



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA

TRATAMIENTO POR BIOAUMENTACIÓN DE UN AGUA
CONTAMINADA CON HIDROCARBUROS COLECTADA EN
UN TERRENO EN REHABILITACIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERIA

AMBIENTAL –AGUA

P R E S E N T A:

EVA RUBÍ GARCÍA FLORES

TUTOR:

DR. ALFONSO DURÁN MORENO

2012

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Gabriela Eleonora Moeller Chávez

Secretario: Dra. Petia Mijaylova Nacheva Petia

Vocal: Dr. Alfonso Durán Moreno

1^{er}. Suplente: Dr. Jorge Francisco Rodríguez González

2^{do}. Suplente: Dr. Oscar González Barceló

Lugar donde se realizó la tesis:

Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental (*PIQA y QA*), Laboratorio 301.
Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM, México D.F.

TUTOR DE TESIS:

DR. ALFONSO DURÁN MORENO

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis en esta máxima casa de estudios.

Al Dr. Alfonso Durán Moreno por transmitirme sus conocimientos, por su gran ayuda y enseñanza, por su enorme paciencia pero sobre todo por creer en mí. Muchas gracias por apoyarme tanto Dr.

A cada uno de los integrantes del comité tutorial por su asesoría y sus acertados comentarios durante la realización de mi tesis.

A cada uno de los integrantes del jurado asignado por su aporte tan nutritivo en la revisión de este trabajo de tesis.

A CONACyT por otorgarme como estudiante una beca la cual me permitió concluir mi Maestría.

A LIQAYQA por permitirme hacer uso de sus instalaciones y por poder realizar la etapa experimental.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar conmigo a cada paso, porque Gracias a Ti mi vida es completa y totalmente feliz, por llenarme de bendiciones al darme a la mejor familia y amigos que pueda tener.

A mi hijita hermosa, gracias mi amor por enseñarme a no darme por vencida por difícil que pueda parecer la vida, a ser una guerrera. Este trabajo te lo dedico mi niña linda. Te amo Andrea.

Al amor de mi vida, mi amado esposo, porque en estos 11 años siempre me has apoyado, motivado y has confiado en mí, porque gracias a tu amor y paciencia no claudiqué y seguí adelante y en gran parte este logro te lo debo a ti. Te amo Jorge.

A mis padres por alentarme y apoyarme incondicionalmente, por ser tan buenas personas, porque desde siempre me han cuidado y educado con su gran amor. Los amo Betty y Rubén.

A toda mi familia García Méndez por que en las buenas y en las malas hemos salido adelante, los quiero a cada uno de ustedes.

A mis tíos Domingo y Violeta por sus consejos, por su amor y porque a pesar de vivir tan lejos han estado conmigo en los momentos más importantes de mi vida, los quiero mucho tíos.

A mi tío Alejandro por ser mi amigo, un ejemplo en mi vida. Te quiero por siempre.

A mis suegros Rodolfo y Rosy por sus sabios consejos, por ser mis amigos, por ser tan consentidores y tratarme como a una más de sus hijas, los quiero mucho mucho.

A mi incondicional amigo Dr. Jorge, por creer en mí, por darme el mejor de los regalos: su invaluable amistad. Gracias por ser un ejemplo de sencillez y generosidad, por compartir su gran sabiduría y por siempre estar dispuesto a ayudar a la gente. Lo quiero y admiro mucho Dr.

A toda la familia Manzanos, en especial a Lety por tu valiosa amistad.

A mi gran amiga Norma y a toda su familia, gracias por hacerme sentir especial, gracias Norma por demostrarme que puedo confiar en ti.

A mis amigos queridos: Ara-Bren, Abraham, Angel, Magy, Leo, Dania, Bety, Carlos, Lalo, Selene López, Miriam, Gaby, Selene Rodríguez, Alma y a todos mis amigos de la secundaria 3G (Marisol, Jacobo, Karlo, Ricardo, Marisela, Fabiola, Rodolfo, Karla, Noemí, Benjamín, Víctor y Alejandro).

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 PROBLEMÁTICA	11
1.2 HIPÓTESIS	13
1.3 OBJETIVO GENERAL	13
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	14
2.1 PETRÓLEO	14
2.1.1 <i>Hidrocarburos</i>	14
2.1.2 <i>Compuestos xenobióticos</i>	15
2.2 GENERALIDADES DE SITIOS CONTAMINADOS	17
2.3 DISPERSIÓN DE LOS CONTAMINANTES	18
2.4 SELECCIÓN Y GENERALIDADES DEL SITIO DE ESTUDIO	20
2.5 BIORREMEDIACIÓN	22
2.6 PROCESOS BIOLÓGICOS	23
2.7 GENERALIDADES DE MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN BIODEGRADACIÓN	24
2.7.1 <i>Lodos activados</i>	27
2.7.2 <i>Consortios bacterianos especializados</i>	29
2.8 CRECIMIENTO MICROBIANO	32
2.8.1 <i>Factores que afectan el crecimiento microbiano</i>	35
2.9 ACLIMATACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....	37
2.10 BIOAUMENTACIÓN	38
2.11 CINÉTICA DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS	41
2.12 REACTORES.....	46
2.12.1 <i>Biorreactores</i>	48
2.12.2 <i>Sistemas de cultivo</i>	49
2.12.3 <i>Reactores discontinuos secuenciales (SBR)</i>	61
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	65
3.1 RECOLECCIÓN DEL AGUA CONTAMINADA	65
3.2 CARACTERIZACIÓN DEL AGUA CONTAMINADA.....	65
3.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS CONSORCIOS BACTERIANOS EMPLEADOS.....	67
3.4 PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL	69
3.4.1 <i>Curvas de crecimiento microbiano</i>	69
3.4.2 <i>Aclimatación de C_{HC}, C_{XENOB} y C_{PTARCU}</i>	72
3.4.3 <i>Cinéticas de crecimiento celular y degradación</i>	75
3.5 SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL.....	77
3.5.1 <i>Inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR</i>	77
3.5.2 <i>Incubación del consorcio bacteriano en biorreactor para posteriores inoculaciones al SBR</i>	81

3.5.2.1	Diseño y construcción del biorreactor para incubación del consorcio bacteriano.....	82
3.5.2.2	Tratamiento biológico en el sistema SBR empleando un biorreactor	86
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		91
4.1	RECOLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGUA CONTAMINADA.....	91
4.2	PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL	95
4.2.1	<i>Curvas de crecimiento microbiano</i>	95
4.2.2	<i>Aclimatación de C_{HC}, C_{XENOB} y C_{PTARCU}</i>	101
4.2.2.1	Cinéticas de crecimiento de los tres consorcios y cinéticas de degradación	106
4.3	SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL.....	119
4.3.1	<i>Inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR</i>	119
4.3.2	<i>Sistema de tratamiento: Biorreactor – SBR</i>	125
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES		136
CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA		137
CAPÍTULO 7. ANEXOS.....		145
ANEXO 7.1	TÉCNICA DE DILUCIÓN Y SIEMBRA EN PLACA.....	145
ANEXO 7.2	PATENTE DEL CONSORCIO BACTERIANO COMERCIAL C_{HC} (HIDROCARBUROS).....	146
ANEXO 7.3	MANUAL DE PROCEDIMIENTO DE REACTIVACIÓN DE CONSORCIOS BACTERIANOS COMERCIALES.....	149
ANEXO 7.4	MANUAL DE OPERACIÓN DEL BIO \rightarrow REACTOR MEN [®]	150
ANEXO 7.5	HOJAS TÉCNICAS DE: C_{XENOB} (BI-CHEM [®] DC 1008CB) Y C_{HC} (ABR [®] HYDROCARBON BLEND)	151
ANEXO 7.6	LINEALIZACIONES DE ECUACIÓN DE MONOD, TRES MÉTODOS: LINEWEAVER-BURK, LANGMUIR Y EADIE-HOFSTEE	155
ANEXO 7.7	GRÁFICOS DE PH, INOCULACIÓN DIRECTA E INOCULACIONES SUCESIVAS DEL C_{XENOB} , C_{HC} , C_{XENOB} Y C_{PTARCU}	156
ANEXO 7.8	CÁLCULOS DE OPERACIÓN DEL SISTEMA SBR CON INOCULACIÓN DIRECTA DEL C_{XENOB} E INOCULACIONES SUCESIVAS	157
ANEXO 7.9	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA PTARCU	163
ANEXO 7.10	DIAGRAMA ELÉCTRICO DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR.....	164
ANEXO 7.11	DISTRIBUCIÓN DE UNIDADES HIDROGEOLÓGICAS	165

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1 EJEMPLOS DE CONTAMINANTES USUALES DE UNA REFINERÍA	12
TABLA 2.1 COMPUESTOS XENOBIÓTICOS.....	16
TABLA 2.2 COEFICIENTES CINÉTICOS DE LODOS ACTIVADOS DE BACTERIAS HETEROTRÓFICAS A 20 °C.....	29
TABLA 2.3 COMPOSICIÓN DE UNA CÉLULA BACTERIANA	36
TABLA 2.4 INVESTIGACIONES RELACIONADAS A BIOAUMENTACIÓN	40
TABLA 2.5 DESCRIPCIÓN DE LAS DIFERENTES FASES DE FUNCIONAMIENTO DE UN SBR	62
TABLA 2.6 INVESTIGACIONES RELACIONADAS A SISTEMAS SBR.....	63
TABLA 3.1 PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS, NORMAS MEXICANAS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL AGUA CONTAMINADA.....	66
TABLA 3.2 CONSORCIOS BACTERIANOS EMPLEADOS EN EL TRATAMIENTO EXPLORATORIO.....	68
TABLA 3.3 MASA DE NUTRIENTES Y FÉCULA DE MAÍZ	71
TABLA 3.4 PARÁMETROS DE LAS INOCULACIONES DE LOS CULTIVOS MICROBIANOS EN LOS REACTORES POR LOTE	73
TABLA 3.5 CARACTERÍSTICAS DEL EQUIPO EMPLEADO EN LA EXPERIMENTACIÓN	78
TABLA 3.6 CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL SBR.....	80
TABLA 3.7 ETAPAS DE FUNCIONAMIENTO DEL SBR	80
TABLA 3.8 DATOS EXPERIMENTALES DEL AGUA CONTAMINADA	80
TABLA 3.9 CARACTERÍSTICAS DE DISEÑO, SBR.....	80
TABLA 3.10 CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL BIORREACTOR	86
TABLA 3.11 CARACTERÍSTICAS DE DISEÑO, SBR.....	87
TABLA 3.12 CONCENTRACIÓN DE BIOMASA INOCULADA AL SBR.....	87
TABLA 4.1 CARACTERIZACIÓN DEL AGUA CONTAMINADA	93
TABLA 4.2 CÁLCULO DE μ EN 3 HORAS DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL	98
TABLA 4.3 MÉTODOS DE LINEALIZACIÓN	109
TABLA 4.4 PARÁMETROS CINÉTICOS μ_{MAX} , K_S , Y_S PARA DQO _S Y COD	110
TABLA 4.5 VALORES PROMEDIO DEL SISTEMA DE TRATAMIENTO CON INOCULACIÓN DIRECTA DEL C_{XENOB}	119
TABLA 4.6 VALORES PROMEDIO CON INOCULACIONES SUCESIVAS DEL C_{XENOB} HACIA EL SBR	126

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 CURVA TÍPICA DE CRECIMIENTO PARA UN SISTEMA CERRADO	32
FIGURA 2.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO EN LA TASA DE CRECIMIENTO DE LA BIOMASA	43
FIGURA 2.3 REACTOR POR LOTE	46
FIGURA 2.4 BIORREACTOR CON CAUDALES Y CONCENTRACIONES ENTRADA Y SALIDA	50
FIGURA 2.5 CULTIVO CONTINUO.	53
FIGURA 2.6 LOTE ALIMENTADO.	58
FIGURA 2.7 CULTIVO POR LOTE.	61
FIGURA 2.8 FUNCIONAMIENTO DE UN REACTOR SBR.	63
FIGURA 3.1 INCUBACIÓN MICROBIANA EN BIORREACTORES (DE IZQUIERDA A DERECHA: C_{HC} , C_{XENOB} , C_{PTARCU}).....	71
FIGURA 3.2 ACLIMATACIÓN DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS	74
FIGURA 3.3 SISTEMA EXPERIMENTAL DE LA ACLIMATACIÓN DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS.....	74
FIGURA 3.4 INOCULACIÓN DIRECTA DEL CONSORCIO BACTERIANO HACIA EL SISTEMA SBR.....	79
FIGURA 3.5 INSTALACIÓN DEL BIORREACTOR	84
FIGURA 3.6 BIORREACTOR	85
FIGURA 3.7 INCUBACIÓN DE C_{XENOB} EN EL BIORREACTOR.....	86
FIGURA 3.8 INCUBACIÓN DEL CONSORCIO EN BIORREACTOR PARA POSTERIORES INOCULACIONES EN SBR.....	88
FIGURA 3.9 BIOMASA SEDIMENTADA EN SBR.....	89
FIGURA 3.10 DIAGRAMA GENERAL DE ACTIVIDADES REALIZADAS.....	90
FIGURA 4.1 ZANJA DEL POLÍGONO ZV5	91
FIGURA 4.2 RECOLECCIÓN DEL AGUA	91
FIGURA 4.3 BIOPELICULA CRECIENDO EN LAS "CARGAS BACTERIANAS"	96
FIGURA 4.4 SÓLIDOS SEDIMENTABLES DE LOS TRES CONSORCIOS MICROBIANOS	96
FIGURA 4.5 CURVA DE CRECIMIENTO C_{HC}	97
FIGURA 4.6 C_{HC}	99
FIGURA 4.7 C_{XENOB}	99
FIGURA 4.8 C_{PTARCU}	99
FIGURA 4.9 VARIACIÓN DE DQO ₅ EN LOS REACTORES: X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} Y X^2_{PTARCU}	101
FIGURA 4.10 REMOCIÓN DE DQO ₅ EN REACTORES: X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} Y X^2_{PTARCU}	102
FIGURA 4.11 VARIACIÓN DE COD EN LOS REACTORES: X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} Y X^2_{PTARCU}	103
FIGURA 4.12 REMOCIÓN DE COD EN REACTORES: X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} Y X^2_{PTARCU}	103
FIGURA 4.13 VARIACIÓN DE DQO ₅ EN CADA CICLO DEL RECAMBIO DE AGUA CONTAMINADA	104
FIGURA 4.14 VARIACIÓN DE COD EN CADA CICLO DEL RECAMBIO DE AGUA CONTAMINADA	105
FIGURA 4.15 BIOMASA DE X^2_{HC} , X^2_{XENOB} Y X^2_{PTARCU}	105
FIGURA 4.16 TASA DE CRECIMIENTO ESPECÍFICO VS CONCENTRACIÓN DE DQO ₅ . X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}	107
FIGURA 4.17 TASA DE CRECIMIENTO ESPECÍFICO VS CONCENTRACIÓN DE COD. X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}	107
FIGURA 4.18 LINEALIZACIÓN DE LA ECUACIÓN DE MONOD (LINEWEAVER-BURK), DQO ₅	108
FIGURA 4.19 LINEALIZACIÓN DE LA ECUACIÓN DE MONOD (LINEWEAVER-BURK), COD	109
FIGURA 4.20 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN PARA DQO ₅ . X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}	112
FIGURA 4.21 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN PARA COD. X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}	113
FIGURA 4.22 REMOCIÓN DE DQO ₅ (48 H DE TRATAMIENTO). X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}	114

FIGURA 4.23 REMOCIÓN DE DQO ₅ DESPUÉS DE 48 H. X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}	114
FIGURA 4.24 REMOCIÓN DE COD (48 H DE TRATAMIENTO). X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}	115
FIGURA 4.25 REMOCIÓN DE COD DESPUÉS DE 48 H. X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}	115
FIGURA 4.26 RENDIMIENTO DE LOS CULTIVOS PARA X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU} PARA DQO ₅	116
FIGURA 4.27 RENDIMIENTO DE LOS CULTIVOS PARA X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU} PARA COD	117
FIGURA 4.28 CARGA ORGÁNICA DEL SISTEMA CON INOCULACIÓN DIRECTA DEL C_{XENOB} HACIA EL SBR	121
FIGURA 4.29 RELACIÓN DQO ₅ Y SST CON INOCULACIÓN DIRECTA DEL C_{XENOB}	122
FIGURA 4.30 BIODEGRADACIÓN DE DQO ₅ Y COD CON INOCULACIÓN DIRECTA AL SBR CON C_{XENOB}	123
FIGURA 4.31 REMOCIÓN DE DQO ₅ Y COD CON INOCULACIÓN DIRECTA AL SBR	124
FIGURA 4.32 SÓLIDOS EN SBR CON INOCULACIÓN DIRECTA DEL C_{XENOB}	124
FIGURA 4.33 CARGA ORGÁNICA CON INOCULACIONES SUCESIVAS DEL C_{XENOB}	126
FIGURA 4.34 SST Y SSV DEL C_{XENOB} GENERADOS EN EL BIORREACTOR	127
FIGURA 4.35 UFC GENERADAS DEL C_{XENOB} EN EL BIORREACTOR	128
FIGURA 4.36 UFC DEL C_{XENOB} EN SBR CON INOCULACIONES SUCESIVAS	129
FIGURA 4.37 BIODEGRADACIÓN DE DQO ₅ Y COD CON INOCULACIONES SUCESIVAS	130
FIGURA 4.38 REMOCIÓN DE DQO ₅ Y COD EN SBR CON INOCULACIONES SUCESIVAS DEL C_{XENOB}	131
FIGURA 4.39 SSV EN SBR CON INOCULACIONES SUCESIVAS DEL C_{XENOB}	132
FIGURA 4.40 COMPARACIÓN DE SSV: INOCULACIÓN DIRECTA E INOCULACIONES SUCESIVAS EN SBR CON C_{XENOB}	133
FIGURA 4.41 MICROORGANISMOS EN EL BIORREACTOR DESPUÉS DE 2 DÍAS DEL ARRANQUE DEL SISTEMA	134
FIGURA 4.42 MICROORGANISMOS EN SBR DESPUÉS DE 2 DÍAS DEL ARRANQUE DEL SISTEMA	134
FIGURA 4.43 UFC PRESENTES EN EL BIORREACTOR	134
FIGURA 4.44 COLONIA 1	135
FIGURA 4.45 COLONIA 2	135
FIGURA 4.46 COLONIA 3	135
FIGURA 4.47 COLONIA 4	135

RESUMEN

Las actividades de la industria petrolera traen como consecuencia la introducción de contaminantes al ambiente. Desde la etapa inicial de prospección y exploración donde el objetivo es la producción del crudo a gran escala hasta la etapa de procesamiento para obtener productos de consumo final como combustibles y todo tipo de derivados petroquímicos se maneja una cantidad importante de materiales potencialmente contaminantes del entorno geográfico.

Entre muchas técnicas de limpieza disponibles para remover los hidrocarburos del petróleo presentes en el suelo y en las aguas subterráneas, el proceso de biorremediación está ganando campo debido a su simplicidad, alta eficiencia y a la efectividad en costos cuando se comparan con otras técnicas. Este proceso confía en la habilidad natural de los microorganismos para llevar a cabo la mineralización de compuestos químicos, hacia productos finales como CO_2 , H_2O y formación de biomasa.

Este estudio está encaminado a la aplicación de bioaumentación con el objetivo de lograr incrementos en las remociones de demanda química de oxígeno soluble (DQO_s) y carbono orgánico disuelto (COD) en un agua somera contaminada colectada en un terreno en rehabilitación de lo que fue anteriormente una refinería.

Bajo las mismas condiciones de pH, temperatura, oxígeno disuelto y medio mineral se realizaron pruebas por lotes para determinar si la bioaumentación ofrecía ventajas adicionales a un sistema de tratamiento biológico convencional. Se emplearon tres consorcios microbianos, dos de ellos especializados en la degradación de compuestos derivados del petróleo y otro procedente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria (PTARCU). Para una concentración de biomasa de 350 mg/L, la mayor remoción alcanzada de DQO_s y COD fue del 51 y 43 %, respectivamente, empleando el consorcio especializado en la biodegradación de orgánicos recalcitrantes frente a otro consorcio -especializado en la degradación de hidrocarburos-.

Se empleó el sistema de tratamiento del agua contaminada en un SBR aplicando bioaumentación mediante dos vías, en la primera se inoculó directamente el consorcio microbiano hacia el reactor, obteniéndose el 69 y 66 % de remoción para DQO_s y COD, respectivamente, en el primer día de tratamiento; en la segunda vía se reactivó el consorcio en un biorreactor para sus posteriores inoculaciones hacia el SBR, obteniéndose el 78 y 72 % de remoción de DQO_s y COD, respectivamente, en 3 días de tratamiento.

1.1 PROBLEMÁTICA

Del petróleo se obtienen determinados compuestos que son la base de diversas cadenas productivas que determinan una amplia gama de productos denominados petroquímicos utilizados en las industrias de fertilizantes, plásticos, alimenticia, farmacéutica, química y textil, entre otras.

La desproporción entre el volumen creciente de residuos peligrosos generados y las capacidades existentes de manejo, vigilancia y control, dan lugar a un incompleto o en el peor de los casos nulo tratamiento de contaminantes en tiraderos, drenajes municipales, barrancas, en carreteras y cuerpos de agua. Esto origina contaminación crónica de los suelos y de los cuerpos de agua superficial y subterránea que son fuente de abastecimiento de agua potable.

Al transportar el crudo a los sistemas de almacenamiento para su debido tratamiento existe la posibilidad de derrames del crudo debido a la fatiga y ruptura de tuberías, bombas y tanques de almacenamiento. Los derrames generan situaciones de extrema agresión al medio ambiente en sus distintas matrices, muy a pesar de la política de prevención, contingencia y saneamiento puesta de manifiesto en la actualidad por las empresas productoras.

En la refinería se manejan volúmenes importantes de crudo, los cuales son sometidos al conjunto de operaciones y procesos de refinación, donde se incluyen materiales auxiliares necesarios para la obtención de las corrientes que conforman toda la gama de productos comerciales, tales como, combustibles ligeros y medios (gasolina, kerosén, diesel), combustibles residuales, aceites lubricantes, y otros productos (López et al., 1999).

Como consecuencia de la refinación del petróleo, es posible la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos en aguas residuales de la refinería. En la Tabla 1.1 se presentan algunos compuestos típicos encontrados en las aguas residuales de una refinería, provenientes de la actividad propia de los distintos tratamientos físicos y químicos efectuados sobre el crudo (López et al., 1999).

Tabla 1.1 Ejemplos de contaminantes usuales de una refinería

Contaminante	Compuestos representativos
Hidrocarburos alifáticos y aromáticos	n-hexano, ciclohexano, benceno, tolueno, xilenos, etilbenceno, 1,2,4-trimetilbenceno, aromáticos policíclicos, etc.
Oleofinas	Etileno, propileno, butadieno, estireno
Clorados	Tetracloroetileno, tricloroetileno, tetracloruro de carbono, diclorometano, 1,2 dicloroetano, etc.
Oxigenados	Metanol, fenoles, formaldehido, MTBE, MEK.
Metálicos	Compuestos de níquel, de cobalto y de plomo.
Otros	Amoniaco, nitratos, ácido fosfórico, ácido fluorhídrico.

Fuente: (López et al., 1999)

El conjunto de actividades de la industria del petróleo finaliza con la etapa de almacenamiento y distribución final de los productos comerciales. En esta fase, al igual que en la de transporte, la matriz de contaminantes está presente con los frecuentes derrames en tuberías, tanques y en el momento de la distribución de los distintos productos.

1.2 HIPÓTESIS

Si se realiza bioaumentación de un consorcio microbiano para la biodegradación de compuestos derivados del petróleo mediante un biorreactor, se podrá entonces lograr el mejoramiento en el funcionamiento de un reactor SBR para la depuración de un agua contaminada con hidrocarburos colectada en un terreno en rehabilitación de una ex refinería.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso de bioaumentación para el tratamiento biológico en un agua contaminada con hidrocarburos colectada en la ex refinería 18 de Marzo, utilizando dos diferentes consorcios bacterianos comerciales. Se emplearon lodos provenientes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria (PTARCU) para determinar cuál de los tres consorcios microbianos es el más viable en la biodegradación de los contaminantes presentes en dicha agua.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✦ Comparar el desempeño en reactores por lotes de tres diferentes tipos de consorcios bacterianos, dos comerciales y lodos de la PTARCU, en la biodegradación de compuestos derivados del petróleo presentes en un agua contaminada colectada en la ex refinería 18 de Marzo, para seleccionar el consorcio microbiano en términos de las eficiencias de biodegradación probados en condiciones similares.
- ✦ Evaluar el comportamiento en cuanto a la degradación de la materia orgánica se refiere de un Reactor Discontinuo Secuencial (SBR), al realizar bioaumentación sin previa reactivación del consorcio microbiano seleccionado en el tratamiento biológico previo de un agua contaminada generada de actividades de la ex refinería 18 de Marzo.
- ✦ Evaluar el comportamiento del SBR en relación al incremento de los porcentajes de remoción de la materia orgánica, empleando bioaumentación mediante un biorreactor para llevar a cabo una previa reactivación del consorcio y posteriormente efectuar inoculaciones sucesivas hacia el SBR.

2.1 PETRÓLEO

El petróleo es una mezcla compleja de sustancias formadas por restos animales y vegetales que han estado sometidos a la acción bacteriana y a la catalítica de algunos compuestos inorgánicos durante millones de años. Sus características y la proporción de sus constituyentes varían en función de su origen geológico y geográfico. El petróleo contiene una gran cantidad de hidrocarburos saturados y los productos que se obtienen de él como lo son la gasolina, el aceite combustible, los aceites lubricantes y la parafina consisten principalmente en mezclas de estos hidrocarburos que varían de los líquidos más ligeros a los sólidos (Flores et al., 2004).

Siendo entonces el petróleo un producto natural, la propia naturaleza es capaz de reincorporar una muy pequeña fracción de éste a los ciclos biogeoquímicos, ya que la complejidad química de algunos de sus constituyentes hace que el proceso requiera varios años (Flores et al., 2004).

Cuando la cantidad de petróleo en el ambiente es mayor de la que puede ser reciclada, se convierte en un contaminante de impacto negativo, ya que entre sus componentes existen altas concentraciones de sustancias consideradas como residuos peligrosos por su efecto dañino a la salud. Ejemplos de estos son: benceno, tolueno, etilbenceno, xileno, naftaleno, antraceno, fenantreno, cresoles, fenoles, ciclopentano, ciclohexano y etileno (Flores et al., 2004).

2.1.1 Hidrocarburos

Los hidrocarburos están constituidos únicamente por carbono e hidrógeno, y forman la base estructural común de todos los demás compuestos orgánicos. La mayoría se extrae de combustibles fósiles, en particular el petróleo, pero también del gas natural y de la hulla. Otras fuentes importantes incluyen la madera y los productos de fermentación de las plantas (Flores et al., 2004).

Las moléculas de hidrocarburos contienen de 8 a 40 átomos de carbono. La gasolina está compuesta típicamente del 41 al 62 % de hidrocarburos alifáticos, el resto, del 10 al 59% son hidrocarburos aromáticos incluyendo benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) (Vieira et al., 2009).

Los BTEX son los compuestos orgánicos volátiles más comunes presentes en los sitios contaminados por petróleo. Los depósitos subterráneos, los sitios de producción y los derrames accidentales de petróleo son la fuente más importante de la contaminación del suelo y del agua subterránea con BTEX (USEPA, 2000).

Los aromáticos en su mayoría generan actividad carcinogénica en humanos y animales, la presencia de estas sustancias químicas en suelos, y en yacimientos de agua de consumo humano representa un peligro enorme a la salud de quienes tengan contacto con sitios contaminados con hidrocarburos, ya que se trata de sustancias no metabolizables para el individuo, es decir, el cuerpo humano no las puede degradar, pero tampoco desechar, de modo que son absorbidas por algún tejido principalmente en el adiposo de cualquier organismo por ser los hidrocarburos solubles en grasa, provocando la mutación de sus células dando como resultado diferentes tipos de cáncer (Flores et al., 2004).

Los hidrocarburos aromáticos se incluyen en la lista de contaminantes regulados por la USEPA, de los estándares de agua potable para consumo humano, los límites máximos permisibles para BTEX son de 0.005, 1.0, 0.7, y 10 mg/L, respectivamente (USEPA, 1997). En México, los límites máximos permisibles para los BTEX en agua potable son de 0.05, 0.3, 0.7, y 0.5 mg/L, respectivamente (DOF, 2000).

Se han realizado varios estudios describiendo la biodegradación de hidrocarburos derivados del petróleo (Leahy et al., 1990; Chapelle, 1999; Prince et al., 2007; Vieira et al., 2007). Determinadas poblaciones microbiológicas son capaces de degradar hidrocarburos bajo condiciones aerobias y anaerobias. Sin embargo, la mayoría de los trabajos prefieren aplicar procesos bajo condiciones aerobias para la mayor remoción de contaminantes en menor tiempo.

2.1.2 Compuestos xenobióticos

Un compuesto xenobiótico es aquel que no se encuentra de forma natural en los diferentes ecosistemas; se obtiene por síntesis química y llega a los ecosistemas por la actividad antropogénica urbana o industrial. La contaminación con xenobióticos rompe el equilibrio normal entre el medio físico, químico y biológico,

compatible con la vida. Su toxicidad radica en su persistencia en el medio donde impactan. Ejemplos de xenobióticos son los plásticos (cloruro de polivinilo); explosivos (TNT); detergentes (dodecilsulfonato de sodio); plaguicidas (ácido 2,3,6 - triclorofenolacético; hexaclorociclohexano; ciclodienos (aldrin); 2,1,1 – tricloro -2,2 – bis (p-clorofenil) etano (DDT); colorantes (azocompuestos) y pinturas (metilisobutilcetona), hidrocarburos poliaromáticos (naftaleno, fenantreno y benzopirenos) (Alexander, 1999; Abalos et al., 2004; Orozco et al., 2004; Nápoles, 2005).

Entre los contaminantes orgánicos se encuentran principalmente compuestos del grupo BTEX, fenoles, policlorobifenilos (PCB), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) y plaguicidas. En la Tabla 2.1 se presentan algunos compuestos xenobióticos.

Tabla 2.1 Compuestos xenobióticos

Etilen glicol	Hidrocarburos
Acrilamida	Organoclorados
Metil-etil-cetona	Nitroaromáticos
Fenoles	Surfactantes
Acrilonitrilo	Colorantes

Fuente: (Gil, 1998)

Las aguas residuales industriales suelen contener compuestos químicos que eran ajenos a la biósfera hasta el advenimiento de la química industrial. Estos compuestos llamados xenobióticos, alteran las rutas metabólicas de los microorganismos degradadores de las materias orgánicas transportadas por las aguas residuales.

Un gran número de bacterias son capaces de metabolizar compuestos xenobióticos como fuente de carbono en cultivos puros (Abalos et al., 2004). Sin embargo, no siempre una simple bacteria posee toda la capacidad enzimática para degradar uno o varios compuestos orgánicos contaminantes del ecosistema.

Las poblaciones mixtas o consorcios microbianos tienen mayor poder biodegradativo porque la información genética que codifica al sistema enzimático del consorcio o la población mixta es más completa (Nápoles, 2005).

Los géneros bacterianos degradadores de xenobióticos más comunes tanto en suelos como en aguas son: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia* y *Pseudomonas spp.* (Leahy et al., 1990).

2.2 GENERALIDADES DE SITIOS CONTAMINADOS

Para garantizar una adecuada calidad del aire, agua y suelo, el Programa Sectorial de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2007 - 2012, dentro de su Agenda Gris, en la sección "prevención y control de la contaminación" señala como una meta a alcanzar que en las 32 entidades federativas entre en operación el Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados, señalando también, en la estrategia 3, el "contar con una gestión integral y transversal que sea eficiente y eficaz para la remediación de sitios contaminados".

Este programa se enmarca dentro del Eje 4. "Sustentabilidad Ambiental" del Plan Nacional de Desarrollo PND 2007 – 2012, dentro del sector Gestión para la Protección Ambiental, objetivo 3. "Consolidar el marco regulatorio y aplicar políticas para prevenir, reducir y controlar la contaminación, hacer una gestión integral de los residuos y promover la remediación de sitios contaminados".

La NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 define como derrame de sustancias peligrosas a cualquier descarga, liberación, rebose, achique o vaciamiento de hidrocarburos u otras sustancias peligrosas en estado líquido, que se presenten en tierra y/o en cuerpos de agua.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) define como emergencia ambiental a cualquier amenaza súbita a la salud pública o al bienestar del medio ambiente, debido a la liberación (actual o potencial) del aceite, los materiales radioactivos, o químicos peligrosos en el aire, tierra, o agua.

En el periodo 2003 – 2006 ocurrieron en el país 755 emergencias ambientales en las cuales se derramaron materiales o residuos peligrosos que condujeron a la elaboración de una propuesta de remediación. El análisis de 4 años muestra que los contaminantes más involucrados son en su orden de magnitud: gasolina magna, diesel, hidrocarburos, petróleo crudo, combustóleo, gasolina premium, aceites y turbosina. Los residuos peligrosos sólo tienen una participación marginal en las emergencias ambientales. Los responsables de dichas emergencias principalmente son: PEMEX (394), los transportistas de productos derivados del petróleo y residuos peligrosos (241), otras industrias (90), ferrocarriles (17).

Las principales causas de las emergencias son en su orden de magnitud: fugas de ductos, derrames de carros tanque, robo de hidrocarburos en ductos, derrames de materiales peligrosos de tanques de almacenamiento. Los principales contaminantes involucrados en la contaminación de sitios son:

- ✦ Sitios donde se realizaron o realizan actividades vinculadas a la producción petrolera en los que se encuentran hidrocarburos en general y sustancias orgánicas asociadas a ellos.
- ✦ Sitios donde se realizaron actividades mineras: Elementos potencialmente tóxicos como son Plomo, Cadmio, Mercurio.
- ✦ Sitios en los que se encuentran contaminantes orgánicos halogenados por ejemplo tricloroetano (TCE), dicloroetano (DCE), pentaclorobenceno (PCB), compuestos orgánicos persistentes, plaguicidas, compuestos orgánicos clorados y bifenilos policlorados (BPC).

La contaminación y abandono de sitios antes de 2004 se debió principalmente a la carencia de un marco regulatorio en las siguientes materias:

- ✦ Remediación de sitios contaminados.
- ✦ Responsabilidad por la reparación de daños y la remediación.
- ✦ Avisos y responsabilidades antes y durante el cierre de operaciones.
- ✦ Control sobre las transferencias (compra – venta) de sitios contaminados.
- ✦ La generación y disposición de residuos peligrosos sin control ni vigilancia.
- ✦ La intrincada situación jurídica en lo referente a la posesión o propiedad de muchos de estos sitios.
- ✦ El cierre de operaciones y actividades.
- ✦ El crecimiento desordenado de las áreas urbanas.

2.3 DISPERSIÓN DE LOS CONTAMINANTES

Entre los combustibles destilados del petróleo más comunes se encuentran la gasolina, kerosina o queroseno, turbosina, diesel, gasóleo y combustóleo. Aunque los derivados del petróleo han sido investigados durante mucho tiempo y su química es bien conocida, el estudio como contaminantes de suelo, e incluso de acuíferos y aire se ha desarrollado en las últimas décadas (Flores et al., 2004).

Generalmente, la distribución de algunos de estos productos se realiza por una enorme red de ductos (70 %) que recorre gran parte del territorio nacional, conectando las diferentes estaciones y subestaciones de distribución y venta con las refinerías y plantas petroquímicas del país, que son las encargadas del procesamiento de dichos productos. Adicionalmente se utiliza la red de carreteras nacionales (30 %) para el transporte de gasolina, diesel y algunos otros derivados del petróleo. Lo cual implica un riesgo latente durante el traslado de estas sustancias (Flores et al., 2004).

Una vez que penetran los combustibles en el suelo, pueden amenazar la salud pública, como una consecuencia de su migración y contacto con los mantos freáticos, que en su gran mayoría son la fuente de abastecimiento de agua para las poblaciones aledañas. Resultando indispensable tener en cuenta la dispersión de contaminantes en suelos y acuíferos, ya que una vez que ha ocurrido un derrame en el primer caso se presentan diversos fenómenos naturales que tienden a dirigirlo hacia las aguas subterráneas (Flores et al., 2004).

La combinación de las características del subsuelo, de los contaminantes, la profundidad del manto freático y las condiciones climatológicas del sitio (temperatura y precipitación pluvial) puede dar lugar a los diferentes procesos de transporte y distribución de contaminantes (Flores et al., 2004).

Cuando ocurre un derrame en suelos o en cuerpos de agua, los contaminantes inmediatamente tienden a dispersarse hacia donde el medio físico lo permite. Las características fisicoquímicas del contaminante, como son la densidad, solubilidad (Tabla 2.3) y viscosidad, así como las propias del sitio, como son la unidad del suelo, permeabilidad, estructura, tamaño de las partículas, contenido de humedad y de materia orgánica, determinan su permanencia o migración. Esta es la razón por la que derrames subterráneos que ocurrieron en el pasado, años después se detectan fuera del predio donde acontecieron, y alejados varios metros e incluso kilómetros en dirección de la corriente de agua subterránea (Fan et al., 1995).

En muchas situaciones la parte superficial de los estratos se encuentra intemperizada/fracturada y afectada por diversos procesos tal como extracción de agua, desecación-infiltración, tráfico vehicular y esfuerzos originados por construcciones en zonas urbanas. Lo anterior implica que en muchas ciudades de la República Mexicana, se tienen arcillas fracturadas e intemperizadas en donde a pesar de que constituyen en muchos casos una unidad protectora de los acuíferos que sobreyacen, la presencia de discontinuidades-

heterogeneidades constituyen rutas de migración preferencial por donde pueden migrar hacia los acuíferos subyacentes los contaminantes que son derramados en la superficie del terreno (Aguilar, 2005).

De acuerdo con su densidad, los compuestos orgánicos se clasifican en dos grupos: aquellos cuya densidad es menor a la del agua se denominan ligeros; mientras que los que poseen una densidad mayor a la del agua se les conoce como densos. Esta clasificación determina el comportamiento de los contaminantes en un acuífero. Los ligeros tienden a formar una capa en forma de nata en el nivel freático, y se mueven horizontalmente en dirección al flujo del agua subterránea, como las gasolinas, los aceites y el petróleo crudo. Los densos, por el contrario, migran hacia la base del acuífero creando una columna a partir de la cual pueden ir en dirección al flujo del agua subterránea, contaminando así el acuífero en toda su profundidad; ejemplo de estos, son los bifenilos policlorados (Ortínez et al., 2003).

2.4 SELECCIÓN Y GENERALIDADES DEL SITIO DE ESTUDIO

Para llevar a cabo el presente estudio se seleccionó un sitio de la ex refinería 18 de Marzo en Azcapotzalco, ubicada en la cuenca de México, a 10 km al sur de la sierra de Guadalupe y a 13 km de la sierra de las Cruces. La cuenca de México pertenece a la provincia geológica del Eje Neovolcánico. En la ex refinería 18 de Marzo, se presentan sedimentos aluviales del Pleistoceno y Holoceno y lacustres al norponiente de la ciudad de México (Aguilar, 2005).

El agua subterránea fluye de las zonas de recarga localizadas en las Sierras altas que rodean la cuenca de México, para el caso del norponiente de la ciudad de México son la Sierra de Las Cruces y La Sierra de Guadalupe, en estas zonas de recarga el agua fluye a través de rocas volcánicas fracturadas hacia la zona de descarga en el lago de Texcoco a través de sedimentos continentales. La dirección del flujo del agua subterránea es de poniente a oriente, con rapidez de desplazamiento de 4 m/año con un gradiente hidráulico de 10^{-3} (Vázquez-Sánchez et al., 1989; Edmunds et al., 2002).

La ex refinería 18 de Marzo se fundó en 1933 iniciando con una producción de 7,500 B/d, en el periodo de 1936 a 1946 la producción se amplió a 50,000 B/d, mientras que para 1955 el predio de la ex refinería se amplió a 174 ha y la producción a 100,000 B/d. La ex refinería concluyó sus operaciones el 18 de marzo de 1991 (Aguilar, 2005).

Con el objetivo de iniciar los trabajos de evaluación de la contaminación al subsuelo, entre los años de 1991 a 1992, las autoridades de PEMEX decidieron solicitar propuestas para determinar el impacto al subsuelo por las fugas y derrames ocurridos en la ex refinería Azcapotzalco durante su operación.

Durante los 58 años de operación de la ex refinería se derramaron diversos contaminantes en el suelo (diesel, aceite, gasolina, etc). La infiltración hacia el subsuelo provocó la contaminación del manto freático.

En el “Resumen de Conclusiones y Recomendaciones más importantes, de la parte Técnico Científica, emitidas por el Centro de Geociencias de la UNAM, Campus Juriquilla. Anexo B” se concluyó que el “nivel de contaminación de suelo y agua subterránea por hidrocarburos en el interior de la ex Refinería 18 de Marzo, es tal, que en caso de aplicar la tecnología adecuada de limpieza del predio, tardaría del orden de 10 a 20 años”. Por lo que el tratamiento de este tipo de agua subterránea es importante ya que el riesgo de la infiltración de la contaminación hacia el manto freático es latente (Velasco, 2008).

Durante 1991 a 1997 se realizaron una serie de estudios para determinar las características de los residuos producidos en la ex refinería 18 de Marzo, así como el desmantelamiento de las instalaciones, determinar el impacto al suelo por fugas y derrames de hidrocarburos, se han realizado prospecciones de vapores del suelo, excavaciones de trincheras, perforaciones y muestreo de aguas subterráneas.

Debido a la importancia de determinar el posible riesgo en la zona donde se construiría el Parque Ecológico en la ex refinería, PEMEX Refinación contrató al Instituto de Ingeniería para realizar un análisis de riesgo a la salud en el año 1996.

Para 1997, tomando en cuenta todos los elementos se sabía que el acuífero delgado localizado a profundidades entre 2 y 5 m, estaba contaminado en diferentes áreas y que incluso se tenía la presencia de hidrocarburos en fase libre flotando sobre el nivel somero de agua subterránea. Adicionalmente se sabía que el acuífero en explotación localizado a profundidades del orden de 60 a 70 m no estaba contaminado, pero no se había determinado la extensión de la contaminación en dirección vertical por debajo de los 5 m.

Aguilar, 2005 presenta las concentraciones de hidrocarburos monoaromáticos (BTEX) en ocho muestras de aguas subterráneas. Para el benceno se tuvo una concentración de 890 µg/L en uno de los 8 piezómetros, el cual se encontraba instalado a una profundidad de 10.9 m por debajo del nivel del piso en

la parte inferior del acuífero delgado. El etilbenceno se encontró con una concentración de 14.6 µg/L, mientras que el tolueno se encontró con una concentración de 13.7 µg/L.

También Aguilar, 2005 demostró que los hidrocarburos monoaromáticos tienen concentraciones importantes en el subsuelo de la ex refinería y por lo tanto, presentan peligro de contaminación de los acuíferos subyacentes. Las concentraciones de BTEX son superiores a 0.15 mg/kg en el suelo. La zona contaminada se encuentra inmediatamente al surponiente de la denominada "Aula Magna".

2.5 BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación se considera actualmente como una alternativa tecnológica apta para la limpieza de suelos y de acuíferos contaminados, donde se aprovecha el potencial de los microorganismos para mineralizar o transformar residuos orgánicos en compuestos químicamente más sencillos. El proceso obedece a la capacidad metabólica de los microorganismos; y la actividad biodegradadora puede ser estimulada por la adición de nutrientes básicos (Flores et al., 2004).

La característica más importante de la biorremediación es que los contaminantes no se destruyen, sino que a través de la actividad microbiana se transforman en compuestos químicamente diferentes. Algunos pueden ser completamente degradados, en forma tal que se cumple con la primera ley de la termodinámica. Cuando la transformación llega hasta la generación de dióxido de carbono y agua, entonces se habla de una completa mineralización (Flores et al., 2004).

Una ventaja importante de la biorremediación es su bajo costo en relación con otros tratamientos. Es difícil hacer una comparación de costos, de ahí que conviene conocer las características de cada sitio en particular; pero en términos generales, se puede decir que es por lo menos diez veces más económica que la incineración y tres veces más económica que algunas tecnologías fisicoquímicas de inmovilización. Este bajo costo se debe a varios factores, como son un menor gasto de energía; bajo costo de los nutrientes; y la operación en condiciones ambientales. Eso hace que su uso sea muy atractivo para los países en vías de desarrollo, como México (Flores et al., 2004).

La versatilidad de esta alternativa tecnológica se basa en que puede adaptarse a las necesidades de cada sitio. Así, puede aplicarse **bioestimulación** si únicamente se requiere la adición de nutrientes para la

actividad metabólica degradadora de la flora bacteriana autóctona; **bioincremento**, cuando la proporción de la flora degradadora autóctona es muy reducida y se hace necesario añadir microorganismos degradadores exógenos; o bien **bioventeo**, cuando es imprescindible el suministro de oxígeno para estimular la actividad microbiana degradadora presente en el lugar. En cualquiera de las opciones anteriores puede realizarse fuera del sitio (*ex situ*) si la contaminación está en el suelo superficial, pero necesariamente *in situ* cuando los contaminantes han alcanzado grandes profundidades, e inclusive el manto freático (Flores et al., 2004).

En sitios donde ocurren derrames de hidrocarburos no atendidos inmediatamente, la flora microbiana presente en el suelo se somete a un proceso de selección natural, en el que los microorganismos sobrevivientes son aquellos que desarrollan capacidad degradadora. En estos casos la mejor opción es utilizar la flora autóctona del sitio, en lugar de agregar microorganismos exógenos. Para tratar derrames recientes, se considera conveniente recurrir a preparados microbianos frescos (Flores et al., 2004).

En el caso de aguas subterráneas, la biorremediación se aplica a través del bombeo-tratamiento-recarga, que consiste en extraer el agua subterránea, promover la biodegradación de los contaminantes en biorreactores instalados en la superficie y posteriormente devolverla al acuífero, o bien inyectar nutrientes y bacterias, de tal forma que se establezca una recirculación y el sitio mismo se convierta en un biorreactor (Flores et al., 2004).

2.6 PROCESOS BIOLÓGICOS

Los procesos biológicos utilizan microorganismos, entre los que destacan las bacterias, para llevar a cabo la eliminación de componentes indeseables del agua, aprovechando la actividad metabólica de los mismos sobre esos componentes proteínicos denominados enzimas. También se llevan a cabo una serie de reacciones bioquímicas mediante las cuales los microorganismos utilizan la materia orgánica presente en el agua, la sintetizan y la aprovechan para proveerse de energía mediante su síntesis (Rodríguez et al., 2006).

El tratamiento biológico resulta ser un proceso eficiente en la depuración de aguas residuales que contienen compuestos orgánicos peligrosos (Brenner et al., 1992; Yoong et al., 2001). Si bien los compuestos tóxicos como el fenol, hidrocarburos aromáticos o determinados compuestos xenobióticos

contribuyen con la inestabilidad de los sistemas de tratamientos biológicos de aguas residuales, estos compuestos también son usados como fuentes de carbono y energía por ciertos grupos de microorganismos (Rozich et al., 1983; Yoong et al., 2001).

Los sistemas biológicos no sólo son capaces de destoxificar estos residuos, sino también de completar la oxidación de la materia orgánica tóxica a productos finales simples como CO₂, H₂O, NH₃, y biomasa; lo anterior mediante el uso de microorganismos aerobios. Algunas de sus limitaciones de la utilización de los sistemas aerobios es que son sensibles a la baja disponibilidad en nutrientes, a bajas concentraciones de oxígeno disuelto, y a la relación carbono: nitrógeno: fósforo (C:N:P).

Se debe tomar en cuenta el porcentaje de mortandad en relación a la concentración y grado de toxicidad de ciertas sustancias; además de considerar ciertos parámetros de diseño del sistema de tratamiento como por ejemplo el tiempo de retención hidráulico y el tiempo de retención celular.

2.7 GENERALIDADES DE MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN BIODEGRADACIÓN

La población microbiana es el factor determinante para que ocurra el proceso de biodegradación. Se necesita una población microbiana adaptada, que posea las enzimas necesarias que catalicen las reacciones de degradación. Los microorganismos pueden degradar los contaminantes en forma de cultivos puros, mixtos o consorcios que siempre es más eficiente que el cultivo puro. En los consorcios se establece una completa interacción de las especies microbianas (Fonseca, 1998; Viñas, 1999).

Los microorganismos se caracterizan por su increíble versatilidad metabólica y fisiológica que les permite habitar en nichos ecológicos. Las especies como *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y muchos otros ampliamente distribuidos en suelos, lodos, alcantarillados y agua, han sido reportados como degradadores de compuestos orgánicos por una serie de pasos incluyendo transferencia de masas, adsorción y reacciones bioquímicas enzimáticas permitiendo su crecimiento (Pandya, 2007).

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares. Su modo habitual de reproducción es por escisión binaria, aunque algunas especies se reproducen sexualmente o por germinación. Si bien existen miles de especies diferentes de bacterias, su forma general encaja dentro de alguna de las tres siguientes categorías: esféricas, cilíndricas y helicoidales. Los tamaños representativos son de 0.5 y 1 micra de anchura por 6 a 15 micras de longitud en el caso de bacterias helicoidales (Rodríguez, 2006).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son gram-negativas, pertenecen a la subclase gamma de las Proteobacterias, son ubicuas, de gran importancia ambiental, usando técnicas de cultivo tradicionales se han realizado estudios sobre esta especie (Amann et al., 1995; Moore et al., 2006). Otros estudios muestran que las *Pseudomonas* pueden ser definidas como un miembro predominante en comunidades de ecosistemas aerobios donde están presentes altas concentraciones de petróleo, utilizándolo como fuente de carbón y energía, por otro lado, estas bacterias producen biosurfactantes que mejoran el consumo de tales compuestos hidrofóbicos inmiscibles (Noordman et al., 2002; Kaplan et al., 2004; Popp et al., 2006; Ferguson, 2007).

La separación e identificación de microorganismos responsables de las transformaciones de los hidrocarburos han sido ampliamente estudiadas. La lista de degradación de hidrocarburos por organismos (bacterias, levaduras, hongos y algas) está disponibles bibliográficamente. Recientemente analizaron el estado actual del conocimiento de los microorganismos de los depósitos de petróleo, incluyendo bacterias mesofílicas y bacterias sulfatoreductoras, metanogénicas, bacterias termofílicas fermentativas, y bacterias reductoras del hierro (Atlas et al., 1981; Leahy et al., 1990; Rosenberg, 1992; Atlas et al., 1995; Magot et al., 2000; Vieira et al., 2008).

A continuación se mencionan las características más relevantes de las bacterias empleadas en el presente trabajo:

✦ *Pseudomonas putida*

La *Pseudomonas putida* es saprófito del suelo, unicelular, cosmopolita, metabólicamente versátil, por poseer una dioxigenasa inicial, aunque no presenta la dioxigenasa específica para los PAH por lo cual es una buena candidata para las aplicaciones biotecnológicas, tales como agricultura, biocatálisis, biorremediación, biocontrol en protección de las plantas y producción de bioplásticos. La *Pseudomonas putida* es conocida por su capacidad de usar compuestos aromáticos como el fenol como única fuente de carbón y energía.

Boeris et al. 2007; Coronado et al. 2008; Srivastava et al. 2008 han trabajado con este tipo de bacterias empleando temperatura de 30 °C. Movahedyan et al. 2009 aplicaron 30 °C y pH de 6.8.

✦ *Acinetobacter calcoaceticus*

La *Acinetobacter spp.* es un género de bacterias, oxidasa negativo, no móviles, estrictamente aerobia, gram-negativas, presentan morfología de tipo cocobacilo, se presentan en pares al microscopio. Pueden usar varias fuentes de carbón para crecer, y pueden ser cultivados en medios relativamente simples, incluyendo el Agar Soya Tripticaseina. Algunas cepas de este género son conocidas por biodegradar diferentes contaminantes tal como el bifenilo, bifenilo clorado, aminoácidos, benzoato, acetonitrilo, y en la remoción de fosfato y metales pesados (ABD-EI-Haleem, 2003). También es conocida por su capacidad de metabolizar una gran variedad de fuentes de carbono incluyendo petróleo crudo, hidrocarburos de cadena larga, alcoholes, ácidos grasos y triglicéridos (Johri et al., 2002). La *Acinetobacter calcoaceticus* mejora la remoción de tolueno (Ishii et al., 2004), fenol (Adav et al., 2007a), fenantreno y pireno (Gaoa et al., 2006).

Adav et al. 2008 estudiaron gránulos de *Acinetobacter calcoaceticus* a una temperatura de 37 ° y pH de 7.0.

✦ *Pseudomonas alcaligenes*

Es una bacteria aerobia usualmente empleada para propósitos de biorremediación. La cepa *P. alcaligenes* PA-10 ha sido reportada como degradadora de hidrocarburos aromáticos policíclicos. La misma cepa ha sido utilizada en la degradación de naftaleno y fenantreno (Gordon et al., 2001).

Diferentes tipos de cepas de la misma especie *Pseudomonas alcaligenes* han sido estudiadas a temperatura de 30 °C y pH de 7.2 (Denger et al., 2008).

✦ *Pseudomonas aeruginosa*

La *Pseudomonas aeruginosa* presenta una serie de actividades naturales sobre xenobióticos (Rajani et al., 2009). Tiene la capacidad de sintetizar ramnolípidos cuando se encuentra en la fase estacionaria de su crecimiento, por tal razón esto sólo se puede realizar en la primera fase del proceso de biorremediación, contribuyendo así con la movilización y solubilización de los contaminantes durante la fase siguiente de mineralización. Piróllo et al. 2008 investigaron y concluyeron que la biodegradación de hidrocarburos:

benceno, tolueno, keroseno, diesel y petróleo crudo es causado por el biosurfactante generado por *P. aeruginosa* LBI.

La temperatura empleada en los estudios de esta especie fue realizada a 30 °C (Bressler et al., 2009).

✦ *Arthrobacter crystallopoites*

Los organismos del género *Arthrobacter* representan una amplia fracción de la población bacteriana de quimioheterótrofos aerobios presentes en el suelo, y son agentes importantes en la mineralización de la materia orgánica. Las células son esféricas y de tamaño uniforme, semejante a los micrococcos. Cuando el crecimiento se reinicia, estas células se alargan hasta formar bacilos, que experimentan división binaria (Stanier et al., 1992).

En sus propiedades nutricionales el género *Arthrobacter* muestra interesantes analogías con las *Pseudomonas* aerobias; la mayoría de las especies pueden utilizar una amplia y variada gama de compuestos orgánicos sencillos como fuente principal de carbono y energía (Stanier et al., 1992).

✦ *Bacillus licheniformis*

Es una bacteria Gram-positiva, forma endosporas, ha sido aislada de suelos y materia vegetal alrededor del mundo. Las especies han sido usadas por décadas en la producción industrial de exoenzimas (Schallmey et al., 2004).

Bacillus licheniformis ha sido estudiada a temperatura de 28 °C y pH de 7.0 (Tychinskii et al., 2007). Kayalvizhi et al. 2008 estudiaron la cepa MKU3 a una temperatura de 30 °C y pH de 6.0. Drouin et al. 2008 estudiaron la cepa BL ATCC 21424 a una temperatura de 30 °C y pH de 7.5.

2.7.1 Lodos activados

El proceso de lodos activos ha sido utilizado para el tratamiento de las aguas residuales tanto industriales como urbanas desde hace aproximadamente un siglo. El diseño de las plantas de lodos activos se llevó a cabo fundamentalmente de una forma empírica. Sólo al comienzo de los años sesenta se desarrolló una

solución más racional para el diseño del sistema de lodos activos. Este proceso nació de la observación realizada hace mucho tiempo de que si cualquier agua residual, urbana o industrial, se somete a aireación durante un periodo de tiempo se reduce su contenido de materia orgánica, formándose a la vez un lodo floculento (Ramalho, 2003).

El examen microscópico de este lodo revela que está formado por una población heterogénea de microorganismos, que cambian continuamente en función de las variaciones de la composición de las aguas residuales y de las condiciones ambientales. Los microorganismos presentes son bacterias unicelulares, hongos, algas, protozoos y rotíferos. De éstos, las bacterias son probablemente las más importantes, encontrándose en todos los tipos de procesos de tratamiento biológico (Ramalho, 2003).

En los lodos activados se encuentran diversos organismos vivos. Dentro de los géneros bacterianos destacan: *Spirillum* (bacterias móviles helicoidales con forma de bacilos largos), *Vitreoscilla* (bacterias gram-negativas, aeróbicas o microaerofilicas, que no tienen color y son filamentosas; producen hemoglobina bacteriana homodimerica, especialmente bajo condiciones de crecimiento con limitación de oxígeno), *Sphaerotilus* (bacteria filamentososa forrada que exhibe una "falsa" ramificación), *Beggiatoa* (bacteria filamentososa del sulfuro constituida por filamentos rectos) (Eikelboom, 1975, 1977).

Además de bacterias, existen en los lodos activados, un gran número de especies de protozoos como flagelados, ciliados y amibas. Los protozoos son organismos de una célula que puede nutrirse de materia orgánica y bacterias. Nematodos o rotíferos se clasifican entre los organismos multicelulares.

Los protozoos son protistas móviles microscópicos y, por lo general, unicelulares. La mayoría de los protozoos son heterótrofos aerobios, aunque algunos son anaerobios. Los protozoos suelen ser mayores que las bacterias, y se suelen alimentar de ellas para la obtención de energía. De hecho, al consumir bacterias y materia orgánica, los protozoos actúan como purificadores de los efluentes de procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales (Metcalf, 2004).

Los protozoos secretan una capa protectora gruesa que rodea su cuerpo y cesan toda actividad. Es decir, quedan en estado latente a la espera de la llegada de condiciones ambientales favorables que les permitan reanudar su actividad. Hay variabilidad interespecífica (entre especies) en la resistencia de los quistes: resistencia a la desecación y/o resistencia a las bajas temperaturas.

El rotífero es un animal aerobio, heterótrofo y multicelular. Su nombre procede del hecho de que disponen de dos juegos de pestañas giratorias sobre la cabeza, que emplean para la captura de alimentos y para moverse. Los rotíferos son muy eficaces en la eliminación de bacterias dispersas y floculadas, así como de pequeñas partículas de materia orgánica. Su presencia en un efluente indica un proceso aerobio de purificación biológica muy eficiente (Metcalf, 2004).

En la Tabla 2.2 se muestran los coeficientes cinéticos de lodos activados de bacterias heterotróficas a 20 °C, estos datos son necesarios cuando se desean realizar cálculos relacionados con el diseño de tratamiento biológico (Metcalf, 2004).

Tabla 2.2 Coeficientes cinéticos de lodos activados de bacterias heterotróficas a 20 °C

Coeficiente	Unidad	Rango	Valor típico
μ_m	gSSV/gSSV d	3 - 13.2	6
K_s	gDQOb /m ³	5 - 40	20
Y	gSSV/gDQOb	0.30 - 0.5	0.4
k_d	gSSV/gSSV d	0.06 - 0.20	0.12
f_d	sin unidad	0.08 - 0.20	0.15
Valores de θ			
μ_m	sin unidad	1.03 - 1.08	1.07
k_d	sin unidad	1.03 - 1.08	1.04
K_s	sin unidad	1	1

2.7.2 Consorcios bacterianos especializados

Los microorganismos que se utilizan en un proceso, pueden ser obtenidos por aislamiento a partir de fuentes naturales o de una colección de cultivos. A nivel industrial, en general, cada firma posee su propia colección de organismos, muchos de los cuales han sido mejorados a través de técnicas clásicas de mutación o de ingeniería genética. Sin embargo, estas cepas sólo son empleadas por la industria que las posee, debido al gran valor comercial de las mismas. En algunos casos se dispone de organismos genéticamente modificados (OGM) para llevar a cabo reacciones específicas de biosíntesis, degradación o

biocatálisis, los cuales están protegidos por patentes. Esto significa que un gran porcentaje de organismos aislados o modificados no son disponibles para uso general en laboratorios (Merchuk, 1994).

Es posible incrementar el potencial de biorremediación a través de la ingeniería genética previo a su uso por bioaumentación. Los OGM poseen capacidades importantes en cuanto a la mejora en los procesos de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, la falta de investigaciones prácticas relacionadas a la reproducción, caracterización y genética de los OGM trae como consecuencia la incapacidad de predecir lo que puede ocurrir al liberar estos organismos al medio ambiente, así como en la posibilidad de que los nuevos genes que estos organismos transportan puedan causar daños si llegan o se trasladan a otros organismos nativos, es decir, la post-biorremediación referente a estos temas es aún incierta e impredecible (Atlas, 1992; Molin, 1993).

Por otro lado, para mejorar la operación del tratamiento biológico de efluentes industriales a veces se recomiendan algunos aditivos-biocatalizadores comercialmente disponibles. Estos aditivos generalmente contienen una mezcla de enzimas grado técnico, masa bacteriana seca y productos intermedios de fermentación bacteriana. La aplicación de estos aditivos sin previo estudio de la dinámica de la población y del metabolismo microbiano y sin el control preciso de los sistemas, puede incurrir en aumentos sustanciales de los costos sin una aportación de gran valor.

No obstante, los defensores de estas técnicas argumentan que la precisión de la ingeniería genética, comparada con las transferencias de genes que se producen habitualmente en la naturaleza, reduce más que incrementa dicho peligro.

En este sentido, el Diario Oficial de la Federación decretó el 18 de marzo de 2005 la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Dicha ley tiene por objeto regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de organismos genéticamente modificados, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola.

A pesar de que los OGM con capacidades significantes de remediación pueden ser aplicados, es difícil obtener un reglamento aprobatorio para su liberación al medio ambiente. En los Estados Unidos sólo han habido once leyes de control de sustancias tóxicas (TSCA por sus siglas en inglés) relacionadas a las

aplicaciones en cuanto a microbiología ambiental de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S. EPA por sus siglas en inglés) desde 1998.

Algunas de las empresas que comercializan productos biotecnológicos se mencionan a continuación: Agrimond L.L.C; AliBio; American Biosystems, Inc; Aquafix, Inc; Aster Bio; Bass Perú; Bio Chem Internacional S.A. de C.V; Bioclean S.A; BioConversion Technology, L.L.C; Biodyne, Inc; Bioevolution S.A.S; BioExport Ltd; BioFuture Ltd; Biomex Solutions S. de R.L de C.V; Bionetix International Inc; BioStim L.L.C; Bio-Systems Corporation; Blackwater Holdings Systems; Comercializadora Planeta Verde, S de R.L de C; Corp Bioscience, Inc; CPB, Comercializadora de Productos Biogénicos; Custom Biologicals, Inc; EnviroBact Technologies L.L.C; EnviroProcess, S.A. de C.V; Enviro-Zyme International, Inc; Helix Laboratories, Inc; IPOS, International Products and Organic Solutions; Microgenics, L.L.C; Natural Environmental Systems, L.L.C; Novozymes, Biologicals Inc; Organica Biotech Pvt. Ltd; Sannitree International; Specialty Enzymes and Biochemicals Company; United-Tech, Inc.

Una alternativa a la utilización de cepas individuales es la obtención y utilización de cultivos mixtos, los cuales pueden ser consorcios definidos y consorcios no definidos.

✦ **Conorcios definidos**

Los consorcios definidos se caracterizan por ser una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí, sin embargo, tienen ciertas desventajas. En primer lugar, se necesitaría un gran número de cepas distintas para conseguir una degradación extensa del crudo de petróleo, debido a la gran cantidad de componentes presentes y al espectro metabólico limitado de una cepa bacteriana (Leahy et al., 1990).

Otra desventaja es la posible formación de metabolitos intermediarios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo (Casellas et al., 1998; Kazunga et al., 2000; Kazunga et al., 2001). Durante la degradación de mezclas de hidrocarburos se pueden formar intermediarios de persistencia y toxicidad desconocidas, por fenómenos de cometabolismo (Grifoll *et al.*, 1995).

