tp,Xp);
title('Biomasa');

% Gráfica del intermediario
subplot(2,2,4);
plot(tp,Ip);
title('Intermediario');

% Gráfica del volumen
subplot(2,2,1);
plot(tp,Vp);
title('Volumen');


% G U A R D A R

lugar = ['perfiles\perfil_1.xls'];
M  = [tp];
save(lugar, 'M', '-ASCII');

lugar = ['perfiles\perfil_2.xls'];
M  = [Sp];
save(lugar, 'M', '-ASCII');

lugar = ['perfiles\perfil_3.xls'];
M  = [Xp];
save(lugar, 'M', '-ASCII');

lugar = ['perfiles\perfil_4.xls'];
M  = [Ip];
save(lugar, 'M', '-ASCII');

lugar = ['perfiles\perfil_5.xls'];
M  = [Vp];
save(lugar, 'M', '-ASCII');

lugar = ['perfiles\perfil_6.xls'];
M  = [tp Sp Xp Ip Vp];
```

```
save(lugar, 'M', '-ASCII');
```