✦ Consorcios no definidos

Los consorcios no definidos se caracterizan por ser el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminación. Son especializados en la degradación de hidrocarburos, se obtienen a partir de enriquecimientos de muestras ambientales donde hayan existido episodios previos y recurrentes de contaminación por hidrocarburos. El resultado es una población microbiana seleccionada de forma natural por su cooperación metabólica en la degradación de la mezcla en cuestión, la cual potencialmente dispone de una mayor eficiencia en la degradación de compuestos conocidos y desconocidos que un consorcio definido. Por lo tanto, es más probable que en un consorcio no definido se hayan seleccionado degradadores de productos finales que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos.

2.8 CRECIMIENTO MICROBIANO

En un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se diferencian cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano como se muestra en la Figura 2.1 (Madigan et al., 2004):

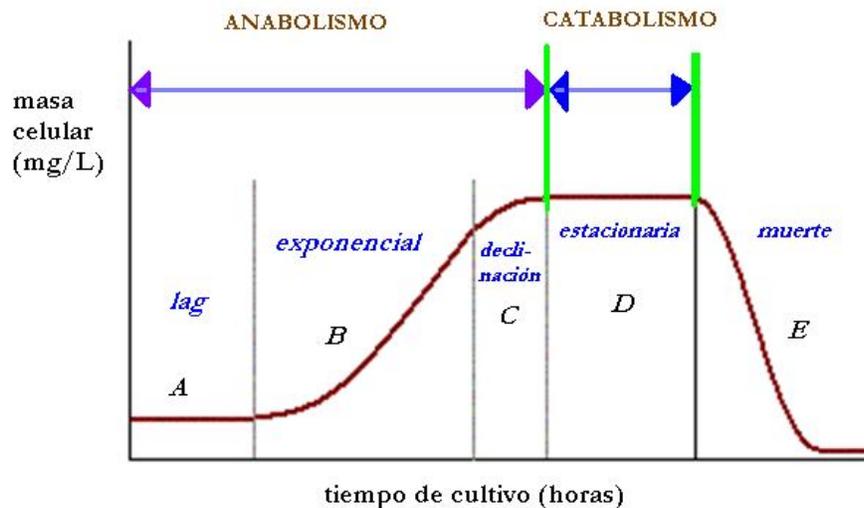


Figura 2.1 Curva típica de crecimiento para un sistema cerrado

El crecimiento microbiano es el aumento del número de células microbianas de una población; también puede medirse como un incremento de la masa celular. La **velocidad de crecimiento** es el cambio en el

número de células o en la masa celular experimentado *por unidad de tiempo*. Durante el ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican (Madigan et al., 2004).

Puesto que el efecto de los microorganismos en la mayoría de los casos depende de su número, entender cómo se produce el crecimiento microbiano es importante para poder reducir sus efectos nocivos y en este caso potenciar los beneficios o aplicaciones. Se requiere conocer el comportamiento en el crecimiento de bacterias incubadas en el biorreactor. Se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano (Madigan et al., 2004):

1.- *Fase lag, de adaptación o de latencia (A)*. Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, por lo general el crecimiento no comienza inmediatamente sino tras un periodo de tiempo que constituye la *fase de latencia*, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento.

Si un cultivo exponencial se inocula en el mismo medio y en las mismas condiciones de cultivo, no se observa un retraso y el crecimiento exponencial se inicia inmediatamente. Sin embargo, si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, se observa normalmente un retraso aunque todas las células del inóculo sean *viabiles*, es decir, sean capaces de reproducirse. Esto se debe con frecuencia a que las células carecen de varios componentes esenciales para dividirse y se requiere tiempo para su síntesis.

La fase de latencia también ocurre cuando se transfiere una población de un medio rico a otro medio más pobre. Para que ocurra crecimiento en un medio de cultivo particular, las células deben tener un sistema enzimático completo que permita la síntesis de los metabolitos esenciales ausentes en el medio. Al pasar a otro medio, se necesita tiempo para la síntesis de las nuevas enzimas.

2.- *Fase exponencial o logarítmica (B)*. Esta fase es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide para formar dos, y así sucesivamente. En general, las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico más sano y, por ello, las células tomadas en el punto medio del crecimiento exponencial son a menudo las más adecuadas para estudios enzimáticos y estructurales.

La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente pero las velocidades del crecimiento están influenciadas por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.), así como por las características genéticas del organismo.

3.- *Fase estacionaria (D)*. En un sistema de cultivo cerrado, en un medio renovado o monofásico el crecimiento exponencial no se puede prolongar de modo indefinido.

Se puede calcular que una sola bacteria con un tiempo de generación de 20 minutos producirá en tan sólo 48 horas de crecimiento exponencial continuo una población que pesaría unas 4,000 veces el peso de la Tierra. Esto resulta impresionante porque una sola célula bacteriana pesa alrededor de 10^{-12} gramos. Es obvio que algo debe pasar mucho antes de ese tiempo que limite el crecimiento de la población. Lo que generalmente sucede es que (1) un nutriente esencial del medio de cultivo se usa y llega a ser un factor limitante del crecimiento; o bien (2) se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen que cese el crecimiento exponencial. Frecuentemente ocurren ambas cosas.

Al producirse esto, la población alcanza la fase estacionaria. En esta fase, no hay aumento ni descenso neto en el número de células. Aunque no suele haber crecimiento en la fase estacionaria muchas funciones celulares continúan, como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. En algunos casos puede ocurrir un lento crecimiento durante esta fase; algunas células de la población crecen, pero otras mueren y los dos procesos se equilibran de modo que no hay aumento ni disminución en el número de células.

4.- *Fase de muerte (E)*. Si la incubación continúa después de que la población haya alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero también pueden morir. Si ocurre esto último, se dice que la población está en fase de muerte. En algunos casos la muerte se acompaña de una lisis celular real. La Figura 2.1 indica que la fase de muerte de la curva de crecimiento también es exponencial; no obstante, en la mayoría de los casos la tasa de muerte celular es mucho más lenta que la de crecimiento exponencial.

2.8.1 Factores que afectan el crecimiento microbiano

Los requerimientos para el crecimiento microbiano pueden dividirse en dos categorías principales: físicos y químicos. Los aspectos físicos comprenden la temperatura, el pH y la presión osmótica. Los requerimientos químicos incluyen las fuentes de carbono, nitrógeno azufre, fósforo, oligoelementos, oxígeno y factores de crecimiento orgánicos (Tortora et al., 2007).

La importancia de establecer valores de cada uno de los factores físicos se mencionan a continuación:

✦ Temperatura

Cada especie microbiana crece en un rango de temperatura, desde la temperatura mínima de crecimiento, o temperatura más baja que permite el crecimiento, hasta la temperatura máxima de crecimiento, o temperatura más elevada que permite el crecimiento. La temperatura óptima de una especie es aquella a la cual crece el microorganismo más rápidamente.

La tasa de crecimiento aumenta desde la temperatura mínima a la temperatura óptima, ya que las reacciones químicas, incluidas las reacciones catalizadas por las enzimas, se realizan más rápidamente cuando aumenta la temperatura. Sin embargo, por encima de la temperatura óptima, la tasa de crecimiento disminuye rápidamente, porque algunos componentes celulares, especialmente las proteínas, se inactivan más rápidamente de lo que pueden ser reemplazados (Ingraham et al., 1997).

Se pueden distinguir *cuatro grupos* de microorganismos con relación a su temperatura óptima: psicrófilos, con temperatura óptimas bajas; mesófilos, con temperaturas óptimas moderadas; termófilos, con altas temperaturas óptimas; e hipertermófilos, con temperaturas óptimas muy elevadas.

✦ pH

En general, las bacterias crecen mejor a un pH ligeramente alcalino. Sin embargo, existen excepciones, especialmente entre las bacterias. Los acidófilos viven en ambientes con un pH extremadamente bajo. Los alcalófilos viven en ambientes con un pH extremadamente alto (Ingraham et al., 1997). La mayoría de las bacterias sobreviven en ambientes con un intervalo de pH relativamente amplio, ajustando su pH intracelular. Mediante diferentes mecanismos, bombean iones de hidrógeno fuera o dentro de la célula (Madigan et al., 2004).

✦ Oxígeno disuelto

Las bacterias crecen en presencia o ausencia de oxígeno molecular y son clasificadas en tres grandes grupos de acuerdo a sus necesidades del oxígeno molecular. Estos grupos son las aerobias, las anaerobias y las anaerobias facultativas. Las primeras requieren oxígeno para degradar el sustrato. Las bacterias anaerobias no usan el oxígeno molecular para degradarlo.

Entre las bacterias aerobias y anaerobias están las bacterias facultativas. Este tipo de bacterias tiene la habilidad de usar el oxígeno molecular u otra molécula para degradar el sustrato cuando el oxígeno no se encuentra disponible. Estas bacterias prefieren el oxígeno a otro tipo de moléculas tales como NO_3^- para degradar el sustrato. Las bacterias *desnitrificantes*, *Bacillus*, *Escherichia*, y *Pseudomonas* son ejemplo de bacterias facultativas (Gerardi, 2006).

✦ Nutrientes

La nutrición microbiana consiste en suministrar a las células los ingredientes químicos que necesitan para hacer monómeros. Estos compuestos químicos son los nutrientes. No todos los nutrientes se requieren en las mismas cantidades; algunos, llamados macronutrientes, se precisan en grandes cantidades; mientras que otros, llamados micronutrientes, se requieren en menores cantidades, y a veces sólo en cantidades trazas.

Las bacterias son tal vez los más diversos y versátiles organismos en cuanto a sus requerimientos nutricionales. Existen considerables variaciones en sus requerimientos específicos para su crecimiento. Las bacterias son aproximadamente el 80 % de agua y el 20 % de material seco, de éste, aproximadamente el 90 % es orgánico y el 10 % es inorgánico (Tabla 2.3). Una fórmula orgánica simple que representa una célula bacteriana es $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$.

Tabla 2.3 Composición de una célula bacteriana

Elemento	Composición promedio	Intervalo de composición ^a
Carbono	50	45 – 55
Oxígeno	20	16 – 22
Nitrógeno	14	12 – 16
Hidrógeno	8	7 – 10
Fósforo	3	2 – 5
Azufre	1	0.8 – 1.5

Elemento	Composición promedio	Intervalo de composición ^a
Potasio	1	
Sodio	1	
Calcio	0.5	
Cloro	0.5	
Magnesio	0.5	
Hierro	0.2	
Elementos traza	0.1	

^a Los intervalos de composición de los elementos son dados sólo para los macroelementos.
Fuente: (Gerardi, 2006)

La adición de nutrientes a un tratamiento biológico de aguas residuales industriales puede ser requerida para lograr la degradación de la materia orgánica. La relación de C:N:P ha sido discutida en la literatura, asumiendo en cada sistema relaciones óptimas de C:N:P en función del tipo de efluente que se trate, la concentración del carbono y de su disponibilidad y de la habilidad de cada microorganismo para degradar los contaminantes (Strynar et al., 1999; Margesin et al., 2001; Ferguson et al., 2003; Lee et al., 2007; Mariano et al., 2007).

2.9 ACLIMATACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

La adaptación o aclimatación de una comunidad microbiana a un contaminante dado, determina la tasa con la que el compuesto puede ser transformado y/o mineralizado. Esta adaptación puede ocurrir por tres mecanismos: a) inducción o depresión de enzimas específicos, b) cambios genéticos que deriven en nuevas capacidades metabólicas y c) enriquecimiento selectivo de microorganismos capaces de transformar un compuesto de interés.

Este último mecanismo es ampliamente utilizado en la obtención de consorcios microbianos degradadores de xenobióticos complejos (HPA, PCB, pesticidas, etc.). El tipo de contaminación influye notablemente en las características de la comunidad microbiana.

Cuando están implicadas las enzimas inducibles, la inducción ocurre en periodos relativamente cortos (de minutos a días), mientras que los cambios más fundamentales, tales como la modificación de la estructura enzimática o la aparición de mutantes generalmente necesita periodos mucho más largos (semanas o años) (Segura, 2007).

Muchos estudios realizados con compuestos tóxicos muestran que incluso después de una extensa adaptación de la masa microbiana celular ésta exhibe cinéticas de crecimiento inhibitorias (Rozich et al., 1983; Rozich et al., 1985).

2.10 BIOAUMENTACIÓN

El término bioaumentación, o aumento en la biomasa se refiere a la adición de cultivos bacterianos preparados comercialmente a un sistema de tratamiento de agua residual con la finalidad de: (1) incrementar la densidad de las bacterias y sus enzimas adecuadas y (2) llevar a cabo el objetivo específico de degradación, por ejemplo, disminuir la producción de lodos o la generación del mal olor. La adición de cultivos bacterianos incrementa la densidad de las bacterias específicas sin presentar un incremento significativo de sólidos (Gerardi, 2006).

El proceso generalmente referido como bioaumentación o biosuplementación ha sido usado como una herramienta para la biorremediación en aguas residuales, especialmente en relación con los lodos activados (Dionisi et al., 2006). Se dice que es benéfico en la protección del sistema de lodos activados contra las perturbaciones de sobrecarga transitoria o continua, incremento de la degradabilidad en compuestos orgánicos, en la posibilidad de operar a altas tasas durante climas fríos. También se pueden superar las limitaciones de los tratamientos biológicos como son los choques de carga (Gerardi, 2006).

La bioaumentación en el sistema de lodos activados con cepas de bacterias especializadas puede ser un convincente camino para la mejora de muchos aspectos en el tratamiento del agua residual, incluyendo una reducción rápida de los compuestos tóxicos (Wang et al., 2009). A su vez se introducen nuevas capacidades metabólicas dentro de una comunidad microbiana (van Limbergen et al., 1998), como la habilidad de degradar compuestos recalcitrantes e inactivar o inmovilizar metales pesados (Bathe et al., 2005).

Por otro lado, emplear inoculación de microorganismos específicos proporciona un ambiente amigable debido al control de microorganismos patógenos, representando una alternativa prometedora para limitar la extensa aplicación de compuestos químicos sintéticos (Ongena et al., 2007).

Una apropiada bioaumentación puede permitir una disminución en la concentración de los sólidos suspendidos volátiles en el licor mezclado (SSVLM) y en el tiempo de retención celular (TRC) en un sistema de lodos activados. Una disminución en SSVLM y en el TRC ayuda al control del crecimiento indeseable de organismos filamentosos (Gerardi, 2006).

La adición de un consorcio de diferentes microorganismos puede resultar en el establecimiento de nuevas y fructíferas interacciones (en nivel catabólico y genético) entre diferentes microorganismos ocurriendo en los ecosistemas aumentados, esto podría producir un tratamiento mejorado de contaminantes a su vez (Dejonghe et al., 2001). Estas fuentes de microorganismos pueden también transportar una variedad de nutrientes esenciales que pueden influir fuertemente a sostener la supervivencia y colonización de especies inoculadas en el sitio contaminado (Antizar-Ladislao et al., 2004, 2008; Sobiecka et al., 2008).

En resumen, cuando en el proceso de bioaumentación se usan bacterias específicas, se presentan ventajas sobre los tratamientos biológicos convencionales ya que estos microorganismos pueden degradar y oxidar completamente los compuestos orgánicos tóxicos a compuestos inocuos. Estos procesos son caracterizados por bajos costos y ofrecen la posibilidad de tratamientos *in situ*. Los estudios de tratabilidad o viabilidad determinan si la bioaumentación sería efectiva en una situación dada (Pandya, 2007).

Sin embargo, la aplicación de la bioaumentación en algunos casos es limitada. Bendix et al. (2008) reporta desactivación o pérdida de los microorganismos responsables en la degradación de los PAH después de la adición de microorganismos en sistemas abióticos y bióticos. Por consiguiente, el desarrollo de métodos y técnicas de bioaumentación es muy importante.

En el presente trabajo, se utilizaron dos diferentes tipos de cepas bacterianas comerciales de la marca Novozymes, Inc. Las cepas contienen bacterias especializadas en la biodegradación de compuestos característicos de un agua residual generada de las actividades de una refinería. Sobiecka et al. 2008 emplearon ocho diferentes mezclas bacterianas comerciales para la biodegradación de contaminantes orgánicos persistentes. Los resultados de este estudio recomiendan el uso de la mezcla comercial microbiana Bi-Chem ABR, ya que proporciona los mejores resultados en la biodegradación de los contaminantes bajo las condiciones de tratamiento investigadas.

La Tabla 2.4 muestra el resumen y la aportación de algunos estudios relacionados a bioaumentación.

Tabla 2.4 Investigaciones relacionadas a bioaumentación

Resumen	Aportación	Referencia
<p>Determinación de cinéticas de crecimiento en términos de concentración óptima de sustrato y sustrato tóxico para la actividad microbiana usando <i>Pseudomonas</i> ssp. en pruebas por lote para varias concentraciones de benceno.</p>	<p>Selección de microorganismos en ambientes óptimos para técnicas de bioaumentación para ser usadas en sistemas acuáticos contaminados con relativamente alta concentración de hidrocarburos.</p>	<p>Kim et al. (2005)</p>
<p>Estudio de tres diferentes enfoques de bioaumentación: 1) adición de bacterias en el comienzo de la experimentación; 2) adición de bacterias al comienzo y cada segundo día de la experimentación; 3) adición de bacterias encapsuladas al comienzo de la experimentación.</p>	<p>La sola adición de la bacteria (1) y la adición de bacterias encapsuladas (3) no fueron eficientes en la degradación de PAH con alto peso molecular. La bioaumentación con la adición continua de bacteria (2) permitió la más alta biodegradación (arriba del 80 %) en bajo, medio y alto peso molecular de PAH.</p>	<p>Bendix et al. (2008)</p>
<p>Aplicación de ocho diferentes mezclas comerciales de microorganismos (cepas bacterianas) específicamente preparadas para metabolizar varios contaminantes orgánicos presentes en suelos y aguas en ambientes contaminados con materiales orgánicos (ejemplo, PCB).</p>	<p>Recomendación del uso de la mezcla comercial microbiana de Sybron, ya que proporciona los mejores resultados bajo todas las condiciones de tratamiento investigadas.</p>	<p>Sobiecka et al. (2008)</p>
<p>Estudio de posibles métodos para mejorar la velocidad de biodegradación aerobia (<i>ex-situ</i>) aplicados a suelo arenoso con alto nivel de contaminantes originados de fugas de diesel almacenado en tanque subterráneo de una gasolinera. Las eficiencias de degradación fueron medidas por dos métodos: respirometría y cromatografía de gases.</p>	<p>Mejoramiento de la biodegradación a través de la bioestimulación (adición de soluciones de N y P o surfactante Tween 80) y bioaumentación (consorcio bacteriano aislado de un sistema de suelo cultivado (landfarming)).</p>	<p>Pinto et al. (2007)</p>
<p>Incremento de la biodegradabilidad de un agua residual contaminada con compuestos orgánicos (cresoles y fenoles) mediante procesos de oxidación avanzada (AOP) y bioaumentación.</p>	<p>La bioaumentación de especies: <i>Micrococcus</i>, <i>Pseudomonas</i>, y <i>Nocardia</i>, incrementaron la remoción de DQO y DBO bajo condiciones óptimas nutricionales y fisiológicas en un rango del 70 al 90 %.</p>	<p>Pandya. (2007)</p>

Resumen	Aportación	Referencia
Evaluación de un cultivo microbiano (<i>Micrococcus sp</i> , <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Brevibacterium sp</i> y <i>Nocardia sp</i>) en la remoción de DQO variando el pH en un sistema de lodos activados empleando reactores bioaumentados y no bioaumentados al tratar agua residual de refinería.	Con pH alrededor de 6.5 a 8.5 la eficiencia de remoción de DQO para ambos reactores fue prácticamente paralela, excepto que el desempeño del reactor aumentado fue ligeramente mejor que para el control.	Min et al. (1996)
Investigación de la efectividad de la bioaumentación de un plásmido pWVO por una mezcla microbiana en un SBR (nivel piloto y escala laboratorio) para el tratamiento de agua residual sintética conteniendo alcohol bencílico (BA) como un modelo xenobiótico.	La velocidad de degradación del BA fue mejorada después de la inoculación (de 1.9 a 0.98 mgBA/min) en el día 17 de operación. La supervivencia de la cepa bioaumentada y la degradación del BA fue demostrada para escala laboratorio en SBR, no así en escala piloto.	Venkata et al. (2008)

2.11 CINÉTICA DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS

En el diseño de un reactor para el tratamiento biológico de aguas residuales se requiere conocer los siguientes factores: a) la cinética de la reacción que gobierna el proceso de tratamiento, b) la caracterización del efluente a tratar, c) las condiciones ambientales locales, d) la capacidad de producción, e) los requerimientos del proceso de tratamiento y f) las características y volúmenes de los productos generados. También debe considerarse como un factor influyente los costos de construcción y de mantención del reactor (Demergasso et al., 2000). No existe ningún método directo para el diseño de este tipo de equipos, debido a que el diseño de un biorreactor estará regido principalmente por el sistema de reacción específico de que se trate.

La velocidad a la cual el sustrato (fuente de energía o nutriente) es consumido está generalmente relacionado con la velocidad de crecimiento microbiano. A continuación se muestran algunos modelos clásicos de crecimiento microbianos, y las conversiones relevantes a velocidades de sustratos (Demergasso et al., 2000):

$$r_g = \frac{dX}{dt} = \mu \quad \text{orden cero} \quad (1)$$

$$r_g = \frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{sustrato no limitante, primer orden}) \quad (2)$$

$$r_g = \frac{dX}{dt} = Y \frac{dS}{dt} - k_d X \quad (\text{limita el sustrato}) \quad (3)$$

Donde:

r_g : tasa de crecimiento bacteriano (g/L · t), (masa/volumen unitario · tiempo); X : concentración de biomasa (g/L), (masa de microorganismos activos/volumen del sistema); t : tiempo; μ : velocidad de crecimiento específica (t⁻¹), representa el aumento de la concentración de biomasa por asimilación de la materia orgánica y la disminución de la misma por muerte de los microorganismos; Y : coeficiente de conversión del sustrato en masa celular (biomasa/sustrato), depende de la estructura del sustrato utilizado y de las propiedades fisiológicas intrínsecas de los microorganismos; S : concentración del sustrato limitante del crecimiento (masa de sustrato/unidad de volumen); k_d : coeficiente de descomposición endógena (t⁻¹).

Una de las primeras y más sencillas es la **ecuación de Monod**, la cual fue desarrollada por Jacques Monod en 1940 y fue desarrollada por una serie de experimentos. Los resultados de estos experimentos fueron que a una concentración baja de sustrato, la velocidad del crecimiento llega a ser una función de la concentración del sustrato.

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{S+K_S} \right) \quad (4)$$

Donde:

μ_{\max} : velocidad específica máxima de crecimiento (t⁻¹), representa la velocidad de crecimiento en condiciones favorables de no limitación del sustrato; K_S : coeficiente de velocidad media, constante de afinidad o saturación media, que indica la aidez de un grupo trófico por un determinado sustrato (masa de sustrato/unidad de volumen). Es la concentración del sustrato en la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad de la máxima. Corresponde a la mínima concentración de sustrato que puede ser metabolizada por una determinada población microbiana a una velocidad competitiva.

Entonces la Ecuación 4 describe la relación entre la velocidad de crecimiento específico, y la concentración de sustrato. La ecuación de Monod asume que ningún nutriente diferente al sustrato es limitante y que los productos metabólicos no son tóxicos.

El efecto de la concentración de sustrato (S) sobre la tasa de crecimiento específico (μ) propuesto por Monod se ilustra en la Figura 2.2.

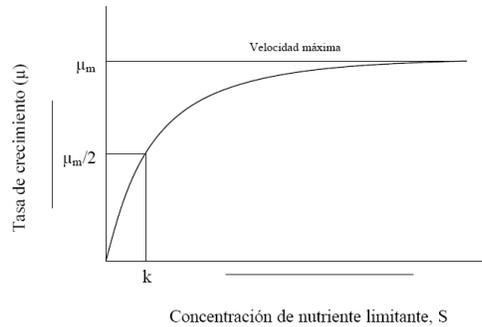


Figura 2.2 Efecto de la concentración de sustrato en la tasa de crecimiento de la biomasa

Incorporando una caída endógena:

$$\mu' = \mu_{max} \left(\frac{S}{S+K_S} \right) - k_d \quad (5)$$

Donde:

μ' : velocidad de crecimiento neta específica (t^{-1})

Y sobre la base del sustrato, sin caída:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{max}}{Y} \left(\frac{XS}{S+K_S} \right) \quad (6)$$

La ecuación de Monod puede ser linealizada para facilitar determinaciones de μ_{max} y K_S .

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{S \cdot \mu_{max}} + \frac{S}{S \cdot \mu_{max}} = \frac{K_S}{\mu_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (7)$$

Se grafica $1/\mu$ versus $1/S$, la pendiente es K_S/μ_{max} y el intercepto es $1/\mu_{max}$. En casos donde el sustrato no es limitante (K_S es mucho menor que S), la ecuación de Monod se reduce a una de orden cero, mientras que en el caso donde K_S es mucho mayor que S, la ecuación se reduce a una de primer orden.

En general, para determinar la concentración del sustrato se utiliza la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅) y la Demanda Química de Oxígeno (DQO) (Demergasso et al., 2000).

La Ecuación 6 puede escribirse como:

$$r_{SU} = -\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{max}}{Y} \left(\frac{XS}{S+K_S} \right) \quad (8)$$

Donde:

r_{su} : máxima cantidad de sustrato por unidad de biomasa, en la unidad de tiempo.

Expresiones (4) y (8) conducen a la siguiente relación:

$$r_g = -Yr_{SU} \quad (9)$$

La Ecuación 9 relaciona el grado de utilización del sustrato y la tasa de crecimiento. La Ecuación 8 puede escribirse como:

$$r_{SU} = -\frac{dS}{dt} = -\frac{kXS}{S+K_S} \quad (10)$$

Donde: $k = \mu_{max}/Y$

Para el proceso de descomposición endógena:

$$r_d = -k_d X \quad (11)$$

Donde:

r_d : descomposición endógena; La velocidad neta de crecimiento bacteriano en (masa/(volumen·tiempo)), r'_g está dada por la siguiente ecuación:

$$r'_g = r_g + r_d = -Yr_{SU} - k_d X = \frac{\mu_{max}XS}{S+k_s} - k_d X \quad (12)$$

r'_g : tasa neta de crecimiento de microorganismos, biomasa/unidad de volumen·tiempo

Si la reacción es dominada por la actividad microbológica intracelular, la cinética puede ser representada (Alexander, 1994) por la ecuación de Monod.

Para evaluar la constante específica de crecimiento se grafica $\ln X$ versus el tiempo, integrando la ecuación de Monod (Ecuación 2: $\ln(X) = \mu \cdot t + \text{cte}$), que no es más que la ecuación de una recta donde el valor de la pendiente es μ . Se calcula μ una vez aplicada la regresión lineal a los datos con el fin de ajustarlos a la ecuación de una recta. Se calcula luego la pendiente de la recta (Y) graficando X contra S , mediante regresión lineal (Demergasso et al., 2000).

A nivel industrial, analizando la cinética en procesos continuos es posible dimensionar con precisión los biorreactores y las instalaciones anexas en función de la productividad deseada. Se reducen al máximo, de esta manera, las inversiones y los gastos de funcionamiento (Demergasso et al., 2000).

La ecuación de Monod tiene dos casos limitantes. El primer caso es que a una concentración alta de sustrato, en donde $S \gg K_s$. En este caso, μ es esencialmente igual a μ_{\max} . Esto simplifica la ecuación y el resultado de la relación es de orden cero o independiente de la concentración del sustrato:

$$\text{Para } S \gg K_s: \quad \mu = \mu_{\max} \quad (13)$$

Bajo estas condiciones, el crecimiento ocurrirá en una velocidad máxima de crecimiento.

El segundo caso limitante ocurre en una concentración baja de sustrato cuando $S \ll K_s$. En este caso existe una ecuación de primer orden dependiente de la concentración de sustrato:

$$\text{Para } S \ll K_s: \quad \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} S}{K_s} \quad (14)$$

Como se muestra en la ecuación anterior, cuando la concentración del sustrato es baja, el crecimiento (dX/dt) es dependiente de la concentración del sustrato. Si la concentración del sustrato decrece, la tasa de crecimiento también decrece.

Este tipo de crecimiento es encontrado típicamente en reactores por lote en el final de la curva de crecimiento cuando el sustrato está cerca de ser consumido. Este es también el tipo de crecimiento que es típicamente esperado en un ambiente natural cuando los nutrientes y el sustrato son limitantes.

2.12 REACTORES

El desarrollo de las reacciones se lleva a cabo en reactores de diferentes tipos y comportamientos. El conocimiento del comportamiento de los reactores ayuda en la optimización de los procesos de remoción de contaminantes ya que, aunque sea la misma cinética de reacción, los resultados serán diferentes al cambiar el reactor o el arreglo entre ellos; por ejemplo, se pueden hacer combinaciones que permitan reducir tiempos de tratamiento, volúmenes, el área de instalación, entre otras ventajas.

De una forma general, el balance de masa para diferentes reactores se puede expresar de la siguiente manera (Martínez et al., 2005):

$$\text{ACUMULACIÓN} = \text{ENTRADA} - \text{SALIDA} \pm \text{REACCIÓN}$$

El término de la reacción de la Ecuación 15 tiene signo positivo negativo, lo que quiere decir que éste será utilizado dependiendo del material a evaluar. Por ejemplo en el caso de la remoción de un contaminante, el signo será negativo debido a que desaparece del sistema; al contrario, tendrá signo positivo cuando entre al sistema; esto sería el caso de los microorganismos que crecen debido al consumo del sustrato (Martínez et al., 2005). Aplicando lo anterior para el reactor por lotes, se tiene que:

$$\text{ACUMULACIÓN} = \overset{0}{\cancel{\text{ENTRADA}}} - \overset{0}{\cancel{\text{SALIDA}}} \pm \text{REACCIÓN} \quad (15)$$

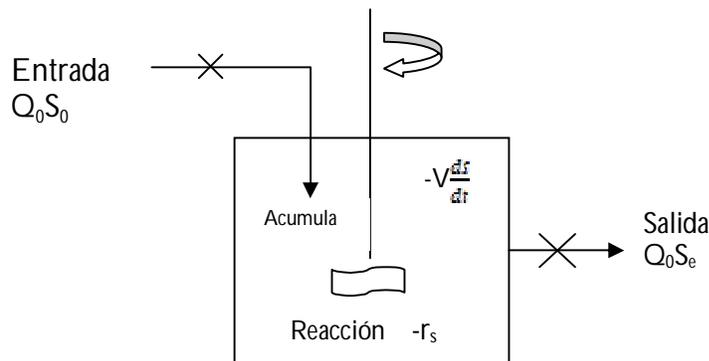


Figura 2.3 Reactor por lote

Los términos de entrada y salida de sustrato en el reactor, valen cero debido a que en este tipo de reactores no hay ni entrada ni salida por convección (véase la Figura 2.3). Sustituyendo los términos:

$$\text{Acumulación} = -V \frac{dS}{dt}$$

Donde:

V: volumen; **-(dS/dt)**: variación del sustrato en el reactor. En este caso es negativo porque está siendo consumido.

La convección es igual a $Q_0 S_0$ así como también $Q_0 S_e$ es igual a cero, pues no hay entradas ni salidas.

Donde:

Q₀: caudal de entrada o salida; **S₀**: concentración de sustrato a la entrada del reactor; **S_e**: concentración de sustrato a la salida del reactor; **-r_s** = tasa de la reacción, (signo negativo ya que se consume por la reacción y depende del tipo de cinética).

Sustituyendo en la Ecuación 16:

$$-V \frac{dS}{dt} = Q_0 S_0 - Q_0 S_e - V r_s \quad (16)$$

Eliminando el volumen de ambos miembros: $-\frac{dS}{dt} = -r_s$

E integrando: $-\int_{S_0}^{S_e} \frac{dS}{-r_s} = \int_0^t dt$

Por lo tanto, la ecuación general para el tiempo de reacción en un reactor por lote (t), con cualquier tipo de reacción es:

$$-\int_{S_0}^{S_e} \frac{dS}{-r_s} = t \quad (17)$$

Aplicando la Ecuación 18 cuando se desarrolla una ecuación de orden cero, es decir, $-r_s = k$; por lo tanto $-r_s$. Sustituyendo la Ecuación 18 se tiene que: $-\int_{S_0}^{S_e} \frac{dS}{K} = t$

Integrando:

$$t = \frac{S_0 - S_e}{K} \quad (18)$$

Para el caso de reacción de primer orden, $-r_s = kS_e$

Se sustituye, de la misma forma, en la Ecuación 18: $-\int_{S_0}^{S_e} \frac{dS}{KS} = t$

Se integra, para obtener el tiempo de reacción en un reactor por lote:

$$t = \frac{1}{K} \ln \frac{S_0}{S_e} \quad (19)$$

Para orden variable se tiene que: $-r_s = \frac{K_1 S}{1 + K_2 S}$

Sustituyendo en la Ecuación 18:

$$-\int_{S_0}^{S_e} \frac{dS}{\left(\frac{K_1 S}{1 + K_2 S}\right)} = t$$

E integrando y despejando el tiempo de reacción se obtiene:

$$t = \frac{1}{K_1} \ln \frac{S_0}{S_e} + \frac{k_2}{K_1} (S_0 - S_e) \quad (20)$$

2.12.1 Biorreactores

Un proceso de fermentación típico es esencialmente un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. Los microorganismos van aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. El biorreactor, es sin duda, uno de los equipos fundamentales de la microbiología industrial. Es el

recipiente donde se realiza el cultivo, y su diseño debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos (Merchuk, 1994).

Las "tareas" que realiza el biorreactor pueden resumirse del siguiente modo: a) Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación, b) Mantener constante y homogénea la temperatura, c) Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes, d) Suministrar oxígeno a una tasa tal que satisfaga el consumo, e) El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro; una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo deseado (Merchuk, 1994).

2.12.2 Sistemas de cultivo

Para un componente cualquiera del cultivo, incluida la biomasa, se puede plantear el siguiente balance de materia en el biorreactor (Merchuk, 1994).

Velocidad de acumulación = Velocidad de ingreso - Velocidad de salida + Velocidad de formación - Velocidad de consumo

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = F_1 C_{i1} - F_2 C_i + V r_{fi} - V r_{ci} \quad (21)$$

Donde:

V: volumen de cultivo; **F₁**: caudal de alimentación; **F₂**: caudal de salida; **C_{i1}**: concentración del componente "i" en la alimentación; **C_i**: concentración en el caudal de salida, la que, si el cultivo está bien mezclado, se puede asumir idéntica a la que hay dentro del biorreactor; **r_{fi}** y **r_{ci}**: tasa de formación y consumo del componente "i", respectivamente.

Por otra parte el volumen de cultivo variará en el tiempo según sean **F₁** y **F₂**. Suponiendo que la densidad del cultivo y la de alimentación son iguales resulta:

$$\frac{dV}{dt} = F_1 - F_2 \quad (22)$$

Dependiendo de cómo sean F_1 y F_2 surgen, básicamente, tres sistemas de cultivo:

1. Cultivo continuo

Ambos caudales son iguales y por la Ecuación 22 es V constante, por lo tanto la Ecuación 21 se reduce a:

$$V \frac{dC_i}{dt} = F(C_{i1} - C_i) + V(r_{fi} - r_{ci}) \quad (23)$$

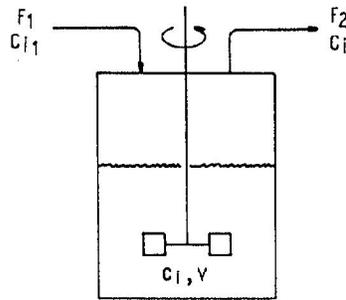


Figura 2.4 Biorreactor con caudales y concentraciones entrada y salida

2. Reactor por lote, en operación de llenado

El caudal de salida, F_2 , es nulo, por lo que V aumentará en el tiempo en función del caudal de entrada.

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (24)$$

y en el balance de materia se anula el término $F_2 C_i$ resultando:

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = FC_{i1} + V(r_{fi} - r_{ci}) \quad (25)$$

Debe destacarse que en este caso V permanece dentro del operador diferencial pues varía con el tiempo según la Ecuación 23. Por tal motivo el reactor por lote alimentado, y a diferencia del caso anterior, tiene duración limitada en el tiempo ya que el volumen no puede incrementarse más allá del volumen útil que posee el biorreactor.

3. Etapa de reacción del reactor por lote

Es aquel en donde no entra ni sale material durante la reacción, sino más bien, al inicio del proceso se introducen los materiales, se lleva a las condiciones de presión y temperatura requeridas, y se deja

reaccionar por un tiempo preestablecido, luego se descargan los productos de la reacción y los reactantes no convertidos. La duración del cultivo en el reactor por lote es, por supuesto, también limitada en el tiempo y depende esencialmente de las condiciones iniciales del cultivo. Una vez inoculado el medio, la concentración de biomasa aumenta a expensas de los nutrientes y cuando el sustrato que limita el crecimiento se agota, finaliza el reactor por lote. Ambos caudales son nulos así que V es constante y en la Ecuación 21 se anulan los términos $F_1 C_{i1}$, $F_2 C_i$.

$$\frac{dC_i}{dt} = r_{fi} - r_{ci} \quad (26)$$

Si por las características del proceso, la lisis celular o la descomposición del producto son importantes, deberá incluirse en el balance un término adicional que contemple este aspecto.

Cultivo continuo

Para poner en marcha un cultivo continuo, se realiza previamente un cultivo por lote y en un momento dado se comienza a alimentar con medio fresco a un caudal F y por un rebalse se mantiene el volumen constante (Merchuk, 1994).

El caudal de salida contendrá células, medio de cultivo parcialmente agotado y, eventualmente, algún producto (P). Si se alimenta con medio fresco significa que $X=0$ y $P=0$, por lo que sólo se deberá considerar la concentración de sustrato limitante del crecimiento, S_1 , en la alimentación. Con base en estas consideraciones los balances de materia para X , S y P serán (ver Ecuación 23):

$$V \frac{dX}{dt} = -FX + Vr_x \quad (27)$$

$$V \frac{dS}{dt} = F(S_1 - S) - Vr_s \quad (28)$$

$$V \frac{dP}{dt} = -FP + Vr_p \quad (29)$$

Donde:

P: concentración de producto; r_x : cinética de formación para la biomasa; r_p : cinética de formación del producto; r_s : velocidad de consumo.

En estado estacionario las concentraciones dentro del biorreactor permanecerán constantes en el tiempo, lo que significa igualar a cero las Ecuaciones 27, 28 y 29. De la primera, y teniendo en cuenta que $r_x = \mu x$, resulta:

$$\frac{F}{V} = D = \mu \quad (30)$$

Donde:

D: tasa de dilución:

Si se reemplaza μ por la ecuación de Monod, resulta que la concentración de S en estado estacionario es:

$$\bar{S} = \frac{K_s D}{\mu_{\max} - D} \quad (31)$$

Donde:

\bar{S} : concentración en estado estacionario.

De la Ecuación 28 surge:

$$r_s = D(S_1 - \bar{S}) \quad (32)$$

Además $r_s = (\mu X)/Y_{x/s}$, y $\mu = D$.

Donde:

$Y_{x/s}$: rendimiento celular.

Por lo tanto la concentración de biomasa en estado estacionario (\bar{X}) es:

$$\bar{X} = Y_{x/s}(S_1 - \bar{S}) \quad (33)$$

Donde:

\bar{X} : concentración de biomasa en estado estacionario.

Si en particular S es la fuente de carbono y energía, r_s vendrá dado por la ecuación: $r_s = (r_x/Y_{x/s}) + m_s X$

Donde:

$Y_{x/s}$: rendimiento que se obtendría si el mantenimiento fuese nulo; m_s : coeficiente de mantenimiento.

Por tanto X será:

$$X = \frac{DY_{x/s}(S_1 - \bar{S})}{(D + m_s Y_{x/s})} \quad (34)$$

Cuando $m_s=0$, la Ecuación 34 se reduce a la Ecuación 33.

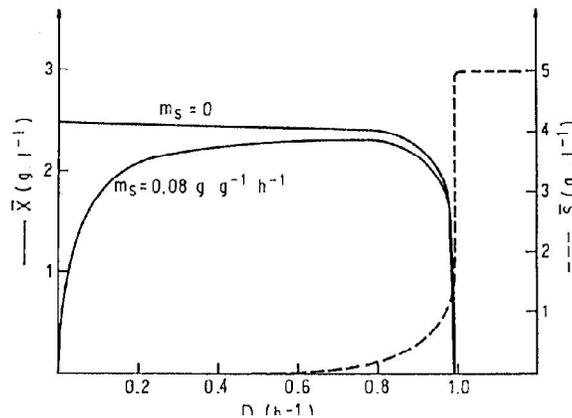


Figura 2.5 Cultivo continuo.

Concentración de biomasa y sustrato en estado estacionario a distintos valores de tasa de dilución.

Parámetros: $\mu_{\max} = 1 \text{ h}^{-1}$; $Y_{x/s} = 0.5$; $K_s = 0.05 \text{ g L}^{-1}$; $S_1 = 5 \text{ g L}^{-1}$

La Figura 2.5 muestra como varían la concentración de sustrato en estado estacionario en función de la tasa de dilución. La curva superior corresponde a la Ecuación 33 y la inferior a la Ecuación 34, pudiéndose observar en este último caso que el efecto del mantenimiento celular se hace notable a bajas rapidezces de dilución. En ambos casos puede apreciarse que existe un valor de D por encima del cual es $X=0$, con lo cual por la Ecuación 33 o 34 es $\bar{S}=S_1$. Si se reemplaza este valor en la Ecuación 31 se obtiene la tasa de dilución crítica D_c .

$$D_c = \mu_{\max} \frac{S_1}{K_s + S_1} \quad (35)$$

Donde:

D_c : tasa de dilución crítica.

Si como ocurre normalmente $S_1 \gg K_S$ se tiene que $D_c = \mu_{m\acute{a}x}$, lo cual es un criterio muy útil en el momento de seleccionar un valor de D apropiado, ya que deberá cumplirse que $D < \mu_{m\acute{a}x}$. En caso contrario ocurrirá el "lavado" del cultivo, debido a que la velocidad de salida de las células del biorreactor será mayor que la de crecimiento.

En estado estacionario, la Ecuación 29 se reduce a:

$$\bar{P} = \frac{r_p}{D} \quad (36)$$

Donde:

\bar{P} : concentración de producto en estado estacionario.

O bien

$$\bar{P} = \frac{q_p \bar{X}}{D} \quad (37)$$

Donde:

q_p : tasa específica de formación de producto.

Dependiendo de cómo sea la cinética de formación del producto será la forma de la curva P vs. D . Alternativamente se emplea el cultivo continuo para elucidar qué tipo de relación existe entre q_p y μ , ya que, es uno de los factores a tener en cuenta para planear la estrategia de producción.

El cultivo continuo es sumamente útil para determinar parámetros de crecimiento tales como K_S , $\mu_{m\acute{a}x}$ o $Y'_{x/s}$. Así reordenando la Ecuación 31 se obtiene:

$$\frac{1}{D} = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{K_S}{\mu_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S} \quad (38)$$

Graficando $1/D$ en función de $1/S$, los puntos deberán ajustarse a una recta cuya intersección con el eje $1/D$ dará el valor de $1/\mu_{\max}$ y la pendiente K_S/μ_{\max} ; si es que el cultivo puede ser representado por una cinética como la de Monod.

Por otra parte redondeando la Ecuación 34 resulta:

$$D \frac{(\bar{S}_1 - \bar{S})}{\bar{X}} = \frac{D}{Y_{X/S}} + m_s \quad (39)$$

De donde la gráfica de $D(S_1 - S)/X$ en función de D permitirá estimar $1/Y'_{X/S}$ y m_s . En este caso el sustrato considerado es la fuente de carbono y energía.

Reactor por lote alimentado

Para iniciar un reactor por lote alimentado valen las mismas consideraciones que se hicieron para iniciar un cultivo continuo, salvo que en este caso se supone que se inicia la alimentación del cultivo cuando el sustrato limitante se ha agotado.

Si bien éste no es un requisito indispensable, permite simplificar el tratamiento matemático y además es un buen punto de partida con respecto al objetivo del reactor por lote alimentado, es decir: controlar la tasa de crecimiento mediante la tasa de alimentación. También se supondrá que se alimenta con medio de cultivo fresco, es decir que $X_1=0$ y $P_1=0$. Luego los balances de materia para X , S y P serán (Ecuación 25):

$$\frac{d(XV)}{dt} = Vr_X = V\mu X \quad (40)$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_1 - Vr_S \quad (41)$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = Vr_P \quad (42)$$

Si en la Ecuación 41 se reemplaza r_s por $r_X/Y_{X/S}$ y se tiene en cuenta la Ecuación 40 resulta:

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_1 - \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{d(XV)}{dt} \quad (43)$$

Si se desea que la tasa de crecimiento esté controlada por la de alimentación, ésta deberá ser tal que en todo momento sea $S=\text{constante}$ y por lo tanto $d(SV)/dt=0$, luego:

$$\frac{d(XV)}{dt} = Y_{X/S}FS_1 \quad (44)$$

e integrando:

$$XV = X_0V_0 + Y_{X/S}FS_1t \quad (45)$$

Donde:

X_0 y V_0 representan la concentración de biomasa y el volumen de cultivo en el momento de iniciar la alimentación.

La variación de V con el tiempo se obtiene integrando la ecuación: $\frac{dV}{dt} = F$

Donde el primer término del segundo miembro expresa la tasa de formación de producto debida al crecimiento, y el segundo la debida al mantenimiento.

$$V = V_0 + Ft \quad (46)$$

El criterio para diseñar una alimentación adecuada se obtiene combinando las Ecuaciones 40 y 44, de donde a $t=0$, resulta:

$$FS_1 = \frac{V_0\mu X_0}{Y_{X/S}} \quad (47)$$

En la Ecuación 47 se puede emplear cualquier valor de μ hasta $\mu_{\text{máx}}$, por tanto la Ecuación 47 puede reescribirse como:

$$FS_1 \leq \frac{V_0\mu_{\text{máx}}X_0}{Y_{X/S}} \quad (48)$$

Como criterio adicional conviene seleccionar el valor de S_1 tan alto como sea posible y F relativamente pequeño a fin de evitar la dilución excesiva del cultivo.

El valor de μ durante el reactor por lote varía permanentemente, ya que por la Ecuación 40 es:

$$\mu = \frac{1}{XV} \frac{d(XV)}{dt} \quad (49)$$

Reemplazando en la Ecuación 49 las Ecuaciones 44 y 45 resulta:

$$\mu = \frac{Y_{X/S}FS_1}{X_0V_0 + Y_{X/S}FS_1t} \quad (50)$$

Por tanto μ disminuye con el tiempo. Esto es válido solamente para el caso en el que F y S_1 son constantes, pero nada impide hacer alimentaciones con $F=F(t)$ o $S_1=S_1(t)$, con lo cual puede lograrse, por ejemplo, que μ se mantenga constante o bien que aumente hasta valores cercanos a $\mu_{m\acute{a}x}$. La diversidad de alimentaciones posibles que pueden emplearse es, quizás, una de las características más apreciables del reactor por lote alimentado. La otra es que este sistema de cultivo es muy apropiado para obtener altas concentraciones de biomasa, muy superiores a las que se podrían obtener en un reactor por lote, donde la limitación está dada por la concentración inicial de nutrientes del medio de cultivo que pueden tolerar los microorganismos. Si se considera el mantenimiento celular el valor de r_s para la fuente de carbono y energía vendrá dado por

$r_s = \frac{r_x}{Y_{X/S}} + m_s X$ resultando:

$$\frac{d(XV)}{dt} + Y'_{X/S}m_sXV = FS_1Y'_{X/S} \quad (51)$$

Resolviendo la ecuación diferencial se obtiene:

$$XV = \frac{FS_1}{m_s} + (X_0V_0 - \frac{FS_1}{m_s})e^{-m_sY'_{X/S}t} \quad (52)$$

También se demuestra que en este caso el criterio para calcular la alimentación está dado por:

$$FS_1 \leq \frac{V_0\mu_{m\acute{a}x}X_0}{Y_{X/S}} + m_sX_0V_0 \quad (53)$$

En la Figura 2.6 se representa la Ecuación 52 para distintos valores de m_s , y la Ecuación 45 que corresponde al caso en que $m_s=0$. Se observa claramente que cuanto mayor es m_s menor es la cantidad de

biomasa obtenida, además las curvas con m_s distinto de 0 tienden asintóticamente a un valor máximo que está dado por:

$$(XV)_{\text{máx}} = \frac{FS_1}{m_s} \quad (54)$$

Este valor se obtiene directamente de la Ecuación 51 haciendo $d(XV)/dt=0$. En estas condiciones la totalidad de la fuente de carbono y energía que ingresa al biorreactor se utiliza para mantenimiento celular y por lo tanto ya no es posible aumentar la cantidad de biomasa. Alternativamente, si el cultivo se realiza con el objeto de obtener un producto perteneciente al grupo I (asociado al metabolismo energético), convendrá trabajar siempre en las condiciones indicadas, ya que toda la fuente de carbono suministrada se transformará en el producto deseado.

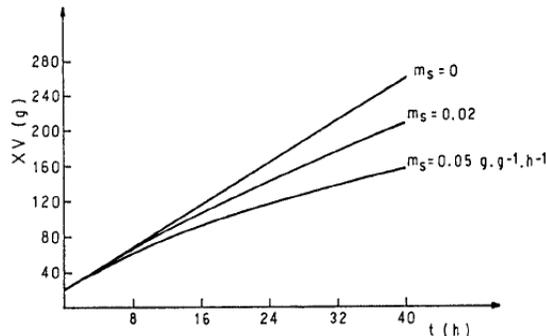


Figura 2.6 Lote alimentado.

Parámetros: $F=0.05 \text{ Lh}^{-1}$; $S_1=240 \text{ gL}^{-1}$; $Y_{X/S}=0.5$; $X_0=10 \text{ gL}^{-1}$; $V_0=2 \text{ L}$. Volumen final=4 L.

Reactor por lote

Aplicando la ecuación $\frac{dc_i}{dt} = r_{fi} - r_{ci}$ a la biomasa, al producto y al sustrato resulta:

$$\frac{dX}{dt} = r_X = \mu X \quad (55)$$

$$\frac{dS}{dt} = r_S = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad (56)$$

$$\frac{dX}{dt} = r_P \quad (57)$$

Suponiendo que no se forma producto y que la relación μ -S puede ser representada por la ecuación de Monod surge que:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{máx}} \frac{XS}{K_s + S} \quad (58)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{\text{máx}}}{Y_{X/S}} \cdot \frac{XS}{K_s + S} \quad (59)$$

El sistema formado por las Ecuaciones 58 y 59 posee solución analítica, pero en ésta no aparece X en forma explícita por lo que resulta de escasa utilidad. En cambio es posible analizar casos particulares haciendo algunas suposiciones. Por ejemplo se puede asumir que durante una buena parte del tiempo se cumplirá que $S \gg K_s$, por lo tanto las Ecuaciones 58 y 59 se reducen a:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{máx}} X \quad (60)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{\text{máx}} X}{Y_{X/S}} \quad (61)$$

Por tanto bajo las condiciones indicadas el crecimiento se llevará a cabo con el máximo valor de μ posible. Integrando la Ecuación 60 con la condición a $t=0$; $X=X_0$, se llega a la expresión:

$$X = X_0 e^{\mu_{\text{máx}} t} \quad (62)$$

O bien:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\text{máx}} t \quad (63)$$

La Ecuación 62 establece que para $S \gg K_s$ el crecimiento es exponencial (fase exponencial), y por la Ecuación 63 es posible calcular el valor de μ_m graficando el $\ln X$ en función del tiempo.

La variación de S con t se obtiene introduciendo la Ecuación 62 en la Ecuación 61 e integrando con la condición: a $t = 0$; $S = S_0$

$$S = S_0 - \frac{X_0}{Y_{X/S}} (e^{\mu_{\text{máx}} t} - 1) \quad (64)$$

A medida que el cultivo transcurre, S disminuye hasta que se llega a la condición en que S es comparable a K_s y por lo tanto dX/dt comienza a disminuir (fase de desaceleración) hasta hacerse finalmente nula cuando $S=0$. En este punto se alcanza la máxima concentración de biomasa y finaliza el lote (fase estacionaria). La concentración final de biomasa, X_f se puede calcular si se conoce el $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_f - S_0} \quad (65)$$

Donde:

X_f : concentración final de biomasa.

Puesto que $S_f=0$ resulta:

$$X_f = X_0 + Y_{X/S}S_0 \quad (66)$$

Alternativamente se pueden emplear las Ecuaciones 65 o 66 para calcular $Y_{X/S}$.

En la Figura 2.7 se representan las distintas fases de crecimiento, que surgen de suponer válida a la ecuación de Monod. Sin embargo antes de la fase exponencial suele existir otra fase (I) conocida como fase de retardo, durante la cual la concentración de biomasa no se modifica substancialmente, pero ocurren profundos cambios en la composición macromolecular y en el "estado fisiológico" de las células, ambos tendientes a adaptarlas al nuevo entorno.

Si se considera esta fase, debe aplicarse una corrección a la Ecuación 63, lo que esencialmente consiste en restarle al tiempo real el tiempo transcurrido hasta que efectivamente comienza el crecimiento:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m(t - t_r) \quad (67)$$

Donde t_r , da cuenta de la duración de la fase de retardo.

Normalmente esta fase no es deseable ya que significa una pérdida de tiempo, por lo que usualmente se trata de minimizarla. Una forma de lograrlo consiste en hacer crecer el inóculo en un medio de cultivo igual al que se va a emplear posteriormente, y además transferirlo cuando las células se encuentran en plena fase exponencial.

Por otra parte después de la fase estacionaria sobreviene la fase de declinación (V) que consiste en una disminución de la concentración de biomasa debida a la lisis celular. Esta fase puede representarse considerando una cinética adicional en el balance de materia.

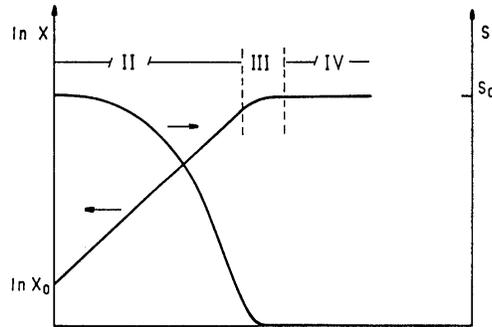


Figura 2.7 Cultivo por Lote.
 Curva de crecimiento y consumo de sustrato.
 II=fase exponencial; III=fase de desaceleración; IV=fase estacionaria.

2.12.3 Reactores discontinuos secuenciales (SBR)

El uso de los procesos discontinuos secuenciales o SBR (del inglés Sequencing Batch Reactor) es una de las alternativas innovadoras que ha sido utilizada para el tratamiento de efluentes industriales.

La tecnología de los reactores SBR se desarrolló tomando en cuenta los trabajos de Arden y Lockett de 1914 (Wilderer, et al., 2001). Considerando que la exposición periódica de los microorganismos a condiciones aerobias, anóxicas y anaerobias es efectuada adecuadamente en un sistema de alimentación por lotes. En este caso, el tiempo y frecuencia de operación y la gama de concentraciones pueden ser ajustados independientemente de las condiciones de alimentación. Así de manera paralela pero independiente, Irvine y Goronszy trabajaron sobre esta tecnología en la década de 1970, siendo Irvine quién creó el término de "*Sequencing Batch Reactor*" en 1967 (Morales-Mejía, 2006).

En su forma más simple, el reactor SBR está constituido por un tanque que funciona bajo el sistema de vaciado/llenado. El tanque se llena durante un periodo dado y en seguida se pone a funcionar como un reactor en lotes. Cada tanque efectúa las funciones de igualación, aireación y decantación en una secuencia con respecto al tiempo.

El sistema SBR presenta las siguientes ventajas con respecto a los procesos continuos:

- ✦ Establecimiento de un consorcio de microorganismos estable y con altos rendimientos.

- ✦ Flexibilidad en la conducción de su operación: en estos procesos la degradación de los compuestos se realiza en función del tiempo. En caso de haber un choque de concentración (aporte puntual de un tóxico) se puede prolongar la duración del tratamiento.
- ✦ Se disminuyen los costos de inversión, pues el mismo tanque sirve de reactor y de sedimentador.
- ✦ Se mejora la decantación de la biomasa debido a la operación cíclica del reactor. Los índices de decantación malos, si es que existen, son menores que los que presentan los procesos continuos.

Los sistemas SBR han sido utilizados para manipular tanto la distribución de los microorganismos en el reactor como su estado fisiológico. En particular han sido usados para eliminar compuestos específicos presentes en efluentes industriales.

Los SBR pueden asimilar grandes variaciones de flujo y de composición de la alimentación. También los compuestos tóxicos o los cambios importantes en la carga orgánica pueden ser amortiguados por los SBR mediante la prolongación del tiempo de retención de las aguas, hasta que la población bacteriana se haya recuperado y se haya efectuado la purificación (Irvin et al., 1979).

La operación de estos reactores para el tratamiento de aguas implica la producción de lodos biológicos, cuyo desecho del tanque puede realizarse durante o después de la sedimentación, o en la parte final de la reacción, ya sea de manera semanal, diaria o una vez cada ciclo (Wilderer et al., 2001).

Las fases de funcionamiento de un reactor SBR convencional son descritas en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5 Descripción de las diferentes fases de funcionamiento de un SBR

Fase de funcionamiento	Descripción
Llenado	Adición del agua residual cruda al reactor. El nivel del agua dentro del reactor asciende desde cerca del 25 % de la capacidad (al final de la fase inactiva) hasta el 100 % de su capacidad. El proceso lleva aproximadamente el 25 % de la duración de todo el ciclo.
Reacción	En este proceso se completan las reacciones iniciadas durante la fase de llenado. Suele ocupar el 35 % de la duración total del ciclo.
Sedimentación	En esta fase se permite la separación de sólidos, para conseguir un sobrenadante clarificado como efluente.

Fase de funcionamiento	Descripción
Vaciado	El propósito de esta fase es la extracción del agua clarificada del reactor. El tiempo de vaciado puede variar entre el 20 y el 50 % de la duración total del ciclo (entre 15 minutos y 2 horas), siendo 45 minutos una duración típica.
Inactiva	El objetivo de esta fase en un sistema de múltiples tanques es permitir que un reactor termine su fase de llenado antes de conectar otra unidad.

Fuente: Metcalf y Eddy 2004.

La Figura 2.8 muestra el reactor SBR en sus diferentes etapas. Es un solo tanque, pero se esquematiza en secuencia para tener una mejor representación de sus fases.

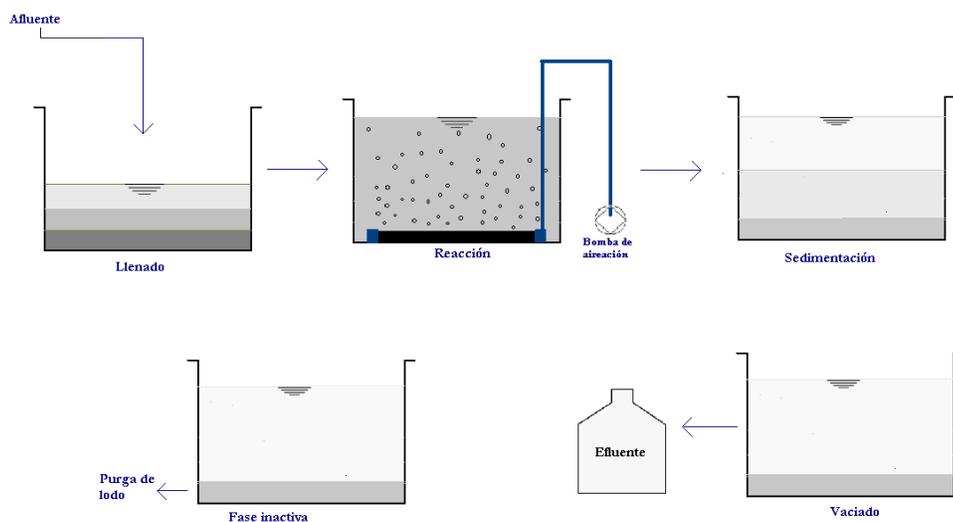


Figura 2.8 Funcionamiento de un reactor SBR.

La Tabla 2.6 muestra el resumen y la aportación de algunos estudios realizados en sistemas SBR.

Tabla 2.6 Investigaciones relacionadas a sistemas SBR

Resumen	Aportación	Autores
Comparación de la eficiencia de biodegradabilidad de aguas de producción de petróleo (liviano, mediano y pesado) entre dos sistemas: aerobio (SBR) y anaerobio (UASB) basado en porcentajes de remoción de fenoles totales y DQO, empleando microorganismos aclimatados.	El sistema de tratamiento aerobio con reactores SBR mostró ser más efectivo para la remoción de la materia orgánica (DQO soluble) presente en las aguas de producción petroleras, al ser comparado con el sistema anaerobio.	Altamira et al. (2005)

Resumen	Aportación	Autores
Aplicación de un sistema SBR para la remoción de metales (Ni^{2+} y Pb^{2+}) presentes en un agua contaminada mediante la variación de concentraciones de MLSS, así como la evaluación del desempeño de los bio-sólidos aclimatados	La más alta eficiencia de remoción de los metales pesados en el SBR fue del 80 % empleando MLSS de 2000 - 4000 mg/L	Sirianuntapiboon et al. (2008)
Evaluación de la potencialidad de la bioaumentación en la degradación de la nicotina y la rapidez de disposición de los contaminantes en las aguas residuales del tabaco en un sistema SBR empleando <i>Pseudomonas sp. HF-1</i> .	Comparada con el sistema no bioaumentado, el sistema bioaumentado exhibió capacidades considerables para fortalecer la eliminación de la contaminación, con 100 % de la degradación de la nicotina y más del 84 % de la remoción de la DQO en 12 horas de tratamiento.	Wang et al. (2009)
Evaluación de la efectividad de la biorremediación en la remoción de carbofurano para un suelo contaminado usando biosólido (bioaumentación) en un reactor SBR	El porcentaje más elevado de remoción de cabofurano (97 %) se obtuvo haciendo uso de la bioaumentación (<i>Burkholderia cepacia</i> PCL3), el tratamiento de bioaumentación - bioestimulación (adición de molasa) obtuvo el segundo lugar en cuanto al porcentaje de remoción (88 %). El tercer lugar se obtuvo con la aplicación sólo de la bioestimulación.	Plangklang et al. (2009)

3.1 RECOLECCIÓN DEL AGUA CONTAMINADA

La recolección del agua contaminada se llevó a cabo según la Norma Mexicana: NMX-AA-003-1980 en una de las zanjas del polígono ZV5 de la ex refinería 18 de Marzo ubicada en la región de transición entre los sedimentos de pie de monte de la Sierra de Las Cruces (Monte Alto) y los depósitos lacustres constituidos principalmente por limos y arcillas. El agua contaminada fue preservada y transportada (o bien analizada en el lugar de muestreo) de acuerdo a lo indicado en las Normas Mexicanas.

3.2 CARACTERIZACIÓN DEL AGUA CONTAMINADA

La caracterización del agua contaminada de la ex refinería 18 de Marzo consistió en la medición de los siguientes parámetros: pH, grasas y aceites (GyA), demanda química de oxígeno total (DQO_T) y soluble (DQO_S), demanda bioquímica de oxígeno total (DBO_T) y soluble (DBO_S), nitrógeno total, fósforo total, sólidos en suspensión totales (SST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), fenoles e hidrocarburos aromáticos: benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX), (ver Tabla 3.1).

El análisis de hidrocarburos aromáticos monocíclicos se realizó por medio de cromatografía de gases, el cual es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra entre dos fases. Una fase es el lecho estacionario de extensa superficie empacada dentro de una columna y puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al sólido. La otra fase consiste en un gas o líquido que percola sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma, esta fase recibe el nombre de fase móvil. En la cromatografía de gases, la fase móvil se denomina gas portador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna. Los adsorbentes, tales como el carbón vegetal, gel de sílice y tamices moleculares (zeolitas sintéticas) son las fases estacionarias en la cromatografía de gases (Lazcano, 2010).

Lazcano (2010) realizó análisis de cromatografía de gases para determinar la presencia de BTEX en combinación con microextracción en fase sólida de muestras líquidas (HS-MEFS), esta técnica permite una rápida extracción del solvente libre en compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles para muestras

acuosas. La técnica es capaz de realizar la extracción de micro-contaminantes en muestras acuosas previamente para ser analizadas en análisis cromatográfico. Una importante ventaja de esta técnica es la integración de extracción e inyección dentro del instrumento en un solo paso, minimizando el tiempo de análisis (Sarafraz-Yazdi et al., 2009).

Tabla 3.1 Parámetros fisicoquímicos, Normas Mexicanas y técnicas analíticas empleadas en la caracterización del agua contaminada.

Parámetro	Normas Mexicanas	Método	Equipo
pH	NMX-AA-008-SCFI-2001	Potenciométrico	Potenciómetro (marca: Corning)
Grasas y aceites (GyA)	NMX-AA-005-SCFI-2000	Gravimétrico	Extracción Soxhlet; estufa eléctrica (marca: Felisa, modelo: Fe-291AD); balanza analítica (marca: Sartorius, modelo: TE1245)
Demanda química de oxígeno (DQO)	NMX-AA-030-SCFI-2001	Reflujo cerrado	Termo-reactor (marca: Merck); espectrofotómetro (marca: Equipar, modelo: 4001/4)
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO ₅)	NMX-AA-028-SCFI-2001	Oxidación biológica	Aireación con difusor (marca: Maxima-R); incubadora (marca: Vichi, modelo: BAGI-6090); medidor de oxígeno disuelto (marca: Hanna Instruments, modelo: HI 9143); balanza analítica (marca: Sartorius, modelo: TE1245)
Nitrógeno total	NMX-AA-026-SCFI-2001	Método titulométrico micro-Kjeldahl	Digestor - destilador (marca: Büchi); destillation unit k-350
Fósforo total	NMX-AA-029-SCFI-2001	Cloruro estanoso	balanza analítica (marca: Sartorius, modelo: TE1245); parrilla de calentamiento (marca: Cimarec, modelo: 8P131325); espectrofotómetro (marca: Equipar, modelo: 4001/4)
Sólidos suspendidos totales (SST)	NMX-AA-034-SCFI-2001	Peso seco	Balanza analítica (marca: Sartorius, modelo: TE1245); estufa eléctrica (marca: Felisa, modelo: Fe-291AD)

Parámetro	Normas Mexicanas	Método	Equipo
Sólidos suspendidos volátiles (SSV)	NMX-AA-034-SCFI-2001	Peso seco	Balanza analítica (marca: Sartorius, modelo: TE1245); mufla (marca: Furnance, modelo: 48000)
Carbono orgánico total (COT)	-	Oxidación térmica	Analizador TOC (marca: Shimadzu, serie: H52104412170)
Fenol	NMX-AA-050-SCFI-2001	Destilación de fenoles	Balanza analítica (marca: Sartorius, modelo: TE1245); potenciómetro (marca: Corning); espectrofotómetro (marca: Equipar, modelo: 4001/4)
Hidrocarburos monoaromáticos (BTEX)	-	Cromatografía de gases (Método: USEPA 8260B)	GC/MSD 7869A/5975C

3.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS CONSORCIOS BACTERIANOS EMPLEADOS

En el presente trabajo se emplean tres diferentes tipos de consorcios microbianos para el tratamiento de un agua contaminada colectada en el terreno de la ex refinería 18 de Marzo. Dos de ellos son consorcios bacterianos comerciales (Hater et al., 1989; Sobiecka et al., 2008).

La Tabla 3.2 muestra los dos diferentes consorcios y los compuestos que degradan específicamente. La presentación comercial de los consorcios bacterianos es en forma de polvo color café (ver Anexo 7.5 para mayor información).

El tercer consorcio microbiano es el proveniente de la PTARCU. El interés de experimentar con este lodo es el de conocer si los microorganismos que no son especializados en la degradación de hidrocarburos y en general de compuestos xenobióticos, son capaces de tomar dichos compuestos como fuente de carbono y por tanto adaptarse, crecer, reproducirse y por ende degradar los contaminantes.

Tabla 3.2 Consorcios bacterianos empleados en el tratamiento exploratorio

Nombre del consorcio microbiano	Nomenclatura experimental
Consortio bacteriano especializado en degradar compuestos derivados del petróleo	C_{HC}
Consortio bacteriano especializado en degradar compuestos xenobióticos	C_{XENOB}
Lodo de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Universitaria	C_{PTARCU}

La relación carbono: nitrógeno: fósforo (C:N:P) empleada en los tratamientos biológicos de las dos etapas experimentales fue de 100:5:1 respectivamente. Con base a las mediciones de carbono orgánico soluble realizadas en dichos tratamientos se realizaron los cálculos necesarios para conocer las cantidades de cloruro de amonio (NH_4Cl) y fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) necesarios para ajustar la relación.

Se decidió emplear los dos consorcios bacterianos comerciales con base en las degradaciones de compuestos contaminantes que las hojas técnicas de C_{HC} y C_{XENOB} indican (ver Anexo 7.3) y que son de interés en el presente trabajo.

Algunas de las características de cada uno de los dos tipos de consorcios bacterianos comerciales especializados en la biodegradación de compuestos xenobióticos e hidrocarburos aromáticos (BTEX) se mencionan a continuación (ver Anexo 7.3):

✦ Consorcio Hidrocarburos (C_{HC})

Consortio de bacterias especializadas en degradar aceites y grasas provenientes del petróleo, hidrocarburos refinados (alcanos, alquinos, aromáticos, poli-aromáticos), degrada tensoactivos aunque estos sean ramificados o poli-aromáticos. La mezcla bacteriana sinérgica reduce la DQO y se disminuyen los olores desagradables (Novozymes, 2003). Los porcentajes y especies bacterianas presentes en el producto C_{HC} (Bi-Chem ABR) se mencionan a continuación: 95 % de *Pseudomona putida*, 5 % de *Pseudomona aeruginosa* (Hater et al., 1989).

✦ Consorcio Xenobióticos (C_{XENOB})

La mezcla microbiana incorpora cepas capaces de degradar ácidos grasos, surfactantes, hidrocarburos

alifáticos y aromáticos, fenoles, cetonas y orgánicos recalcitrantes (Novozymes, 2003). Los porcentajes y especies bacterianas presentes en el producto C_{XENOB} (Bi-Chem DC 1008CB) está compuesto de: 50 % de *Acinetobacter calcoaceticus*, 20 % de *Pseudomona putida*, 15 % de *Pseudomona alcaligenes*, 7 % de *Arthrobacter crystallopoietes*, 5 % *Bacillus licheniformis* y 3 % de *Pseudomona aeruginosa*.

3.4 PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL

La finalidad de la primera etapa experimental fue seleccionar uno de los tres cultivos microbianos operando bajo las mismas condiciones de pH, temperatura, oxígeno disuelto y medio mineral. La selección del cultivo se hizo con base en la mayor remoción alcanzada de los parámetros de respuesta. Los tres cultivos de estudio fueron las dos cepas bacterianas comerciales y el lodo proveniente de la PTARCU.

Además de seleccionar un consorcio microbiano de los tres propuestos, el propósito de la primera etapa experimental fue conocer si los microorganismos de cada consorcio tienen la capacidad de sobrevivir, desarrollarse y reproducirse en un ambiente hostil con respecto a las condiciones en las que fueron incubados. Este cambio abrupto de medio ambiente puede ocasionar esporulación bacteriana.

3.4.1 Curvas de crecimiento microbiano

Dado que para los tres consorcios microbianos el medio de cultivo llevado a cabo en biorreactores es un ambiente diferente con relación al medio para el cual fueron originalmente producidos (C_{HC} y C_{XENOB}) o bien un ambiente al cual estaban habituados (C_{PTARCU}), se realizaron las curvas de crecimiento de los tres consorcios, con la finalidad de conocer qué tan rápida es la reactivación de los consorcios comerciales y qué tan rápida es la adaptación del C_{PTARCU} (tasa de crecimiento específica).

Por otro lado, se conoció el consorcio que mayor concentración de microorganismos obtuvo bajo las mismas condiciones tanto de operación como medio de cultivo. La hoja técnica descrita por la empresa Biomex Solutions S. de R.L de C.V. (ver Anexo 7.3) aporta información acerca del procedimiento de reactivación bacteriana.

Se efectuaron por duplicado y para cada consorcio las curvas iniciales de crecimiento microbiano; posteriormente se obtuvieron las réplicas de cada curva. Las curvas iniciales sirvieron para realizar la construcción de las curvas de crecimiento para cada consorcio, es decir, se obtuvo el conocimiento de los valores de las concentraciones de biomasa generadas en determinado tiempo (tiempo de inoculación hacia los reactores por lote, ver Tabla 3.4). En base a las curvas iniciales, las réplicas sirvieron para llevar a cabo la inoculación del cultivo microbiano generado en los biorreactores hacia los reactores por lote. Todo esto con la finalidad de inocular similares concentraciones de biomasa de los tres diferentes tipos de consorcios microbianos y así homogeneizar lo más posible todas las condiciones de tratamiento del sistema.

La reactivación bacteriana de C_{HC} y C_{XENOB} , que en un inicio se encontraban esporuladas, consiste en incubarlas en un medio que les permita desarrollarse y reproducirse. El consorcio C_{PTARCU} se tomó de la recirculación de lodos hacia el reactor biológico de la PTARCU, este consorcio se incubó en las mismas condiciones que los consorcios bacterianos comerciales sólo con la finalidad de igualar o bien homogeneizar las condiciones de trabajo de los tres consorcios en estudio.

El crecimiento microbiano fue llevado a cabo en biorreactores de 3.5 L de capacidad y el volumen de trabajo fue de 3 L. La empresa Biomex Solutions S. de R.L de C.V proporcionó los dos consorcios comerciales (C_{HC} y C_{XENOB}).

En base al formulismo empleado en dicha empresa (ver Anexo 7.3), se realizó la preparación del cultivo microbiano de cada consorcio comercial. Se pesaron como material seco y se mezclaron 13.5 g de fécula de maíz, 106 g de nutrientes (ver Tabla 3.3) y 13.5 g de consorcio bacteriano comercial.

La mezcla de los nutrientes, la fécula de maíz y del consorcio bacteriano se dividió en dos, cada una de las dos partes se adicionaron a dos bolsitas hechas de tela de nylon. Estas bolsitas son llamadas "cargas bacterianas". Este procedimiento se hizo para cada uno de los dos consorcios comerciales.

Las "cargas bacterianas" correspondientes fueron adicionadas a cada biorreactor que ya contenían 3 L de agua de la llave. La tela de nylon se empleó con el objetivo de "aislar" el soporte que es empleado para embalar a las bacterias, impidiendo de esta forma que al tomar caldo de cultivo para las posteriores inoculaciones se extrajera el soporte, alterando así la concentración de biomasa inoculada.

Para el C_{PTARCU} se incubaron 550 ml/L de sólidos sedimentables, correspondientes a 350 mg/L de SSV.

Tabla 3.3 Masa de nutrientes y fécula de maíz

Nutriente	Masa (g)	Nutriente	Masa (g)
NaCl	30.3	MgSO ₄	6.0
Na ₂ HPO ₄	21.4	ZnSO ₄	6.0
NaH ₂ PO ₄	13.4	CuSO ₄	1.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	8.0	NiSO ₄	0.13
CaCO ₃	8.0	CoSO ₄	0.13
FeSO ₄	6.0	MoSO ₄	0.13
MnSO ₄	6.0	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _x (Fécula de maíz)	13.4

El almidón o fécula de maíz es un coloide polisacárido con fórmula molecular: (C₆H₁₀O₅)_x; que es obtenido del grano de diversas variedades del *Zea mays* L, familia de las gramíneas. Las características generales de la fécula de maíz son las siguientes: polvo fino, blanco, humedad: 13 %; pH: 5 – 7 (solución al 2 %); proteínas: 0.5 %; solubilidad: 0.4 %; densidad: 1.5; gravedad específica: 1.45; fibra: 0.15 %; no presenta ningún grado de toxicidad. Es insoluble en agua fría, alcohol y éter. Si se agita en agua fría se obtiene una suspensión comúnmente llamada lechada de almidón.

La Figura 3.1 muestra la incubación de los tres consorcios microbianos. Las condiciones ambientales elegidas para llevar a cabo la incubación microbiana fueron tomadas con base en las necesidades de crecimiento que requieren las especies bacterianas especializadas en la biodegradación de compuestos derivados del petróleo (ver Anexo 7.5).



Figura 3.1 Incubación microbiana en biorreactores (de izquierda a derecha: C_{HC}, C_{XENOB}, C_{PTARCU})

Para realizar las curvas de crecimiento se empleó la técnica de peso seco debido a que la fracción volátil del total de sólidos biológicos en suspensión es usada como una aproximación de la masa biológica. Este supuesto se basa en que la fracción volátil se considera proporcional a la actividad de la masa microbiana en cuestión. Este método es utilizado para determinar la biomasa, tiene la desventaja de requerir un mínimo de 50 mg de biomasa, de ser lento y aproximado. En el presente trabajo se empleó el método de peso seco, es decir, los sólidos suspendidos volátiles (SSV) para determinar la biomasa. Para el caso de los consorcios comerciales sabemos que tienen un conteo mínimo garantizado de 3×10^9 UFC/g, por experiencia de la empresa que nos proporcionó los consorcios, se asegura que en 48 horas se alcanzan cerca de 10^{12} UFC/mL en condiciones adecuadas.

Chong et al. (1996), Sirianuntapiboon et al. (2008), Vieira et al. (2008), Rodrigues et al. (2009) y Shi et al. (2009) son algunos de los autores que han utilizado la técnica de peso seco como método indirecto de medición de biomasa.

3.4.2 Aclimatación de C_{HC} , C_{XENOB} y C_{PTARCU}

Una vez conocidas las concentraciones de SSV generadas en los biorreactores para determinados tiempos (curvas de crecimiento microbiano), se realizaron las inoculaciones de los cultivos hacia los reactores por lote, los cuales contuvieron 3 L de agua contaminada. En la Tabla 3.4 se presentan los tiempos en los que se efectuaron las inoculaciones con dos diferentes concentraciones de cada consorcio después de haber iniciado la operación de los biorreactores, los volúmenes de cultivo microbiano de cada uno de los tres consorcios inoculados hacia cada uno de los reactores por lote, así como las concentraciones de SSV equivalentes a esos volúmenes, resultando entonces un total de seis reactores.

Un reactor testigo (al que sólo se inyectó aire al igual que los demás reactores por lote) fue utilizado con fines comparativos entre el sistema de tratamiento biológico y el tratamiento fisicoquímico.

A los seis reactores se les introdujo aire mediante una bomba de pecera y difusores, el oxígeno disuelto fue mayor de 2 mg/L en los seis reactores y en el testigo. Cada reactor contó con una bomba sumergible de agua para homogeneizar la biomasa. El pH fluctuó entre 7 y 8.

La aclimatación se llevó a cabo durante 5 días (sin recambio de agua contaminada) de los tres consorcios microbianos y con las dos diferentes concentraciones inoculadas de cada consorcio. El hecho de no realizar recambio de agua contaminada o bien de no efectuar ciclos se hizo con la finalidad de saber si en algún tiempo determinado (si es que existiese) se llegase a presentar un incremento en la degradación de los parámetros de respuesta a causa de la aclimatación bacteriana. De igual forma se pudo haber conocido este tiempo realizando ciclos, sin embargo, el no hacer recambio de agua contaminada proporcionó cierta información acerca del comportamiento de los microorganismos cuando su ambiente no es renovado durante 5 días, como por ejemplo: si existe un incremento o una disminución en su población o bien un aumento o disminución repentina de la degradación de los parámetros de respuesta.

Tabla 3.4 Parámetros de las inoculaciones de los cultivos microbianos en los reactores por lote

Nomenclatura de los seis reactores por lote	Volumen inoculado, mL	Concentración de SSV en el inóculo, mg/L	Tiempo de inoculación después de iniciada la incubación, h	Carga orgánica, kg DQO/kg SSV·d
X ¹ _{HC}	25	4	0.5	128
X ² _{HC}	50	8	0.5	64
X ¹ _{XENOB}	25	4	2	128
X ² _{XENOB}	50	8	2	64
X ¹ _{PTARCU}	45	5	3	103
X ² _{PTARCU}	80	9	3	57

La concentración de biomasa inoculada fue muy pequeña, esto con el propósito de saber si una cantidad mínima de bacterias (las cuales fueron previamente incubadas en un ambiente favorecedor para su reactivación) poseen o desarrollan la capacidad de sobrevivir al ser inoculadas en un ambiente que puede llegar a ser estresante, dado que sus condiciones ambientales (temperatura, pH y sustrato) cambiaron abruptamente.

Asimismo se trabajó bajo condiciones exógenas, es decir, con cargas orgánicas altas (ver Tabla 3.4), por lo que según la base teórica de Monod el suministrar una concentración de sustrato lo suficientemente elevada con respecto a la concentración de microorganismos presentes se obtiene una tasa máxima de crecimiento. Por otro lado, la pequeña inoculación de bacterias también permite conocer las limitaciones

en cuanto a los porcentajes de remoción de los parámetros de respuesta se refiere y el tiempo que conlleva este proceso de adaptación bacteriana.

Para llevar a cabo la relación C:N:P (100:5:1) se adicionaron diversas cantidades de NH_4Cl y KH_2PO_4 según se fueran requiriendo, los cálculos se hicieron en base a los valores de carbono orgánico total medidos en el agua contaminada. Diariamente se medían tanto el nitrógeno total como el fósforo total para saber la cantidad requerida a adicionar de NH_4Cl y KH_2PO_4 .

En la Figura 3.2 se presenta un esquema de la aclimatación de los consorcios microbianos. La Figura 3.3 ilustra el sistema experimental.

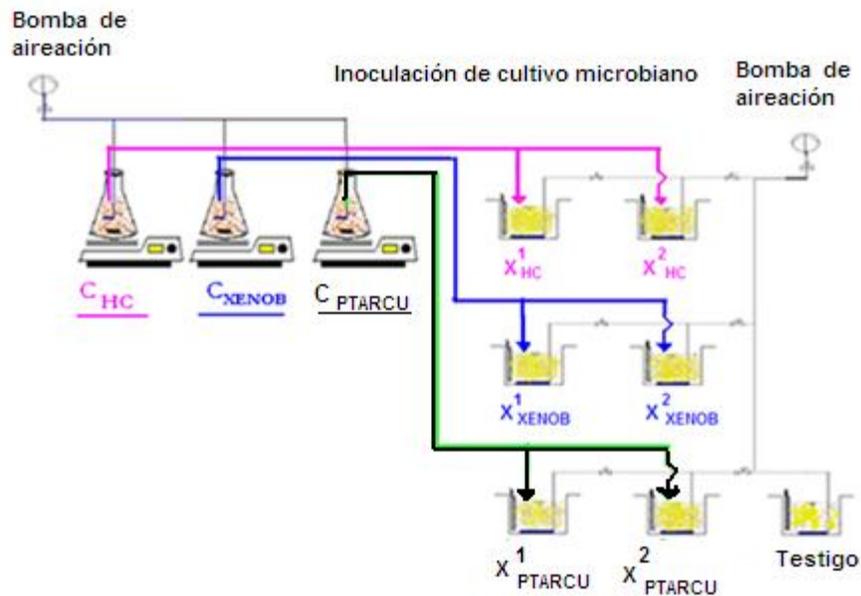


Figura 3.2 Aclimatación de los consorcios microbianos



Figura 3.3 Sistema experimental de la aclimatación de los consorcios microbianos

Transcurridos los 5 días se realizó recambio de agua contaminada durante 15 días (15 ciclos) para aumentar el crecimiento microbiano, este procedimiento sólo se llevó a cabo para los reactores que presentaron la mayor degradación de los parámetros de respuesta de cada consorcio de acuerdo al tratamiento de 5 días (X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}). Los reactores fueron alimentados diariamente con 2 L de agua contaminada, previo a cada alimentación se sedimentaba la biomasa por 1 hora; se decantaba por 30 minutos y se adicionaba el agua contaminada por otros 30 minutos, resultando el tiempo de aireación de 22 horas.

Según Moreno et al. (2004) la aclimatación de lodos activados al 4-clorofenol genera un aumento exponencial en la tasa específica de degradación. Los resultados coinciden con los presentados por Buitrón et al. (1998), donde reportaron que el aumento exponencial de la tasa de degradación del 4-clorofenol podría explicarse por una multiplicación de los microorganismos especializados. Dado que en este caso la única fuente de carbono y energía del medio fue dicho compuesto, la selección de microorganismos especializados pudo ser debida a la presión de selección ocasionada por el compuesto tóxico. Esto coincide con los resultados del análisis de la comunidad por medio de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. En este estudio se demostró que durante la aclimatación existió un aumento (multiplicación) de una población inicial pequeña de microorganismos del género *Pseudomonas*. Se concluyó que durante la aclimatación existe una selección y multiplicación microorganismos especializados en la degradación del clorofenol, en este caso *Pseudomonas* sp.

El proceso de aclimatación incrementa la actividad de los microorganismos, ya que el metabolismo de estos se especializa en el consumo de un determinado compuesto contaminante, incluso disminuyendo el consumo de un sustrato fácilmente biodegradable como por ejemplo el acetato de sodio. Este aumento en la actividad provoca que aumente la tasa específica de degradación a través de los ciclos.

3.4.3 Cinéticas de crecimiento celular y degradación

Una vez aclimatada y logrado el incremento de la biomasa de cada consorcio, se continuó con la realización de las cinéticas de degradación y crecimiento celular, para ello los reactores por lote se alimentaron con 3 L de agua contaminada, se introdujo aire con un difusor de pecera, se mantuvieron en agitación los reactores por lote usando un agitador magnético para homogeneizar el contenido. La

temperatura fue la ambiente, y se adicionaron los nutrientes NH_4Cl y KH_2PO_4 en base a los valores de carbono orgánico total medidos en el agua contaminada. El tiempo de retención hidráulico (TRH) fue igual a la duración del ciclo de dos días.

El carbono orgánico disuelto (COD) y la demanda química de oxígeno soluble (DQO_5) fueron utilizados como parámetros de respuesta. La fuente de carbono y energía, medida como COD, DQO_5 y/o la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) es generalmente considerada el sustrato limitante en los procesos biológicos aerobios. Estas tres técnicas son frecuentemente utilizadas para determinar la calidad de un efluente.

Se utilizó un analizador de carbono orgánico total (COT) para realizar las mediciones de COD y COT. El COD representa el carbono orgánico disuelto remanente en una muestra después de filtrar la misma, usando un filtro de 0.45 micrómetros.

El analizador COT oxida térmicamente un volumen de muestra a 150 °C. El CO_2 así originado corresponde al carbono inorgánico total. Posteriormente, otra porción de la misma muestra se oxida, también térmicamente, a 950 °C; el CO_2 producido equivale al carbono total (CT). El valor del COT es entonces la diferencia entre el carbono total y el inorgánico. Los compuestos orgánicos existentes en el agua que pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de alimentación son entonces medidos de manera indirecta.

La DQO_5 en este trabajo representa a la demanda química de oxígeno remanente en una muestra después de filtrar la misma, usando un filtro de 0.45 micrómetros. La DQO_5 fue elegida como parámetro de respuesta debido a que al utilizar un oxidante fuerte ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) se mide la cantidad de oxígeno consumido sin la intervención de los organismos vivos efectuando la determinación del contenido total de materia orgánica oxidable, sea biodegradable o no.

La DBO representa la cantidad de oxígeno utilizado por microorganismos heterótrofos para transformar la materia orgánica metabolizable de la muestra en H_2O y CO_2 . El análisis se realiza en condiciones aerobias, con presencia de oxígeno libre desde el comienzo al final de la prueba, midiéndose el oxígeno absorbido y expresándose el resultado en miligramos de oxígeno utilizado por litro de agua examinada.

La DBO soluble (DBO_s) en este trabajo representa a la DBO remanente en una muestra después de filtrar la misma, usando un filtro de 0.45 micrómetros. Se midió solamente al final del tratamiento por lote para determinar el índice de biodegradabilidad de la materia orgánica del agua tratada para cada consorcio.

3.5 SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL

La finalidad de la segunda etapa experimental fue realizar bioaumentación del consorcio microbiano elegido en la primera etapa. La bioaumentación del consorcio bacteriano se realizó mediante dos vías:

- (1) Inoculación directa del consorcio en el sistema SBR.
- (2) Incubación del consorcio en un biorreactor para posterior inoculación al sistema SBR.

El objetivo de efectuar los dos puntos anteriores fue conocer el comportamiento de cada sistema en relación a las remociones de los parámetros de respuesta, empleando el consorcio sin previa reactivación en condiciones adecuadas, es decir, si se realiza bioaumentación directamente al sistema SBR; o bien si se realiza bioaumentación con previa reactivación en condiciones adecuadas (utilizando un biorreactor). Asimismo estas dos opciones ofrecen una pauta para vislumbrar si las cantidades empleadas de inóculo marcan una diferencia relevante en cuanto a dichas remociones.

3.5.1 Inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR

Para efectuar la bioaumentación se construyó un reactor discontinuo secuencial (SBR). El sistema se ilustra en la Figura 3.4. En la Tabla 3.5 se muestran las características del equipo empleado. El reactor es de vidrio y cilíndrico. El volumen del reactor es de 4.5 L y el volumen de trabajo fue de 3 L.

Debido a que se pretendió igualar las condiciones de operación de los dos sistemas de tratamiento de la segunda etapa experimental se emplearon las mismas cantidades de nutrientes y de consorcio bacteriano en los dos sistemas. En el tratamiento: "Incubación del consorcio bacteriano en biorreactor para posteriores inoculaciones al SBR" se requirieron 320 g de los nutrientes, 40 g de fécula de maíz (ver Tabla 3.3) y 40 g del consorcio bacteriano comercial elegido en la primera etapa (C_{XENOB}), (ver Anexo 7.3). La

elección del consorcio fue hecha con base a la mayor degradación obtenida de los parámetros de respuesta en las cinéticas de degradación. La mezcla de nutrientes, fécula y consorcio se dividió en dos y cada parte se agregó a una bolsita de tela de nylon (en total fueron dos cargas bacterianas de 160 g de nutrientes, 20 g de fécula de maíz y 20 g de consorcio cada una).

Con la finalidad de igualar las condiciones de operación de los dos sistemas de tratamiento, se emplearon las mismas cantidades de nutrientes y de consorcio en el tratamiento: “inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR”, excepto la fécula de maíz que no se adicionó debido a que la materia orgánica contenida en el agua contaminada fue en este caso el sustrato utilizado por las bacterias. De igual manera se dividió en dos partes la mezcla resultante, cada parte se introdujo en dos bolsitas de tela de nylon, teniendo dos cargas bacterianas de 160 g de nutrientes y 20 g de consorcio cada una. Estas cargas al mismo tiempo fueron inoculadas al SBR después del llenado de agua contaminada (3 L) del primer ciclo.

Se utilizaron dos bombas peristálticas, una para la fase de llenado y la otra para la fase de decantado. Se empleó una bomba de pecera para la difusión del aire por medio de dos difusores. Relojes programables fueron usados para el control de las etapas de funcionamiento del SBR, así como de la bomba de pecera. Durante la etapa de aireación se mantuvo en agitación el SBR utilizando una parrilla de agitación. La Tabla 3.5 muestra las características del equipo empleado en el sistema de tratamiento biológico.

Tabla 3.5 Características del equipo empleado en la experimentación

Equipo	Marca	Modelo
Bomba peristáltica	Equipar	Ismatec ecoline 7802240
Bomba de pecera	Máxima·R	R.S.I 2.5
Relojes programables	Steren	TEMP-08E
Parrilla de agitación	Cimarec	8P131325

La Figura 3.4 muestra el sistema de tratamiento biológico: “inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR”



Figura 3.4 Inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR.

Debido a la transferencia de masa, la solubilidad de nutrientes y tal vez el material celular de algunas bacterias que murieron por determinadas causas se difunde cierta cantidad de esta materia orgánica e inorgánica hacia el agua, afectando todo ello en la determinación del COD y de la DQO₅. Es por ello que fue importante realizar dos pruebas testigo:

En el tratamiento: "inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR" se agregaron las dos cargas bacterianas preparadas como se explicó anteriormente al SBR pero conteniendo sólo agua de la llave. En el tratamiento: "incubación del consorcio bacteriano en biorreactor para posteriores inoculaciones al SBR" se introdujeron las dos cargas bacterianas al biorreactor para llevar a cabo la reactivación bacteriana y realizar inoculaciones posteriores de cultivo bacteriano al SBR que contuvo sólo agua de la llave. De esta manera por diferencia de los resultados de las pruebas experimentales con agua contaminada y de las pruebas con agua de la llave se obtuvieron los valores de la DQO y del COD causada sólo por degradación.

El valor promedio de las concentraciones de los sólidos suspendidos en el licor mezclado medidas en los diez días que duró el tratamiento fue de 900 g/m^3 , este dato así como los datos experimentales del agua contaminada de la ex refinería 18 de Marzo sirvieron para realizar los cálculos teóricos de diseño del sistema SBR (Metcalf, 2004). En el Anexo 7.8 se muestran detalladamente los cálculos de operación del tratamiento: "inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR".

Las condiciones de operación del sistema de tratamiento biológico se presentan en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Condiciones de operación del SBR

Condiciones operacionales	Unidad	Valor
Temperatura	° C	20 (ambiente)
pH	-	5.9 – 8.4
Oxígeno disuelto	mg/L	5.0

Las etapas de funcionamiento del sistema SBR se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Etapas de funcionamiento del SBR

Etapas	Duración de las etapas, %	Duración de las etapas, h
Llenado	6.25	1.5
Reacción	79.2	19.0
Sedimentación	8.33	2.0
Decantado	6.25	1.5

Los datos experimentales del agua contaminada bajo estudio se presentan en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8 Datos experimentales del agua contaminada

Parámetros	Concentración, g/m ³	Parámetros	Concentración, g/m ³
DBO _T	106	COT	370
DBO _s	70	COD	350
DQO _T	551	SST	34.6
DQO _s	492	SSV	10.4

Las características de diseño del SBR se muestran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Características de diseño, SBR

Características de diseño	Unidad	Valores
Profundidad de decantación	%	% de la profundidad del tanque
SVI (valor supuesto)	mL/g	70
Flujo	m ³ /d	0.003
Licor mezclado con volumen completo, X	g/m ³	900
Temperatura	°C	20

3.5.2 Incubación del consorcio bacteriano en biorreactor para posteriores inoculaciones al SBR

La incubación del consorcio bacteriano se llevó a cabo en un biorreactor, el cual es un sistema programado para mantener un control en el suministro de agua, temperatura, aireación y derrame. Las bacterias contaron con los nutrientes necesarios y el pH adecuado para lograr un crecimiento exponencial dentro del biorreactor (Rodríguez *et al.*, 2002). El cultivo bacteriano generado en el biorreactor fue repetidamente inoculado al sistema SBR (inoculaciones sucesivas).

El objetivo de realizar este tratamiento biológico es el incrementar las remociones de los parámetros de respuesta con relación a los resultados obtenidos en la primer vía experimental ("inoculación directa del consorcio bacteriano en el sistema SBR").

Realizar una sola bioaumentación puede ocasionar la disminución de la población microbiana debido al choque ya sea térmico, físico y/o químico, (llamado *choque de carga* en este estudio), es decir, el contacto inicial que se efectúa entre las células microbianas y el agua residual o contaminada provoca en ocasiones un efecto estresante, inhibitorio o en el peor de los casos la muerte de las células. Algunas mueren porque su pared celular se disuelve o se rompe, algunas otras no mueren pero tampoco realizan su actividad inmediatamente pues las condiciones del medio no llegan a ser lo suficientemente favorables, así que algunas bacterias esporulan para protegerse de las condiciones adversas.

El proceso descrito en el párrafo anterior implica una remoción inferior de los contaminantes en relación a las inoculaciones sucesivas como se observa en los resultados. La base teórica se debe a que si se aumenta la cantidad de bacterias inoculadas al sistema de tratamiento, se incrementan las probabilidades de supervivencia de las células. Por otro lado, cada sistema posee una capacidad intrínseca y limitada de mantenimiento celular, la capacidad está relacionada principalmente con la concentración y disponibilidad de sustrato, tiempo de residencia hidráulico y celular, tener un conocimiento aproximado de dichos parámetros da como resultado el mejoramiento de un sistema de tratamiento en particular.

3.5.2.1 Diseño y construcción del biorreactor para incubación del consorcio bacteriano

La geometría del tanque es importante para cualquier proceso de mezclado, siendo la óptima aquella donde el tanque es cilíndrico y vertical, ya que la energía consumida es aprovechada en mayor proporción, que utilizando cualquier otra geometría.

El biorreactor está hecho de acrílico con tapa y base de acero inoxidable, las dimensiones del biorreactor son las siguientes: 20 cm de diámetro, 6 mm de espesor del acrílico y 30 cm de longitud.

El biorreactor cuenta con dispositivos para la regulación de temperatura usando una resistencia de calentamiento hecha de acero inoxidable, la cual es controlada por medio de un pirómetro y para el registro de la temperatura se utiliza un termopar; la aeración se obtiene mediante una bomba y difusores de aireación de pecera; para lograr turbulencia dentro del biorreactor se emplea un agitador de turbina; el llenado y derrame del agua potable y del caldo de cultivo, respectivamente, son regulados mediante un relevador y un temporizador, dispositivos electrónicos de control de válvula solenoide.

El propósito de la regulación de los puntos anteriores es el siguiente:

✚ Temperatura

La temperatura a la que opera un reactor influye de manera importante en la actividad de la biomasa ya que las reacciones bioquímicas son directamente afectadas por este parámetro. Debido a que las bacterias bajo estudio son mesófilas la temperatura se fijó en 34 °C.

✚ Aireación

Con la introducción de aire por medio de una bomba de pecera y distribuido con cuatro piedras de aireación, se asegura proporcionar condiciones aerobias.

✚ Turbulencia

Es de suma importancia lograr un mezclado completo dentro del biorreactor para dispersar el aire en el agua, para obtener una temperatura y una concentración de nutrientes homogénea en todo el recipiente y para suspender los microorganismos y nutrientes sólidos.

La trayectoria del flujo en un tanque de agitación depende de las propiedades del fluido, de la geometría del tanque, del tipo de deflectores y del propio agitador. Si el propulsor va montado verticalmente en el centro del tanque sin deflectores, casi siempre se desarrolla una trayectoria de flujo tipo remolino. Esto suele ser indeseable debido a que se atrapa aire, se desarrolla un vórtice considerable y ocurren oleadas. Para lograr una agitación vigorosa con agitadores verticales, se acostumbra el empleo de deflectores. Los deflectores son bandas planas verticales, colocadas radialmente a lo largo de la pared del tanque, por lo general son cuatro deflectores, con anchuras comunes de 1/10 y 1/12 del diámetro del tanque. Su utilidad es aumentar la turbulencia y no permitir la formación de vórtice.

El impulsor de la turbina obliga al líquido a viajar en dirección radial hasta las paredes donde se divide, en una porción que fluye hacia arriba, hasta tocar la superficie para regresar hacia el propulsor, mientras la otra porción fluye hacia abajo (Geankoplis, 2007).

El diámetro de una turbina suele medir del 30 al 50 % del diámetro del tanque. Normalmente las turbinas tienen de cuatro a seis aspas. Para dispersar un gas en un líquido, el gas puede penetrar justo por debajo del propulsor de la turbina en su eje; de esa manera las paletas dispersan el gas en muchas burbujas finas. Con la turbina de hojas inclinadas, con las aspas a 45° se imparte cierto flujo axial, de modo que hay una combinación de flujos radial y axial. Este tipo es útil para sólidos en suspensión, ya que las corrientes fluyen hacia abajo y luego levantan los sólidos depositados. A menudo se emplea una turbina de hoja inclinada con sólo cuatro hojas para la suspensión de sólidos.

La presencia o ausencia de turbulencia puede correlacionarse con el número de Reynolds del impulsor N_{Re} , que se define como:

$$N_{Re} = \frac{D_a N \rho}{\mu} \quad (68)$$

Con los valores de densidad ($\rho=994.3 \text{ kg/m}^3$), viscosidad dinámica ($\mu=0.74 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$) tomadas a 34 °C y con una velocidad rotacional para mezclado de flujo vertical recomendado por Metcalf y Eddy (2004) de 0.75 rev/s se obtiene un número de Reynolds mayor de 10,000.

Las dimensiones de la turbina son las siguientes: $D_a = 0.1 \text{ m}$; $J = 1.7 \text{ cm}$; $L = 2.5 \text{ cm}$; $W = 2 \text{ cm}$; $D_t = 20 \text{ cm}$; $B = 0.2 \text{ cm}$; $C = 6.7 \text{ cm}$.

Donde:

D_a: diámetro de la turbina; **J**: ancho del deflector; **L**: longitud de paleta; **W**: ancho de la aspa; **B**: brecha o separación entre los deflectores y la pared; **C**: altura entre la base del tanque y la parte inferior de las paletas.

La reducción de tamaño de partícula se logra por la reducción del tamaño básico de las partículas de la fase sólida, como por el rompimiento de los aglomerados de partículas.

✦ Llenado y derrame

La apertura de la válvula solenoide permite la entrada de agua de la llave, y por derrame el caldo de cultivo sale del biorreactor. La Figura 3.5 muestra un esquema del biorreactor.

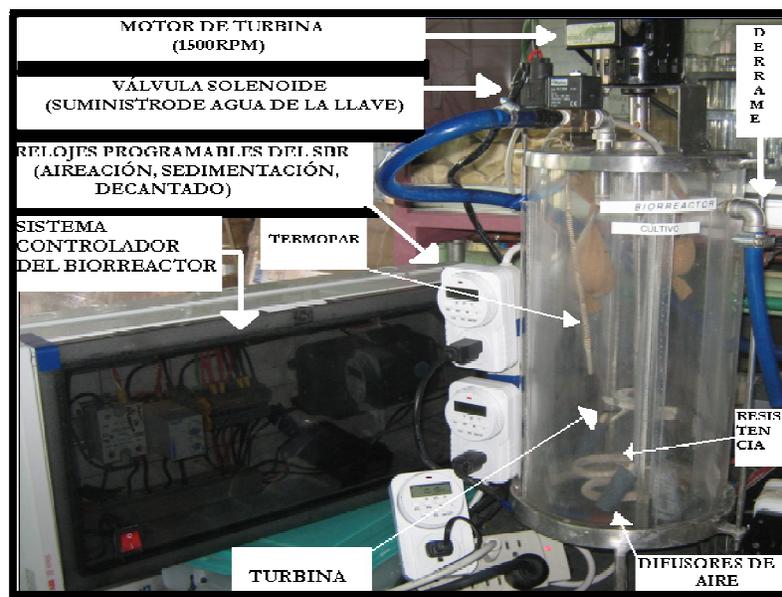


Figura 3.5 Instalación del biorreactor

Las partes del biorreactor internas son las siguientes:

- ✓ Motor. Proporciona la fuerza motriz para realizar el trabajo de mezclado.
- ✓ Flecha. Transmite la fuerza motriz a la turbina.
- ✓ Turbina. Desarrolla los patrones de flujo para la homogeneización del caldo de cultivo.

- ✓ Deflectores. La utilización de deflectores da como resultado una gran circulación de la parte superior al fondo, sin que se formen ni se ejerzan fuerzas desequilibradas del fluido sobre el eje de la turbina.
- ✓ Resistencia. Realiza el calentamiento del cultivo bacteriano.
- ✓ Difusores. Permiten la aireación en burbujas finas.

La Figura 3.6 muestra un esquema del biorreactor.

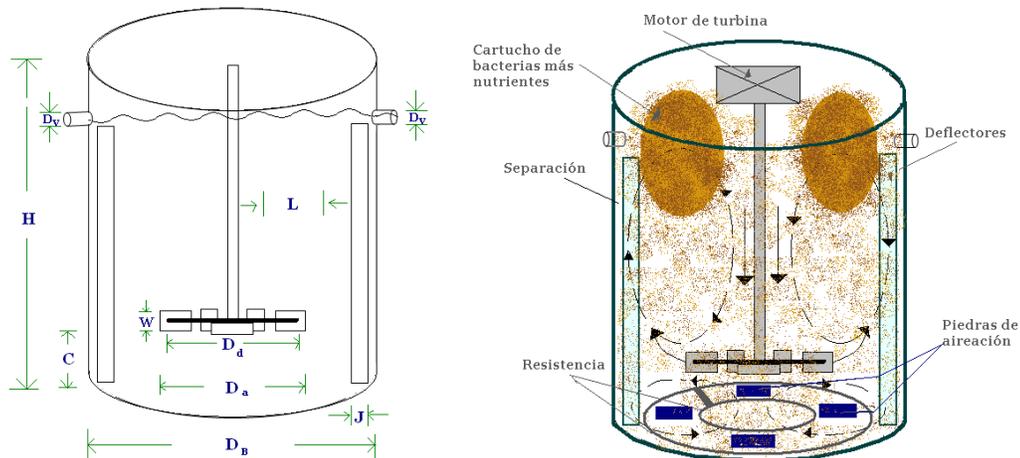


Figura 3.6 Biorreactor

Se pesaron y mezclaron 320 g de nutrientes más 40 g de fécula de maíz más 40 g de consorcio bacteriano, se dividió en dos esta mezcla y cada una de las porciones fueron introducidas en dos bolsitas hechas de tela de nylon, estas dos bolsas llamadas "cargas bacterianas", se incubaron en el biorreactor sujetándolas de la tapa posterior del mismo.

Para permitir la entrada de agua de la llave y por tanto el derrame de cultivo bacteriano del biorreactor, el relevador se programó con un tiempo de apertura de válvula solenoide de 8 segundos, el flujo resultante fue de 7.5 L/min y entonces por cada apertura de válvula se obtenía 1 L de cultivo microbiano. Se requirieron de 2 L de cultivo, por lo que después de la primera apertura se dejaba 5 minutos cerrada la válvula antes de volverla a abrir. Los 2 L se centrifugaban a 150 rpm empleando una centrífuga marca Heraeus-Caris, modelo Criofuge 6-6; por decantación se obtenía sólo la biomasa; la cual era posteriormente inoculada al SBR. Las condiciones de operación del biorreactor se presentan en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10 Condiciones de operación del biorreactor

Condiciones operacionales	Unidad	Valor
Temperatura	° C	34
pH	-	6.5 – 8.3
Oxígeno disuelto	mg/L	5 – 6
Número de cargas bacterianas	-	2
Velocidad rotacional de la turbina	rpm	1500

La Figura 3.7 muestra la reproducción bacteriana que se efectúa inmediatamente en el biorreactor.



Figura 3.7 Incubación de C_{XENOB} en el biorreactor

Con la apertura de la válvula solenoide se permite el paso del agua de la llave y por tanto se derrama el cultivo bacteriano, así que por rebalse se mantiene el volumen constante. El caudal de salida contuvo las células, medio de cultivo parcialmente agotado y eventualmente algún producto.

3.5.2.2 Tratamiento biológico en el sistema SBR empleando un biorreactor

Las condiciones de operación y las etapas de funcionamiento del SBR en el presente tratamiento fueron las mismas que las mostradas en las Tablas 3.6 y 3.7 respectivamente. Las características de diseño del SBR se muestran en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11 Características de diseño, SBR

Características de diseño	Unidad	Valores
Número de tanques	-	1
Profundidad de decantación	%	90 % de la profundidad del tanque
SVI (valor supuesto)	mL/g	66
Flujo	m ³ /d	0.003
Licor mezclado con volumen completo, X	g/m ³	1,667
Temperatura	°C	20

Una vez puesta en marcha la operación del biorreactor y por tanto la producción del caldo de cultivo bacteriano se llevaron a cabo las inoculaciones pertinentes hacia el SBR. Se realizaron un total de seis inoculaciones de biomasa centrifugada, la Tabla 3.12 presenta los valores de las seis concentraciones de SST y SSV generados en el biorreactor e inoculados al SBR. La primera y segunda inoculación se efectuó a la primera y segunda hora respectivamente, la tercera y cuarta inoculación se llevaron a cabo a las 22 y 23 horas respectivamente y, finalmente la quinta y sexta inoculación se realizaron a las 44 y 45 horas respectivamente después del arranque de operación del biorreactor.

Tabla 3.12 Concentración de biomasa inoculada al SBR

Tiempo, h	SST, mg/L	SSV, mg/L	Tiempo, h	SST, mg/L	SSV, mg/L
1	545	385	23	443	394
2	545	400	44	406	334
22	451	389	45	365	319

En el SBR el valor promedio de las concentraciones de los sólidos suspendidos en el licor mezclado (SSLM) medidos en los 10 días que duró el tratamiento fue de 1667 g/m³, este dato así como los datos presentados en las Tablas 3.7, 3.8 y 3.11 sirvieron para realizar los cálculos teóricos de diseño del SBR (Metcalf, 2004). En el Anexo 7.8 se muestran detalladamente los cálculos de operación del tratamiento: “incubación del consorcio bacteriano en un biorreactor para posteriores inoculaciones al sistema SBR”.

La diferencia fundamental entre los dos sistemas de tratamiento biológico de la segunda etapa experimental es que en el estudio de inoculaciones sucesivas se realizó bioaumentación con previa reactivación bacteriana llevada a cabo en un biorreactor y en el estudio de inoculación directa el consorcio bacteriano es adicionado al SBR sin previa reactivación. Las cantidades de nutrientes y de consorcio fueron

las mismas para los dos sistemas, por otro lado, la fécula de maíz fue usada como sustrato al ser adicionada al biorreactor en el estudio de inoculaciones sucesivas, en el estudio de inoculación directa no se adicionó la fécula ya que el agua contaminada contuvo el sustrato requerido por las bacterias. Así que la forma de llevar a cabo la bioaumentación por las dos vías implicó la generación de las dos diferentes concentraciones de SSTLM de los dos sistemas de tratamiento biológico, todo ello se vio reflejado en los diferentes porcentajes de remoción de los parámetros de respuesta.

El SBR es el mismo que el utilizado en el estudio: "inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR". En la Figura 3.8 se muestra el sistema de tratamiento "incubación del consorcio bacteriano en biorreactor para posteriores inoculaciones en SBR".



Figura 3.8 Incubación del consorcio en biorreactor para posteriores inoculaciones en SBR

En la Figura 3.9 se observa la biomasa en el SBR (fase de sedimentación).



Figura 3.9 Biomasa sedimentada en SBR

Para conocer el número de bacterias viables que se estuvieron generando en el biorreactor, así como las que se inoculaban en el SBR, se realizó conteo en placa por ser un método de medición de biomasa que permite recuento de células viables. Una célula viable es aquella capaz de reproducirse para dar origen a una descendencia (cada célula viable da origen a una colonia), la forma para realizar el conteo es determinando un número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido. Las unidades son: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro de muestra (UFC/mL) (Madigan, 2004).

Se empleó medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína (TSA) para realizar el conteo, ya que reúne las condiciones fisicoquímicas específicas de actividad de agua, pH y potencial de óxido-reducción (Analytical Profile Index. API – Biomérieux, Francia, API 20 NE y BBL Crystal Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID y Gram-Positive ID).

En la Figura 3.10 se presenta en forma esquemática la metodología utilizada en el presente trabajo.

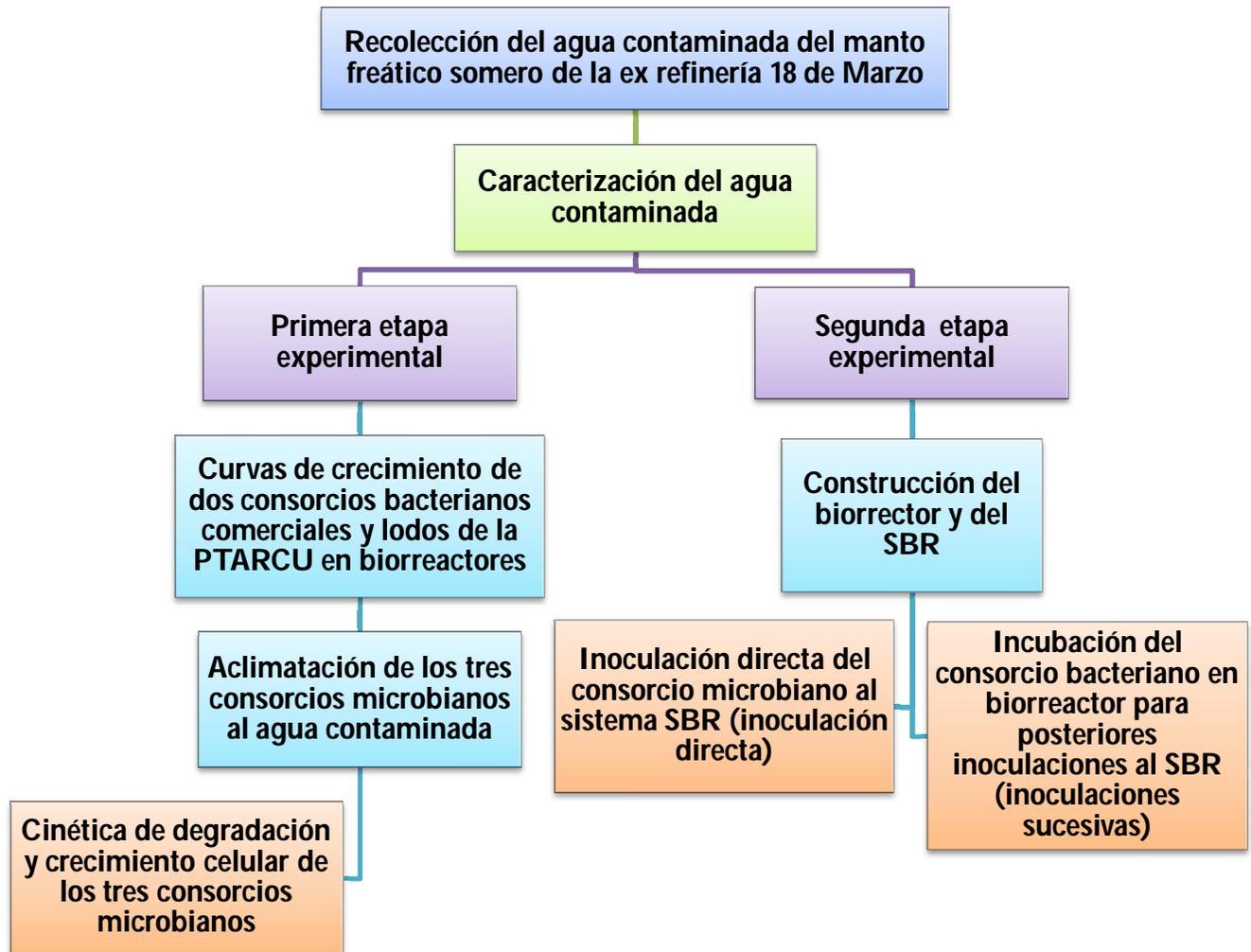


Figura 3.10 Diagrama general de actividades realizadas

4.1 RECOLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AGUA CONTAMINADA

Las Figuras 4.1 y 4.2 muestran la recolección del agua contaminada de la ex refinería 18 de Marzo.



Figura 4.1 Zanja del polígono ZV5



Figura 4.2 Recolección del agua

De acuerdo a los estudios realizados por Aguilar (2005) se identificaron tres grupos de hidrocarburos, presentes en el subsuelo de la ex refinería Azcapotzalco en el área localizada al surponiente de la denominada Aula Magna: Aromáticos polinucleares (PAH), hidrocarburos monoaromáticos (BTEX) e

hidrocarburos de aceite mineral (HC). El autor determinó que estos hidrocarburos pudieron afectar los acuíferos subyacentes.

Los procesos principales que afectan a la fase disuelta incluyen advección, dispersión, fenómenos de adsorción-desorción, transformaciones biológicas y químicas y cerca del nivel freático volatilización. Todos estos mecanismos con excepción de la advección tienden a disminuir las concentraciones de los hidrocarburos en fase acuosa (procesos de atenuación natural).

En las figuras anteriores se aprecia la contaminación del suelo, se observa el contraste de coloración de las paredes que contienen la zanja, cuya profundidad es de 3 m. Al existir discontinuidades-heterogeneidades en el sitio contaminado se presentan rutas de migración preferencial es por donde pueden migrar los contaminantes hacia los acuíferos subyacentes por efecto de la variación del nivel freático.

La presencia de hidrocarburos en fase libre flotando sobre el nivel del manto freático somero se observa más notoriamente en las orillas de la zanja excavada, corroborando con ello la migración de los hidrocarburos residuales de las zonas saturadas hacia el agua por contacto directo, presentándose así un potencial mayor de contaminación hacia el acuífero.

Cuando se realizó la recolección del agua se pudo percibir que ésta tenía olor a hidrocarburos, indicando la presencia de estos en fase acuosa; además el agua era de tonalidad verde, indicando con ello la presencia de organismos fotolitoautótrofos (algas); por otro lado, se observó un burbujeo suave en el manto freático síntoma de la realización de digestión anaerobia.

Sin embargo no sólo los procesos de acidogénesis y metanogénesis están involucrados, existen muchos procesos simultáneos en un sistema en donde se tiene principalmente la presencia de sustrato, nutrientes, luz solar, condiciones tanto aerobias, microaerobias, anóxicas y anaerobias.

Por lo que en el medio ambiente diferentes tipos de microorganismos se encuentran conviviendo, este hecho determina el establecimiento de una serie de interacciones que posee diversos grados de complejidad. Las relaciones entre poblaciones mixtas pueden ser favorecedoras, perjudiciales o indiferentes.

La Tabla 4.1 contiene la caracterización del agua contaminada del manto freático somero de la ex refinería 18 de Marzo.

Tabla 4.1 Caracterización del agua contaminada

Parámetro	Unidad	Valor	Parámetro	Unidad	Valor
pH	-	5.9	SST	mg/L	34.6
GyA	mg/L	2,616	SSV	mg/L	10.4
DQO total	mg/L	513	Fenoles	mg/L	ND
DQO soluble	mg/L	492	COT	mg/L	370
DBO total	mg/L	106	COD	mg/L	350
DBO soluble	mg/L	70	Conductividad eléctrica	μS	818
TKN	mg/L	ND	Benceno 1-metil-2-(2-propenil)	μg/L	8.45
NH ₄ -N	mg/L	ND	Tolueno	μg/L	3.97
Fósforo total	mg/L	0.21	O, p-Xileno	μg/L	2.69

ND: No Detectado

Debido a que la zanja tenía una profundidad aproximada de 3 m existían condiciones anaerobias por lo que es posible que el valor del pH ligeramente ácido se atribuya a la presencia de una población menos elevada de bacterias metanogénicas con respecto a las bacterias acidogénicas. Las metanogénicas al poseer un metabolismo más lento que las acidogénicas no consumen de manera proporcional los ácidos grasos volátiles que las acidogénicas producen, por lo que el pH tiende a ser ácido.

Otra posible aunque menos probable explicación de este hecho es que cerca de la superficie del agua existen condiciones microaerobias provocando con ello la generación de CO₂ y la consecuente generación de ácido carbónico debido a la oxidación de la materia orgánica.

Cabe también mencionar que Bennett et al. (1993) encontraron que en áreas contaminadas con hidrocarburos en donde se presenta biodegradación, la variación de pH depende de los principales compuestos inorgánicos presentes en el sitio en cuestión.

La diferencia entre la DQO total (DQO_T) y la DQO soluble (DQO_S) es mínima (21 unidades), indicando con ello que la mayoría de los compuestos contaminantes contenidos en la muestra de agua son solubles.

Este hecho pudiera ser favorecedor para un proceso biológico, dado que las bacterias heterótrofas invierten una cantidad menor de energía al prescindir del proceso de hidrólisis.

La diferencia entre la DBO_T y la DBO_5 es un poco mayor (36 unidades) con respecto al caso anterior. Como se explicó anteriormente y con base en estos valores, el gasto energético realizado por las bacterias tiende a ser menor en relación a que si se hubiese tenido una mayor diferencia entre las concentraciones de DQO_T con DQO_5 y DBO_T con DBO_5 .

Por otro lado, la relación DBO_5/DQO proporciona un indicativo de que tan biodegradable son los componentes presentes en un agua contaminada. Según Metcalf (2004) esta relación para un agua residual municipal está en un rango de 0.3 a 0.8. Si la relación está por arriba de 0.5, el agua es considerada fácilmente tratable por medios biológicos. Si esta relación está por debajo de 0.3, el agua puede contener algunos componentes tóxicos o la aclimatación de los microorganismos puede ser requerida. Este valor resultó ser de 0.21 para DBO_5/DQO_T . Lo cual indica que la biodegradabilidad del agua es baja.

El valor reportado de la conductividad eléctrica puede deberse a la biodegradabilidad existente en sitio de los hidrocarburos que genera principalmente ácidos orgánicos y ácido carbónico, estos ácidos pueden en cierta medida disolver algunos minerales presentes en los suelos de las zonas contaminadas con compuestos orgánicos, produciendo un frente de ácidos lixiviables, los cuales fueron periódicamente transportados por el gradiente hidráulico abajo, generando valores elevados de este parámetro.

La concentración de los SSV fue muy baja, indicando con ello que la presencia de biomasa fue apenas perceptible. En cuanto a los BTEX se refiere, el benceno no se encontró puro sino en forma de benceno 1-metil-2-(2-propenil), no se detectó la presencia de etilbenceno y el meta xileno tampoco fue detectado.

La concentración de grasas y aceites en la muestra de agua es considerable y superior a la DQO_T . Al emplear un oxidante fuerte con ácido sulfúrico bajo digestión, una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados en el análisis de la DQO , sin embargo, este parámetro es cinco veces menor que el de GyA, esto puede ser debido a que no todos los compuestos medidos como grasas y aceites lograron ser oxidados mediante esta técnica.

Los resultados de laboratorio de los hidrocarburos monoaromáticos (BTEX) reportados por Aguilar (2005) de ocho muestras de agua subterránea de los piezómetros instalados en diversas zonas de la ex

refinería 18 de Marzo muestran una concentración de benceno de 890 µg/L en el piezómetro BN1 el cual se encontró instalado a una profundidad de 10.9 m por debajo del nivel de piso en la parte inferior del acuífero delgado. El etilbenceno sólo se encontró en el piezómetro BN1 con una concentración de 14.6 µg/L, mientras que el tolueno se encontró en el piezómetro BN1 con una concentración de 13.7 µg/L. Los valores correspondientes de DTeO para benceno, tolueno y etilbenceno son: 2.74 mgO₂/L, 0.043 mgO₂/L y 0.043 mgO₂/L respectivamente. No se detectaron hidrocarburos aromáticos polinucleares (PHA) ni compuestos fenólicos en el agua subterránea en las zonas no contaminadas.

El valor de la DQO_s del agua contaminada frente a la DTeO del benceno, tolueno y xileno es muy superior, así que estos compuestos no participan en dicho parámetro. La concentración de grasas y aceites es el mayor valor obtenido de los parámetros medidos en la caracterización del agua contaminada, por lo que es de suponerse que dicho parámetro sea el que mayor contribución tuvo en la DQO. El benceno, tolueno y xileno no se detectaron ni durante el tratamiento biológico ni al final de cada ciclo. La razón de ello puede deberse a que el reactor no estaba herméticamente cerrado, por lo que se sospecha que se volatilizó, sin embargo, además de la volatilización no se descarta la idea de que las bacterias pudieron haber degradado una fracción de estos compuestos.

4.2 PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL

La primera etapa experimental consiste en la realización de curvas de crecimiento de los tres consorcios microbianos, de la aclimatación de estos y de las cinéticas de degradación y crecimiento celular, esto con el propósito de obtener información acerca del comportamiento microbiano de dos consorcios bacterianos previamente entrenados a compuestos derivados del petróleo y del consorcio microbiano obtenido de la PTARCU, todo ello converge en la selección de un consorcio microbiano, el que mayores remociones de los parámetros de respuesta obtenga para llevar a cabo bioaumentación en la segunda etapa experimental.

4.2.1 Curvas de crecimiento microbiano

En la Figura 4.3 se aprecian las “cargas bacterianas”, se observa el crecimiento de las películas bacterianas alrededor de la tela de nylon que contuvieron a los consorcios comerciales.



Figura 4.3 Biopelícula creciendo en las "cargas bacterianas"
De izquierda a derecha: C_{HC} , C_{XENOB}

Los sólidos sedimentables de cada cultivo son diferentes en cuanto a color y consistencia, los sólidos del C_{HC} son más compactos que los otros dos. Los sólidos de C_{PTARCU} son más esponjosos y más oscuros.

La Figura 4.4 muestra los sólidos sedimentables de los tres consorcios microbianos en conos imhoff.

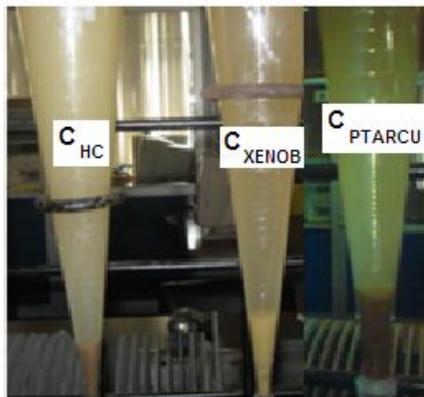


Figura 4.4 Sólidos sedimentables de los tres consorcios microbianos

El hecho de que los sólidos sean más compactos para C_{HC} y C_{XENOB} que para C_{PTARCU} es debido a que los dos primeros consorcios efectivamente están elaborados por especies bacterianas, la sedimentabilidad de las bacterias es mayor que para organismos como los flagelados, los ciliados, las vorticelas, y otros microorganismos presentes en cultivos mixtos.

La Figura 4.5 muestra el crecimiento de cada uno de los tres consorcios microbianos.

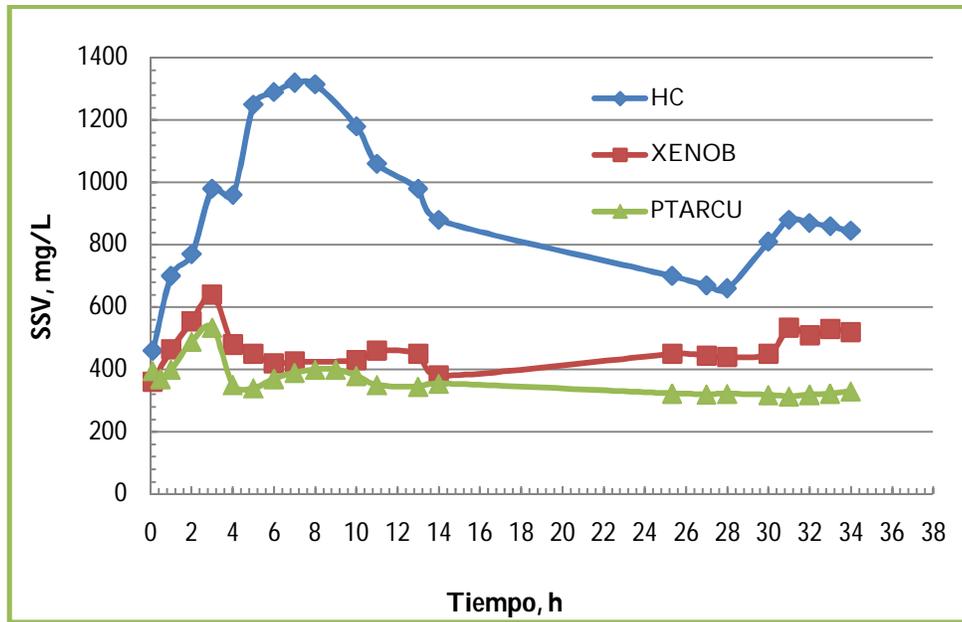


Figura 4.5 Curva de crecimiento C_{HC}

La curva de crecimiento C_{HC} indica que la fase logarítmica o exponencial comienza desde el momento de incubar el consorcio hasta las 5 horas. La fase de latencia no se logra apreciar debido a que sucede muy rápidamente. La fase estacionaria sólo permanece por 3 horas comenzando entonces la fase de muerte a las 7 horas. Pasadas las 28 horas se vuelve a presentar el mismo fenómeno de crecimiento exponencial pero en menor concentración. La razón de este fenómeno es el crecimiento crítico, es decir, que los microorganismos tienen que metabolizar su propio protoplasma sin reposición de éste pues la concentración del sustrato disponible se encuentra al mínimo. Durante esta fase, se presenta el fenómeno de lisis, según el cual los nutrientes que quedan en las células muertas se difunden en el medio proporcionando alimento a las células vivas existentes.

La tendencia de la curva de crecimiento de C_{XENOB} es similar a C_{HC} , sin embargo, la concentración y el tiempo de la fase exponencial es diferente. Para C_{HC} la concentración de 500 mg/L se alcanza casi inmediatamente después de haber incubado y para C_{XENOB} la concentración de 640 mg/L se logra 3 horas después y además es la máxima concentración de SSV de la curva, no así para C_{HC} en donde la concentración máxima es de 1300 mg/L de SSV. La fase de muerte es menos pronunciada para C_{XENOB} . El crecimiento crítico es poco perceptible, ocurre a las 10 horas y sólo persiste 1 hora.

Se observa la misma tendencia de crecimiento del C_{PTARCU} con respecto a los dos anteriores. Se incubaron 550 ml/L de sólidos sedimentables, correspondientes a 350 mg/L de SSV. La máxima concentración de SSV alcanzada fue de 535 mg/L.

La Tabla 4.2 muestra las rapidez específicas de crecimiento (μ) de los tres cultivos microbianos calculadas en las tres primeras horas de crecimiento. La fase de crecimiento de C_{HC} permanece por 7 horas, sin embargo, la μ se calcula hasta las 3 horas con la finalidad de homogeneizar el tratamiento de los datos.

Los valores de μ indican que el C_{HC} es el que mayor crecimiento obtuvo con respecto al C_{XENOB} , el cual fue el segundo consorcio que mayor crecimiento presentó.

Pese a que los tres consorcios fueron incubados bajo las mismas condiciones (temperatura, pH, medio nutritivo y oxígeno disuelto) el C_{HC} presenta un crecimiento exponencial mucho más acelerado y en un mayor tiempo que los otros dos. Al contener cada consorcio comercial diferentes cepas bacterianas y en diferente proporción, es posible que los microorganismos aprovechen de diferente manera el sustrato disponible. Por lo tanto, la fuente de carbono resultó ser más a fin para C_{HC} .

Tabla 4.2 Cálculo de μ en 3 horas de crecimiento exponencial

Cultivo microbiano	μ ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
C_{HC}	0.243
C_{XENOB}	0.196
C_{PTARCU}	0.172

Aunque las condiciones de incubación parecieran ser favorables para lograr la reproducción óptima de los microorganismos de la PTARCU, al modificar radicalmente sus condiciones ambientales, su inhibición es inminente pero temporal, influyendo de esta manera en su crecimiento en la fase exponencial. En un inicio no presentan la capacidad de adaptarse a esta nueva fuente de carbono.

La identificación microscópica de cada consorcio se presenta en las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8.

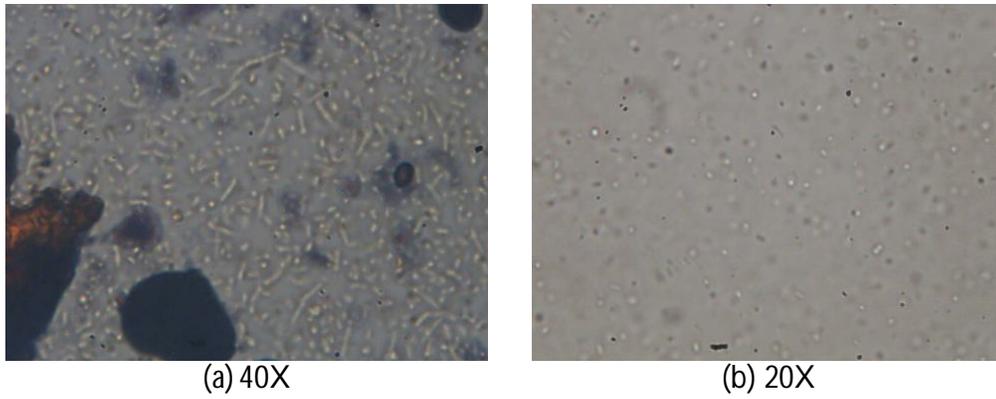


Figura 4.6 C_{HC}

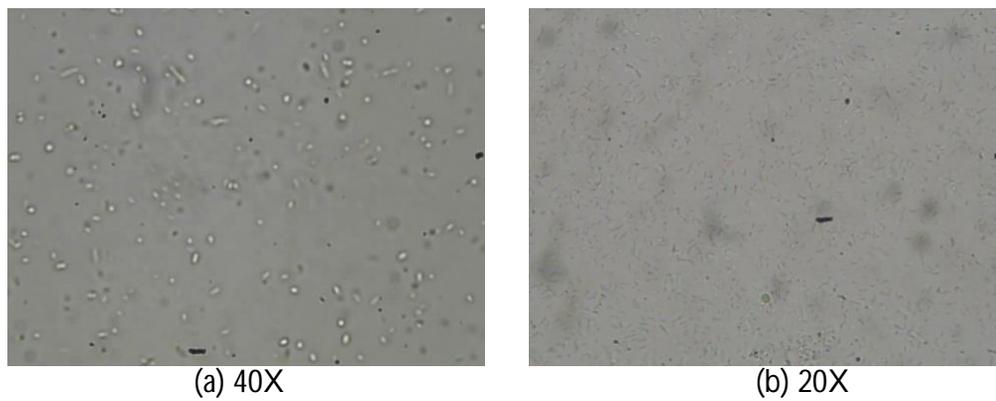


Figura 4.7 C_{XENOB}

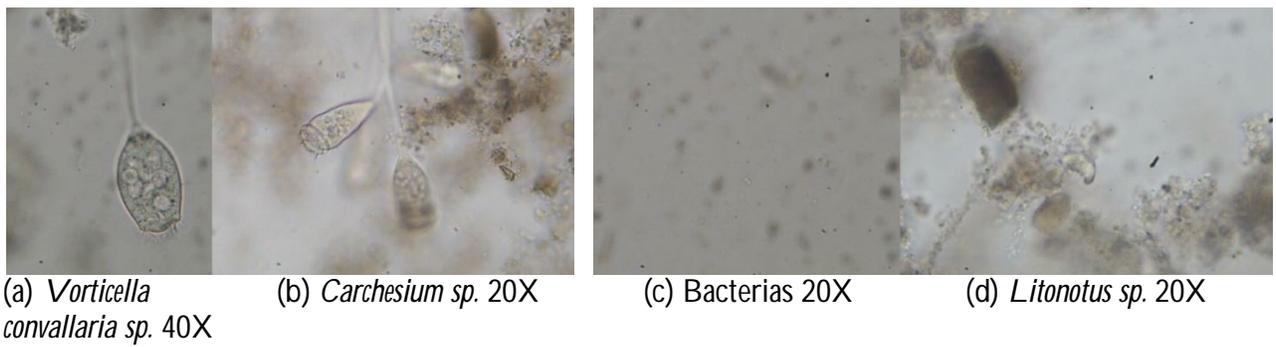
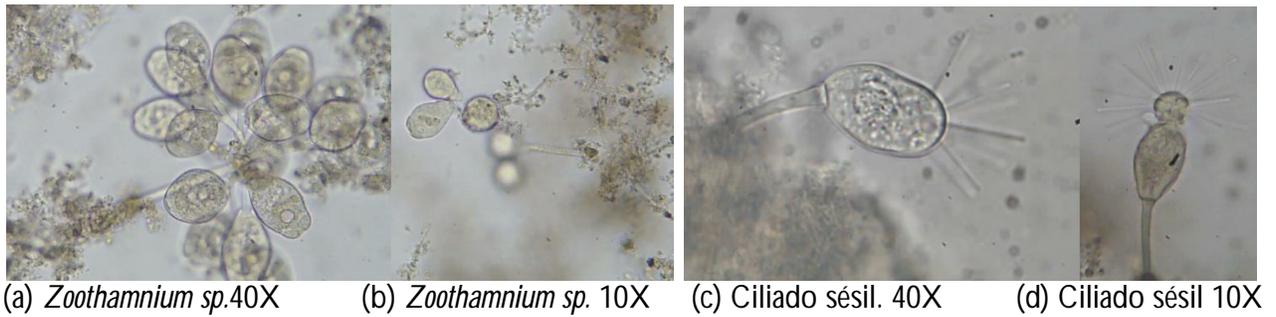


Figura 4.8 C_{PTARCU}

La Figura 4.6 muestra principalmente bacilos, aunque los cocos también están presentes. Lo que predomina en la Figura 4.7 son los cocos. En ninguna de las Figuras 4.6 y 4.7 se observaron protozoos o algún otro tipo de microorganismo distinto a las bacterias. Algunas de las características de los microorganismos encontrados en el C_{PTARCU} se mencionan a continuación:

El *Zoothamnium* sp. es un protozoo ciliado colonial, fijo mediante un pedúnculo contráctil, con mionema continuo. La *Vorticella convallaria* sp. es un protozoo solitario, fijo al sustrato mediante pedúnculo contráctil. La célula tiene forma de campana invertida. Habita medios con cierta cantidad de materia orgánica y se desarrolla en sistemas de lodos activados cuando su funcionamiento es estable. La *Carchesium* sp. es un protozoo colonial, que se fija mediante un pedúnculo contráctil. Los mionemas son discontinuos, cada ramificación con sus individuos se contrae de forma independiente. El *Litonotus* sp. es un protozoo ciliado depredador que se alimenta de pequeños flagelados y ciliados.

La interacción entre los protozoos y las bacterias se basa en que los protozoos consumen y limitan la población bacteriana en una relación depredador-presa, permitiendo mantener un balance dinámico en la población microbiana. Aunque existe la posibilidad de una siembra seleccionada en ciertos casos de tratamientos, se debe considerar casi siempre que existen poblaciones mixtas o poblaciones microbianas heterogéneas que son usualmente una mezcla muy compleja de diferentes géneros y especies de bacterias, hongos y protozoarios.

Los resultados del tratamiento biológico aplicado al agua contaminada de la ex refinería 18 de Marzo utilizando dos consorcios bacterianos comerciales y lodos de la PTARCU en reactores por lote se muestran en las Figuras 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12, los parámetros de respuesta fueron la DQO₅ y el COD. Los datos representados en las figuras ya fueron ajustados a los valores obtenidos del testigo, de tal forma que sólo se muestran las remociones causadas por acción microbiana.

Una hora después de haber realizado la inoculación de los cultivos microbianos hacia los reactores por lote, se corroboró la supervivencia de los tres consorcios inoculados al observarlos en microscopio, sin embargo, las remociones obtenidas de los parámetros de respuesta no fueron mayores al 35 % con cualquiera de los tres consorcios, por lo que, para aumentar estas remociones se deduce que es necesario aumentar la concentración de la biomasa al realizar aclimatación permitiendo el transcurso de un periodo de tiempo con recambio de agua contaminada (reactor por lote alimentado).

4.2.2 Aclimatación de C_{HC} , C_{XENOB} y C_{PTARCU}

En la Figura 4.9 se presenta la variación de DQO_s y en la Figura 4.10 se muestra el porcentaje de remoción de DQO_s para X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} y X^2_{PTARCU} .

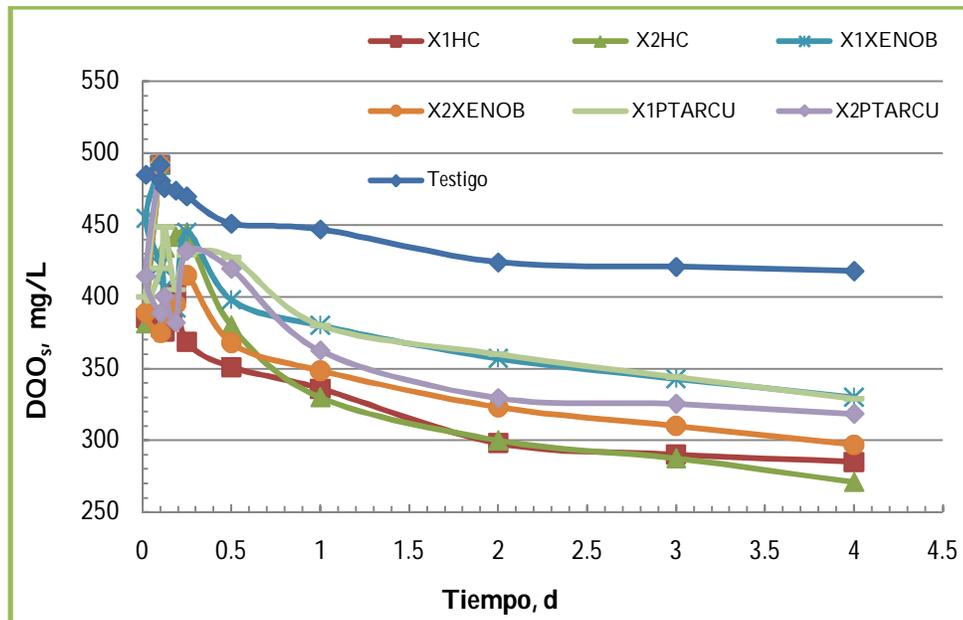


Figura 4.9 Variación de DQO_s en los reactores: X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} y X^2_{PTARCU}

Las mediciones de la DQO_s antes de 6 horas varían considerablemente, esto se debe a que al realizar la inoculación del cultivo algunos microorganismos no sobreviven al cambio brusco de ambiente, es posible que se rompa su membrana celular y su contenido se disperse en el medio, algunos otros microorganismos que si sobrevivieron se alimentan de este contenido proteínico y por ende se reproducen aumentando con ello las posibilidades de incrementar su población.

Por otro lado, otros microorganismos no consumen este material porque se alimentan del sustrato que el agua ya contiene: compuestos orgánicos; tal vez estos compuestos no sean consumidos inmediatamente, pues las bacterias requieren de un tiempo para sintetizar las enzimas necesarias para fragmentar o romper los compuestos y de esta forma tomarlos como fuente de alimento, una vez transcurrido el tiempo los compuestos fragmentados ya pueden ser tomados como sustrato de una manera más fácil.

Todo ello conlleva una variación en la DQO_s porque por un lado el contenido proteínico que aportan los microorganismos que no sobrevivieron no es detenido en el papel filtro fibra de vidrio, cabe mencionar que este aporte en la DQO_s debe ser muy bajo, pues la concentración inoculada de microorganismos al sistema de reactor por lote fue muy baja. Por otro lado, el fragmentar los compuestos orgánicos implica variaciones o cambios en el sistema que son medidas por la DQO_s , una vez transcurrido el tiempo se estabiliza esta síntesis enzimática y el consumo de sustrato se torna más estable, esta tendencia aunque de manera lenta comienza después de las 12 horas de la inoculación.

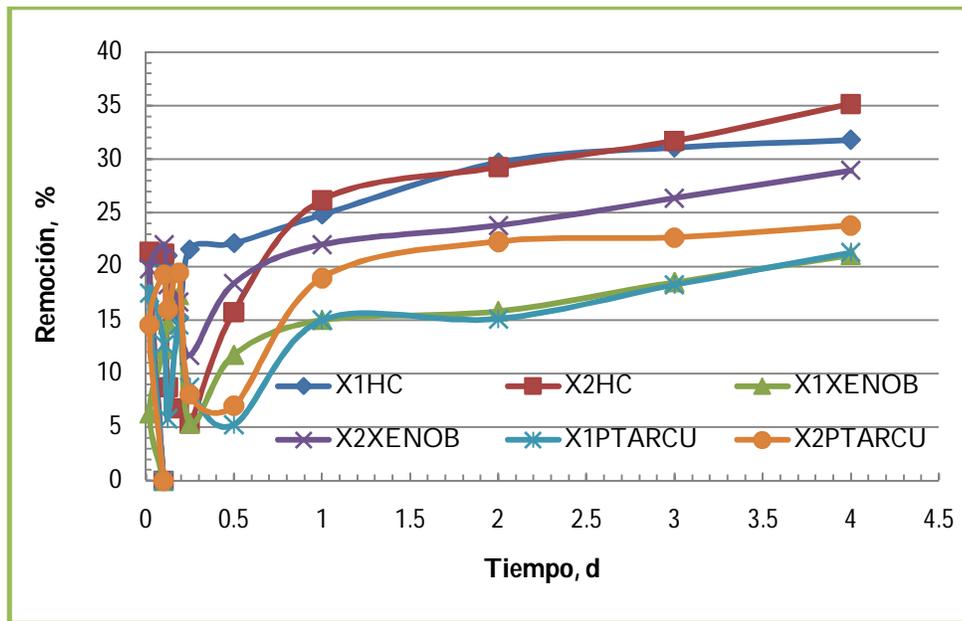


Figura 4.10 Remoción de DQO_s en reactores: X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} y X^2_{PTARCU}

A lo largo de 4 días de tratamiento biológico en sistema de reactor por lote no se observa un cambio apreciable de remoción de los parámetros de respuesta de los tres consorcios. No obstante el X^2_{HC} es el que se despega un poco más de los otros consorcios con 35 %, seguido del X^1_{HC} con 32 % y X^2_{XENOB} con 29 %. Sin embargo, después de 4 días no se tienen los suficientes argumentos para decidir qué consorcio debe ser elegido para poder efectuar el tratamiento biológico en el sistema SBR.

En la Figura 4.11 se presenta la variación de COD y en la Figura 4.12 se muestra el porcentaje de remoción de COD para X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} y X^2_{PTARCU} .

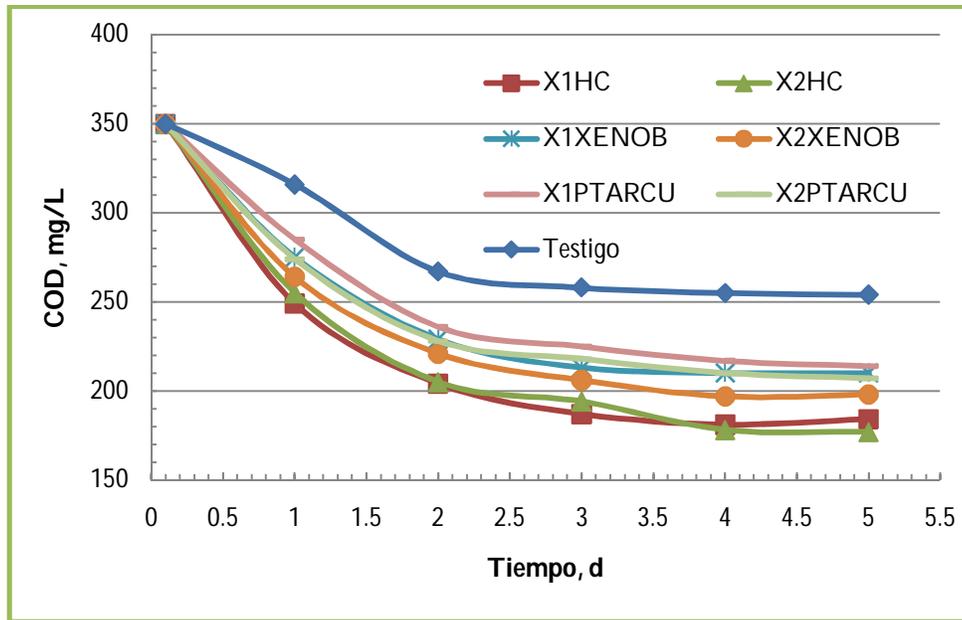


Figura 4.11 Variación de COD en los reactores: X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} y X^2_{PTARCU}

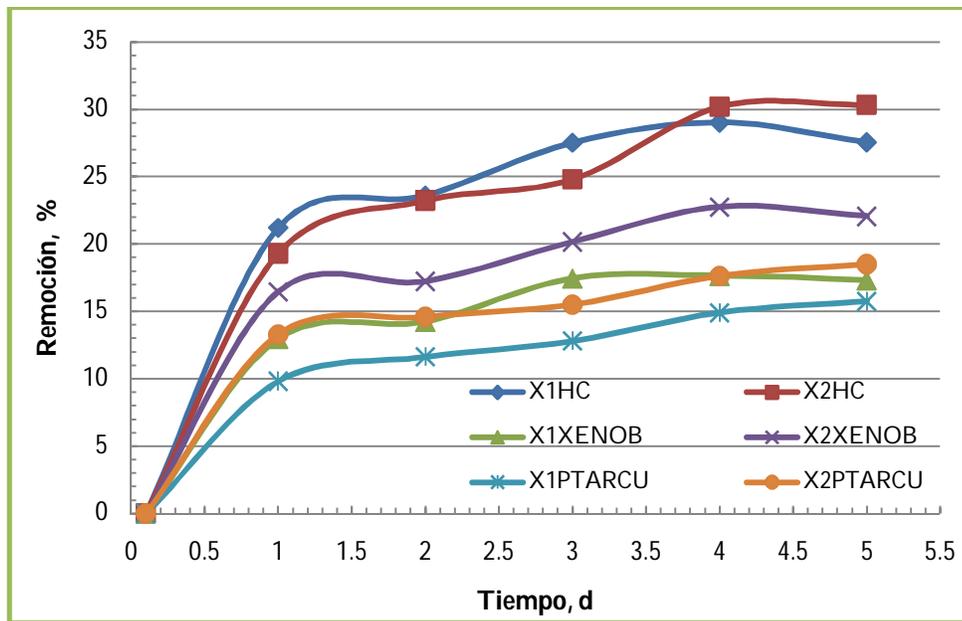


Figura 4.12 Remoción de COD en reactores: X^1_{HC} , X^2_{HC} , X^1_{XENOB} , X^2_{XENOB} , X^1_{PTARCU} y X^2_{PTARCU}

La disminución de COD por parte de algún consorcio no es significativa, por lo que con este parámetro de respuesta tampoco se está en condiciones de seleccionar algún consorcio.

Las concentraciones de biomasa inoculadas a los reactores por lote en relación a la concentración de sustrato biodegradable presente en el agua contaminada requirió de 4 días para alcanzar los siguientes

porcentajes máximos de remoción de COD: 30 % con X^2_{HC} , 28 % con X^1_{HC} , y 22 % con X^2_{XENOB} . Estos bajos porcentajes de remoción hacen imperioso el recambio de agua contaminada en los reactores para permitir el desarrollo y crecimiento microbiano dado que en las Figuras 4.9 y 4.11 se observa que en el último día de tratamiento las curvas disminuyen muy lentamente, la razón de este comportamiento pudo deberse a la estabilidad del sistema.

Para incrementar la concentración de biomasa (aproximadamente 320 mgSSV/L de cada consorcio), los reactores por lote: X^2_{HC} , X^2_{XENOB} y X^2_{PTARCU} se alimentaron diariamente durante 15 días, pues al realizar alimentaciones sucesivas de agua contaminada (reactor por lote alimentado) se proporciona el sustrato requerido para el crecimiento celular. Las Figuras 4.13 y 4.14 presentan las variaciones de los parámetros de respuesta en cada uno de los ciclos, la duración del ciclo fue de 24 horas.

La variación de DQO_5 en los tres reactores fue lenta y gradual. A lo largo de quince ciclos se aprecia que el X^2_{XENOB} fue el consorcio que degradó un poco más la DQO_5 con respecto a los otros dos consorcios.

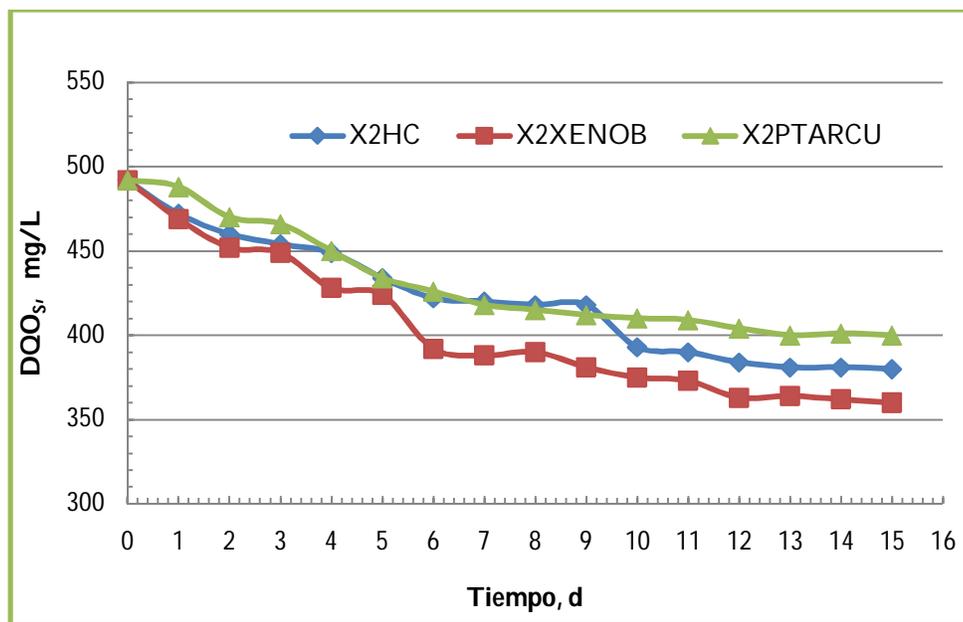


Figura 4.13 Variación de DQO_5 en cada ciclo del recambio de agua contaminada

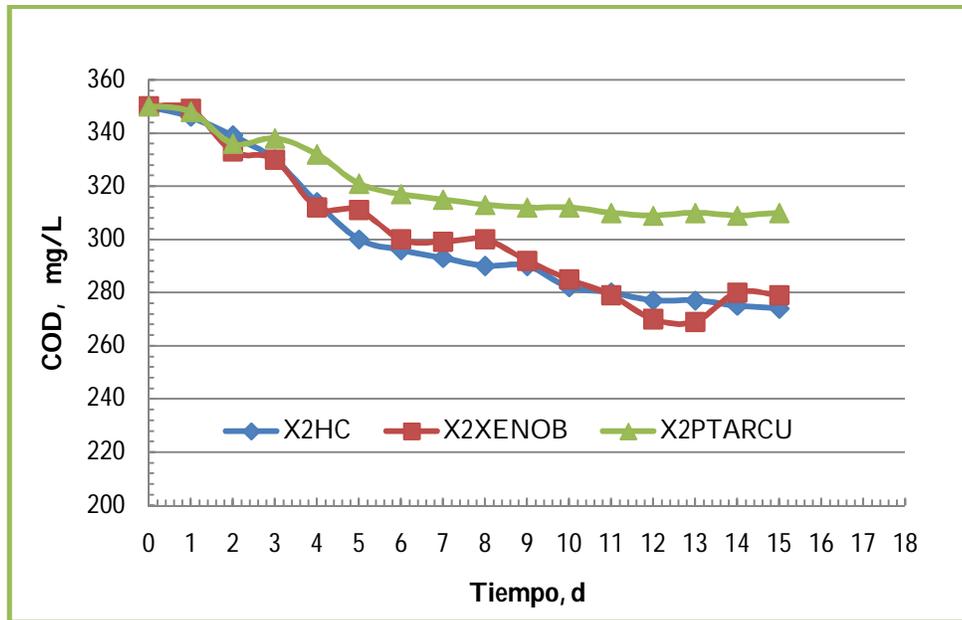


Figura 4.14 Variación de COD en cada ciclo del recambio de agua contaminada

Se observa una tendencia similar a la disminución de los parámetros DQO_s y COD durante los quince ciclos. Aproximadamente a los siete se vuelve lineal la curva de DQO_s y de COD para X^2_{PTARCU} .

La Figura 4.15 muestra la biomasa generada a lo largo de los quince ciclos.

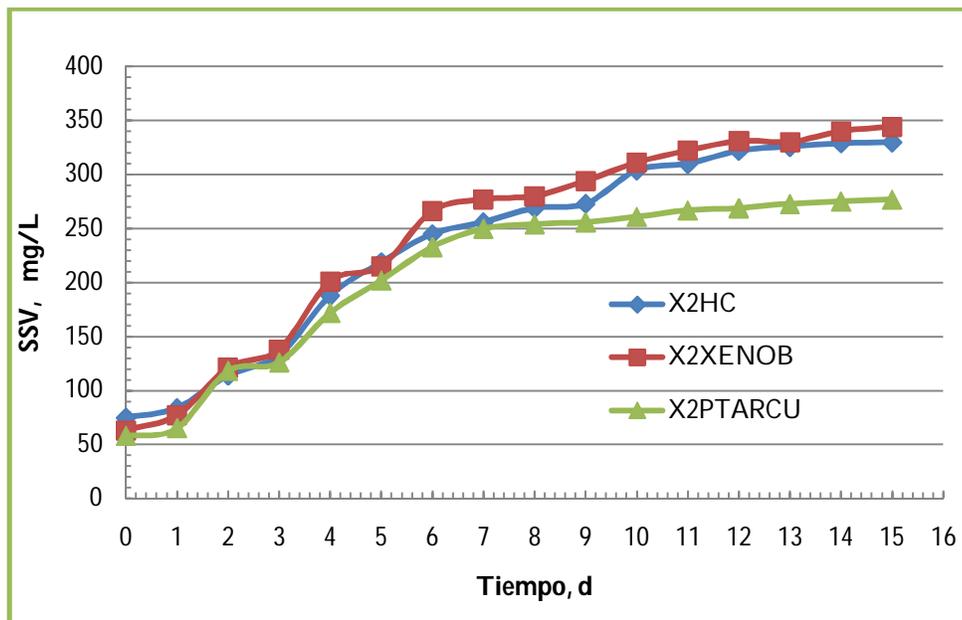


Figura 4.15 Biomasa de X^2_{HC} , X^2_{XENOB} y X^2_{PTARCU}

Se aprecia en la figura anterior que la biomasa generada fue creciendo en cada ciclo para X^2_{HC} y X^2_{XENOB} a lo largo de los quince ciclos. Sin embargo para X^2_{PTARCU} este crecimiento se estancó un poco a los nueve ciclos. El incremento acelerado de biomasa se observa desde el arranque del recambio de agua hasta los 8 días para los tres consorcios.

4.2.2.1 Cinéticas de crecimiento de los tres consorcios y cinéticas de degradación

A partir de los datos obtenidos de las cinéticas de degradación de la materia orgánica en el sistema que se realizó mediante la determinación de la DQO_5 y COD, y con los datos de la concentración de SSV como una medida indirecta del crecimiento de la biomasa, se determinaron la rapidez específica máxima de crecimiento (μ_{max}) y las constantes de saturación o afinidad por el sustrato (K_s) a partir de la ecuación Monod (Ecuación 4) y desde datos de cultivo en reactor por lote, siguiendo el procesamiento de los datos con la ecuación Lineweaver-Burk (Ecuación 7) y utilizando regresión lineal, considerando sólo los valores que siguen un crecimiento lineal en el tiempo.

La mayor biodegradación se logró durante la fase de crecimiento exponencial. El proceso de linealización se hace por el método de Lineweaver-Burk ya que este método es el que presentó mejor correlación comparada con otros métodos (Langmuir y Eadie-Hofstee), (ver Tabla 4.3).

Las Figuras 4.16 y 4.17 presentan las tasas específicas de crecimiento de DQO_5 y COD respectivamente para los tres consorcios.

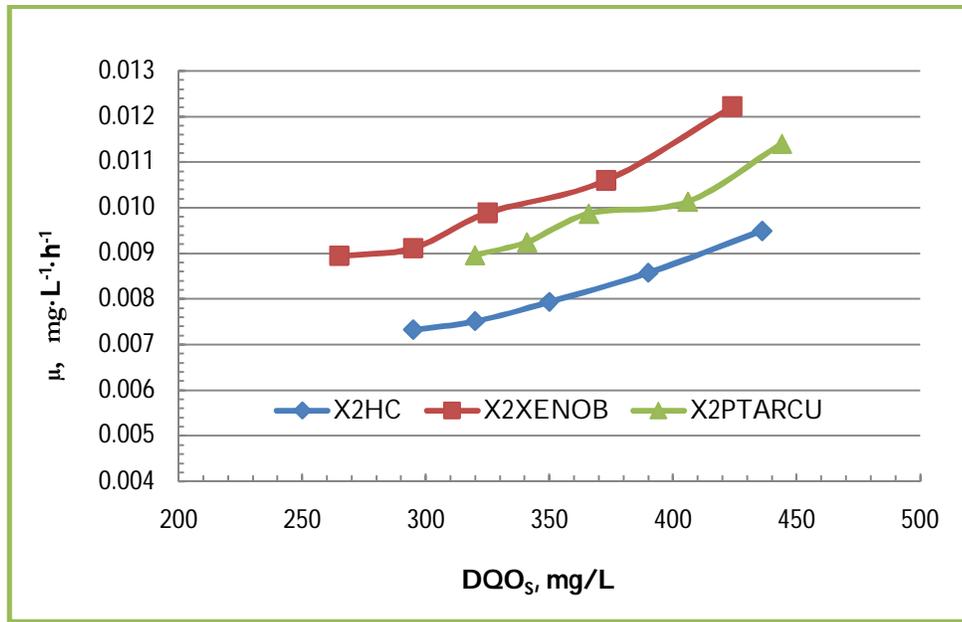


Figura 4.16 Tasa de crecimiento específico vs concentración de DQO₅. X_{HC}^2 , X_{XENOB}^2 , X_{PTARCU}^2

De acuerdo a la pendiente mostrada en las Figuras 4.16 y 4.17 la tasa específica de crecimiento presenta una tendencia a la disminución conforme el sustrato está siendo consumido para los tres consorcios.

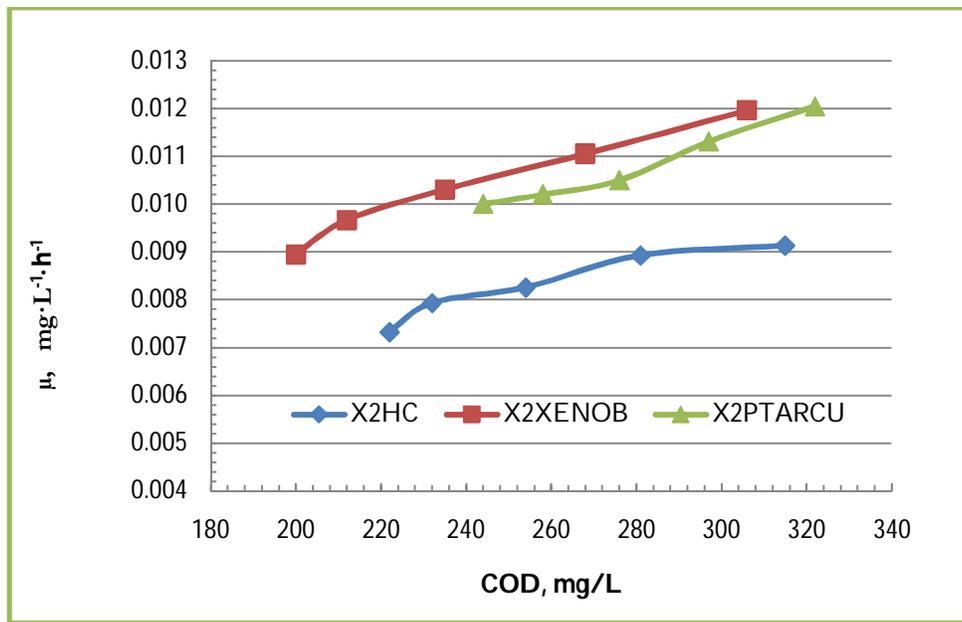


Figura 4.17 Tasa de crecimiento específico vs concentración de COD. X_{HC}^2 , X_{XENOB}^2 , X_{PTARCU}^2

Se observa en la Figura 4.17 que al igual que para el caso de la DQO₅ el incremento en la tasa de crecimiento específico es gradual.

La relación matemática que describe el proceso de Monod involucra dos situaciones: (1) el crecimiento de microorganismos en función del número de estos y (2) la disponibilidad de alimento o sustrato. Las limitaciones que pudieran estar involucradas en el cese de la biodegradación son por un lado que la concentración inicial inoculada de microorganismos no haya sido la suficiente como para incrementar la tasa de crecimiento específico y por otro lado que el tiempo de retención hidráulica de dos días sea tan prolongado como para ocasionar inhibición de los microorganismos. Además de las dos consideraciones anteriores es posible que el agua contaminada contenga materiales cuyas propiedades químicas sean complejas y los microorganismos no sean capaces de generar las enzimas necesarias para inducir y aumentar la tasa de la reacción.

Las ecuaciones transformadas de Lineweaver-Burk, Eadie Hofstee y Lagmuir predicen el comportamiento de la velocidad de reacción. Las correlaciones más cercanas a uno se obtuvieron con el método de Lineweaver-Burk, de acuerdo a la Tabla 4.3 es el que mejor ajustó los datos; la menor correlación obtenida (R^2) fue de 0.927, por lo que se asume confiabilidad de los parámetros ajustados a este modelo con respecto a los otros dos métodos empleados. Las Figuras 4.18 y 4.19 muestran la linealización de la ecuación de Monod para DQO_5 y COD respectivamente.

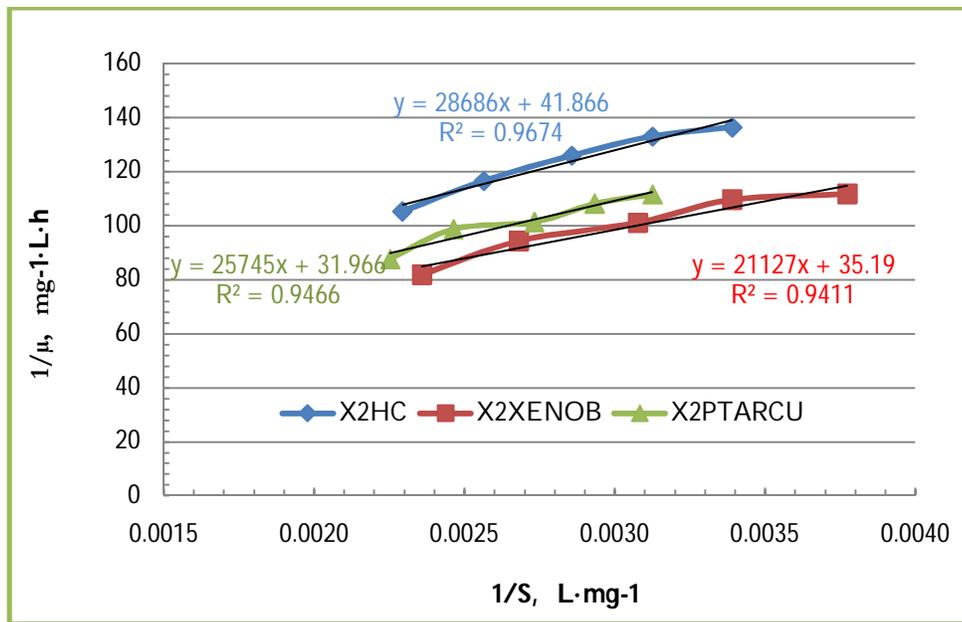


Figura 4.18 Linealización de la ecuación de Monod (Lineweaver-Burk), DQO_5
 X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}

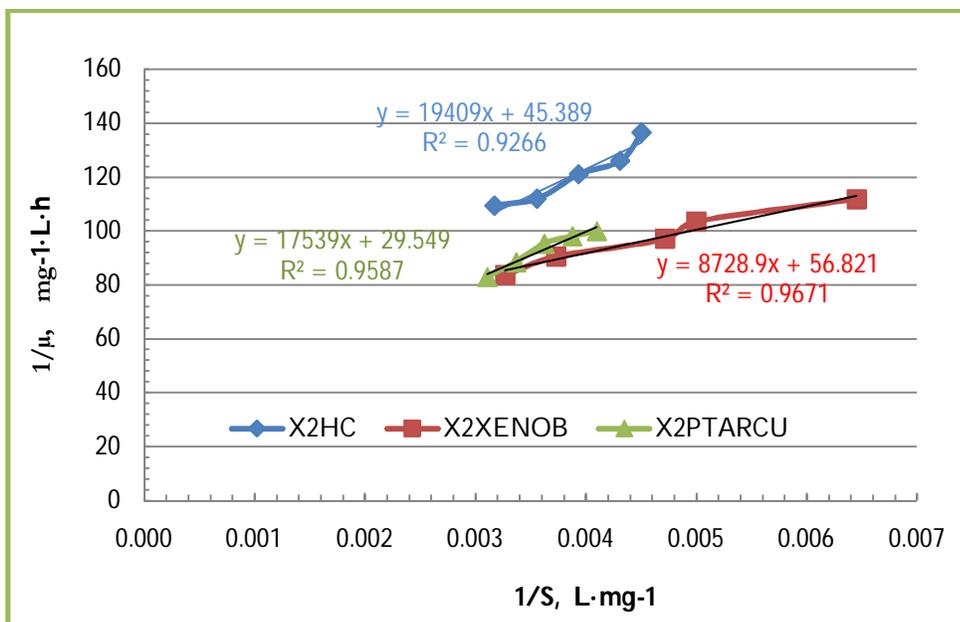


Figura 4.19 Linealización de la ecuación de Monod (Lineweaver-Burk), COD X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}

Con base en la linealización de Monod se obtuvieron los parámetros cinéticos: μ_{max} y K_S .

La Tabla 4.3 presenta las correlaciones de R^2 de los tres métodos de linealización empleados.

Tabla 4.3 Métodos de linealización

	Lineweaver-Burke	Langmuir	Eadie-Hofstee
Consorcio	Regresión para DQO_s		
X^2_{HC}	0.967	0.791	0.746
X^2_{XENOB}	0.961	0.626	0.605
X^2_{PTARCU}	0.947	0.586	0.600
Consorcio	Regresión para COD		
X^2_{HC}	0.927	0.564	0.383
X^2_{XENOB}	0.967	0.913	0.747
X^2_{PTARCU}	0.959	0.625	0.589

Tabla 4.4 Parámetros cinéticos μ_{max} , K_s , Y_s para DQO_s y COD

	PARÁMETROS CINÉTICOS		
	μ_{max} 1/h	K_s mg/L	Y_{xs} mgSSV/mg
Consorcio	DQO_s		
X^2_{HC}	0.0238	685	0.411
X^2_{XENOB}	0.0284	600	0.480
X^2_{PTARCU}	0.0313	805	0.512
Consorcio	COD		
X^2_{HC}	0.0220	427	0.633
X^2_{XENOB}	0.0176	153	0.727
X^2_{PTARCU}	0.0338	594	0.962

Los valores de la Tabla 4.4 fueron calculados desde el comienzo hasta el final de la fase de crecimiento exponencial (27 horas). Se observa que los valores de K_s para DQO_s fueron decreciendo en el siguiente orden: $X^2_{PTARCU} > X^2_{HC} > X^2_{XENOB}$. Los porcentajes de remoción de DQO_s calculados al final de las curvas de crecimiento exponencial son los siguientes: 26 % para X^2_{PTARCU} , 32 % para X^2_{HC} y 39 % para X^2_{XENOB} . En el caso del COD, el orden de decrecimiento para K_s fue: $X^2_{PTARCU} > X^2_{HC} > X^2_{XENOB}$ y los porcentajes de remoción son: 22 % para X^2_{PTARCU} , 26 % para X^2_{HC} y 36 % para X^2_{XENOB} .

Estos resultados indican que al obtener el X^2_{PTARCU} los valores más elevados de K_s y los menores porcentajes de remoción tanto de DQO_s como de COD, desde el comienzo hasta las 27 horas, los microorganismos presentaron mayor dificultad de degradación de los contaminantes, por lo que en esta fase el X^2_{PTARCU} tuvo menor afinidad con el sustrato. Sin embargo, a las 48 horas este consorcio obtuvo porcentajes de remoción intermedios con respecto a los consorcios restantes como se muestra en las Figuras 4.22 y 4.24. Esto hecho se debe a que X^2_{PTARCU} requirió de un mayor tiempo de retención hidráulico para poder generar las enzimas que les permitan consumir el sustrato.

Hasta las 27 horas el X^2_{HC} obtuvo una biodegradación mayor que el X^2_{PTARCU} pero menor que el X^2_{XENOB} , sin embargo, los porcentajes de remoción a las 48 horas fueron menores, indicando con ello que el tiempo de retención hidráulico de 2 días no benefició la remoción en gran medida (contrario a lo sucedido con el X^2_{PTARCU}). Al parecer estos microorganismos poseen una degradación limitada, es decir, sólo determinado

sustrato contenido en el agua es utilizado por estas bacterias, las cuales después de un cierto tiempo no logran generar las enzimas necesarias para continuar la degradación de otro tipo de contaminantes con mayor complejidad.

El valor de K_s para X_{HC}^2 indica que fue el consorcio que presentó una afinidad intermedia con respecto a los otros dos consorcios, lo cual coincide con los porcentajes de remoción de los parámetros de respuesta, ya que también se obtuvieron remociones intermedias.

El X_{XENOB}^2 obtuvo los mayores porcentajes de remoción a las 27 y 48 horas. Desde el comienzo estos microorganismos lograron adaptarse al medio al cual fueron previamente entrenados, su espectro de degradación fue más amplio que los otros dos consorcios. El tiempo de retención hidráulico de 2 días favoreció un poco más la degradación.

Los valores de μ_{max} fueron decreciendo en el orden: $X_{PTARCU}^2 > X_{XENOB}^2 > X_{HC}^2$ para DQO_s . Para COD fueron decreciendo en el orden: $X_{PTARCU}^2 > X_{HC}^2 > X_{XENOB}^2$. Lo que indica que el X_{PTARCU}^2 fue el consorcio que obtuvo el valor máximo que alcanzó la razón de crecimiento específico para una concentración determinada de sustrato. Por otro lado, teóricamente se esperaría que la μ_{max} decreciera en el mismo orden tanto para DQO_s como para COD, sin embargo experimentalmente no sucedió así, (para DQO_s se obtuvo que la μ_{max} decreció en el orden: $X_{XENOB}^2 > X_{HC}^2$, y para COD decreció en el orden: $X_{HC}^2 > X_{XENOB}^2$). La razón pudiera deberse a error experimental. Existe una correlación entre los dos parámetros cinéticos K_s y μ_{max} ya que un incremento en K_s permite un incremento en μ_{max} y viceversa (Kim et al., 2005), por lo tanto se asume que el orden de decrecimiento de μ_{max} correcto es con COD y es: $X_{PTARCU}^2 > X_{HC}^2 > X_{XENOB}^2$ pues este es el mismo orden de decrecimiento que para K_s .

El valor de K_s fue menor que la concentración de sustrato ($K_s \ll S$) para el caso de X_{XENOB}^2 con el parámetro COD, indicando con ello que la reacción fue de orden aparentemente de cero, es decir, que el sustrato resultó ser más biodegradable con una tasa de reacción constante (Campbell et al., 2004).

Los valores de K_s restantes fueron más elevados que la concentración del sustrato ($K_s > S$), mostrando con ello que la tasa de degradación se vuelve una función fuerte de la concentración de sustrato. Al decrecer la concentración de sustrato, la tasa de crecimiento también decrece.

El crecimiento celular y la formación de productos a causa de la actividad microbiana son procesos de bioconversión en los cuales el sustrato y los nutrientes presentes en el sistema son transformados a masa celular. Cada una de estas conversiones puede ser cuantificada por el coeficiente de rendimiento que expresa entonces la masa de células por unidad de masa de sustrato y nutrientes consumidos, $Y_{X/S}$.

El decrecimiento en cuanto al coeficiente de rendimiento para DQO_5 y para COD fue el siguiente: $X^2_{PTARCU} > X^2_{XENOB} > X^2_{HC}$, es decir, que el X^2_{PTARCU} presentó un mayor crecimiento celular. Esto es lógico porque hay más variedad de microorganismos en la PTARCU, pero no significa que sean más eficientes.

La tasa a la cual se llevaron a cabo las reacciones bioquímicas para el sistema de reactor por lote con los tres consorcios se muestran en las Figuras 4.20 y 4.21. La concentración inicial de sustrato en términos de DQO_5 o bien COD según sea el caso es representado como C_0 en mg/L. La concentración de sustrato a un tiempo t es representada como C en mg/L.

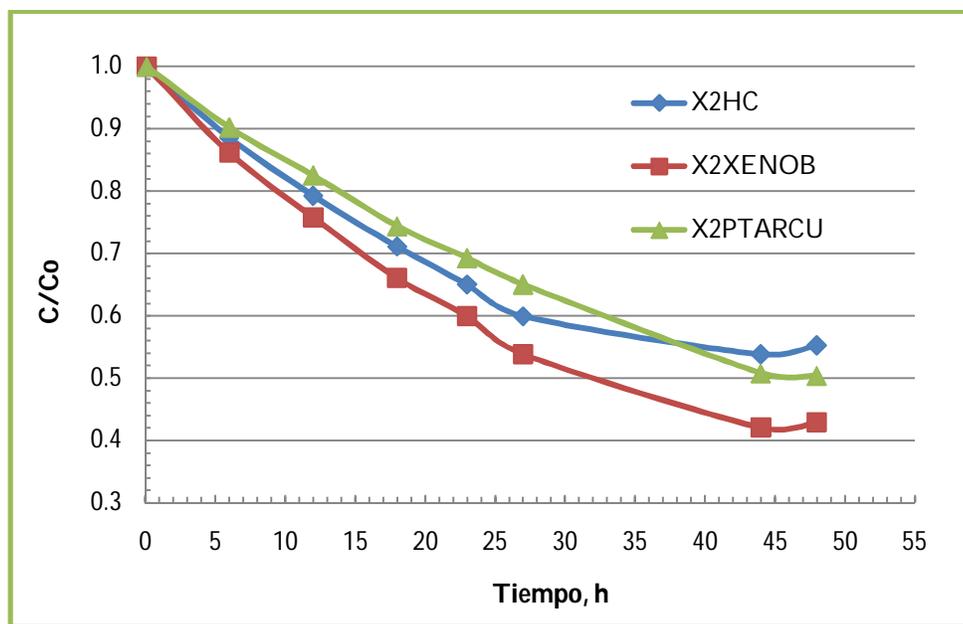


Figura 4.20 Cinética de degradación para DQO_5 . X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}

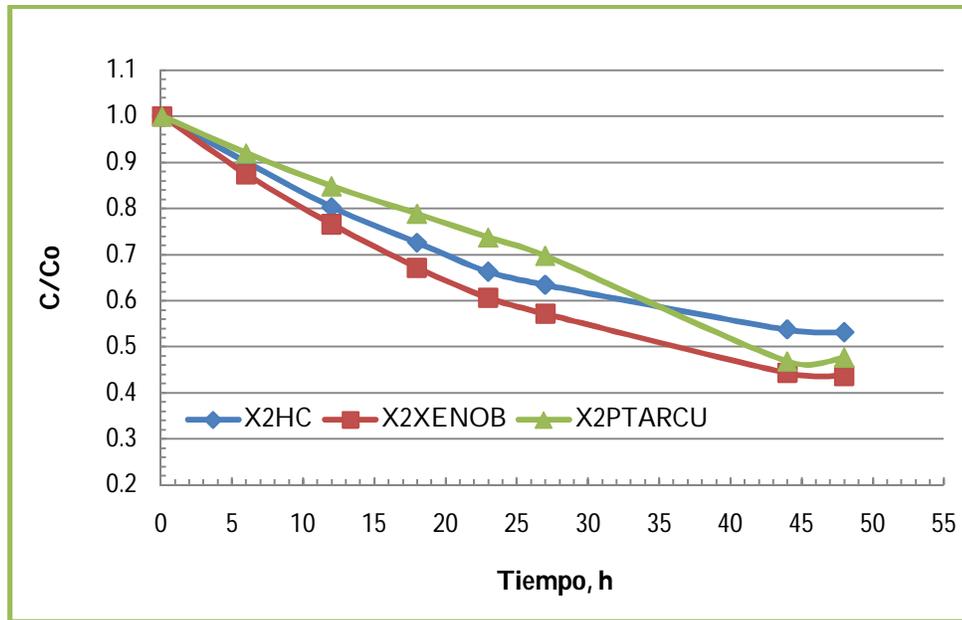


Figura 4.21 Cinética de degradación para COD. X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}

Se aprecia en las dos figuras anteriores que las curvas de las cinéticas para DQO₅ y COD presentan la misma tendencia de disminución con los tres consorcios. Sin embargo, desde el comienzo el X^2_{XENOB} se despegue un poco más de los otros dos para la cinética de la DQO₅, no así para la cinética del COD; esto puede atribuirse a que la sensibilidad de las técnicas es diferente. Es posible que el mayor despegue de la curva de X^2_{XENOB} se deba a que la degradación de compuestos orgánicos sea más amplia para este consorcio porque estas bacterias tienen una mejor capacidad de fragmentar estos compuestos hacia productos más simples, lo que conlleva a que la tasa en la reacción bioquímica sea mayor para el X^2_{XENOB} .

De acuerdo a lo mostrado en la Figura 4.21 para la cinética del COD la separación entre las curvas casi no es perceptible hasta las 27 horas, es posible que una parte de los compuestos orgánicos contenidos en el agua ya hayan sido tomados por los microorganismos como fuente de carbono alrededor del primer día de tratamiento. Después de las 27 horas ya hay una ligera separación de las curvas. Para X^2_{HC} la curva se hace menos pronunciada, mientras que para X^2_{XENOB} y X^2_{PTARCU} la curva continúa. De las 44 hasta las 48 horas (última medición) ya también son asintóticas las curvas para estos dos últimos consorcios.

Las Figuras 4.22 y 4.23 presentan los porcentajes de remoción de los parámetros de respuesta después de las 48 horas de tratamiento biológico para los consorcios: X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU} .

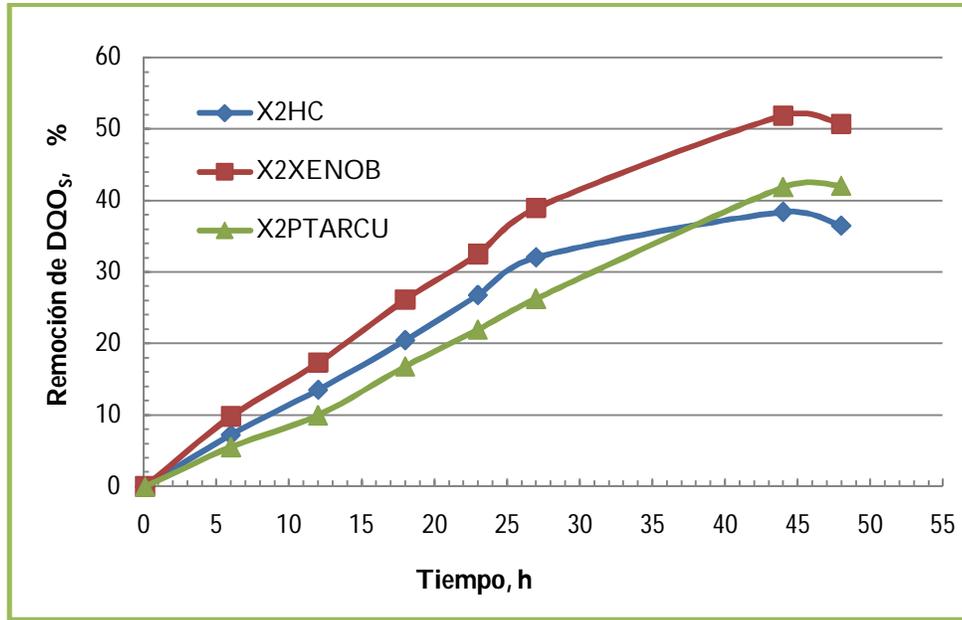


Figura 4.22 Remoción de DQO₅ (48 h de tratamiento). X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}

La remoción de los parámetros de respuesta fue continua hasta las 44 horas de tratamiento para los consorcios X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU} , posteriormente disminuyen ligeramente su degradación. Para el X^2_{HC} , la degradación presentó la misma tendencia de degradación que los otros dos consorcios hasta las 27 horas, frenando posteriormente su actividad.

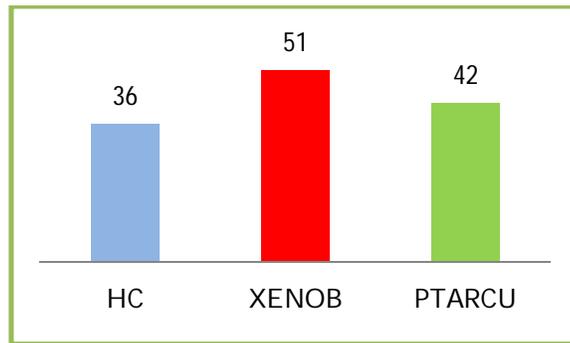


Figura 4.23 Remoción de DQO₅ después de 48 h. X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}

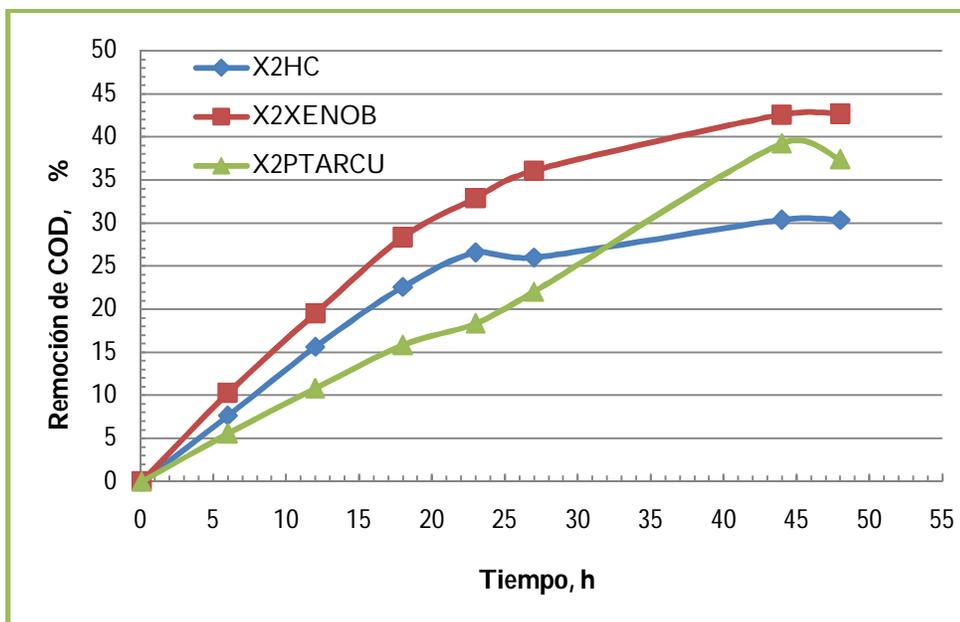


Figura 4.24 Remoción de COD (48 h de tratamiento). X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}

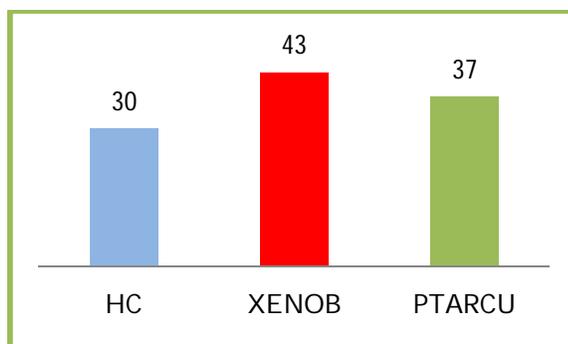


Figura 4.25 Remoción de COD después de 48 h. X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU}

Haciendo un comparativo entre las Figuras 4.10, 4.12, 4.22 y 4.24 se observa que sucede un efecto contrario en las remociones. Mientras que la mayor remoción alcanzada en las Figuras 4.10 y 4.12 pertenece a X^2_{HC} seguido de X^2_{XENOB} y por último X^2_{PTARCU} , en las Figuras 4.22 y 4.24 los valores de remociones fueron mayores para X^2_{XENOB} seguido del X^2_{PTARCU} y finalizando con X^2_{HC} . Este fenómeno puede ser atribuido a que a pesar de que se presume que los consorcios comerciales al estar ya previamente seleccionados y entrenados a ciertos compuestos similares a los que contiene el agua contaminada de la ex refinería 18 de Marzo (compuestos derivados del petróleo), requieren de un tiempo determinado de aclimatación antes de reflejar su potencialidad de biodegradación. Al parecer, esta potencialidad estuvo limitada sólo para el X^2_{HC} , ya que los demás consorcios a pesar de requerir también de su tiempo de

aclimatación, fueron capaces de adaptarse al medio y desarrollar así las enzimas necesarias para romper las moléculas y tomar éstas como su fuente de carbono.

El X^2_{XENOB} fue el que necesitó mayor tiempo de aclimatación, pero finalmente las bacterias activaron o desarrollaron una variedad más amplia de enzimas que les permitieron romper mayor número de moléculas y tomarlas como alimento. En el caso del X^2_{HC} su limitación fue mayor porque la remoción máxima alcanzada fue de 36 y 30 % para DQO_s y COD, respectivamente, al parecer lo que sucede con este consorcio es que estas bacterias sólo son capaces de biodegradar un espectro más pequeño de los compuestos orgánicos. Salvo la reducción del tiempo de degradación, las remociones logradas por X^2_{HC} antes de la aclimatación (Figura 4.10 y 4.12) fueron casi iguales a las remociones después de ésta (Figuras 4.22 y 4.24), demostrándose con ello que no hay una diferencia significativa al inocular una pequeña cantidad de biomasa (Tabla 4.3) e inocular una concentración mayor de microorganismos.

En un tiempo de retención hidráulico de 2 días y con la concentración de biomasa aproximada de 300 mg/L no se logra obtener una concentración de DQO_s cercana a cero para ninguno de los tres consorcios.

La Figura 4.26 presenta el rendimiento de los tres cultivos.

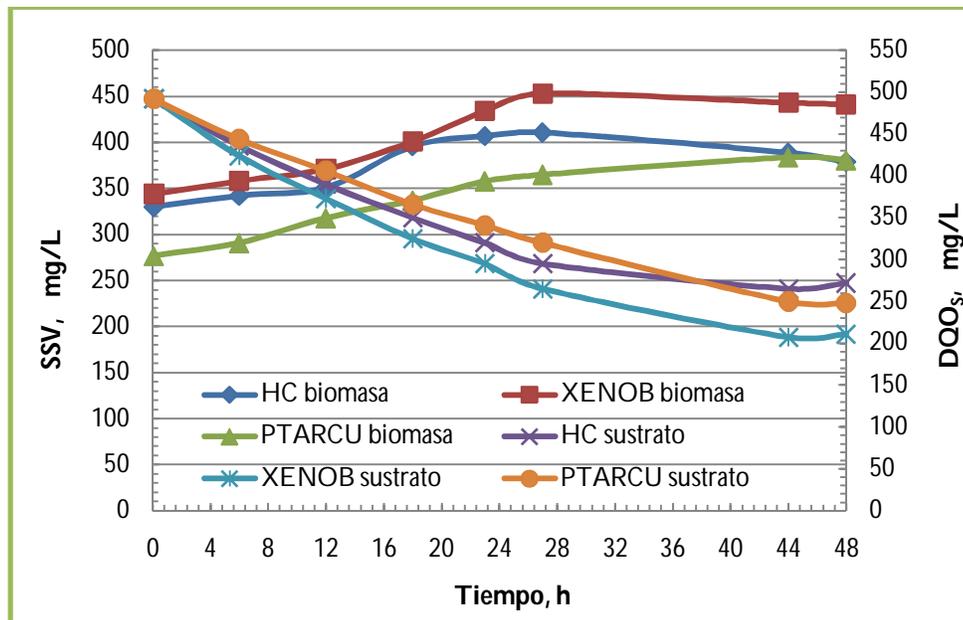


Figura 4.26 Rendimiento de los cultivos para X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU} para DQO_s

Para una concentración inicial aproximada de 320 mgSSV/L, las células de los tres consorcios comenzaron inmediatamente a crecer con la formación de un espejo entre las curvas de crecimiento y biodegradación, indicando que los microorganismos pueden degradar los contaminantes tomándolos como fuente de carbono y energía.

Las Figuras 4.26 y 4.27 muestran que las curvas: crecimiento de biomasa y biodegradación del sustrato, desde el comienzo del tratamiento hasta su intercepción forman un espejo, para DQO_s, dicha intercepción ocurre a las 9, 6 y 14 horas, aproximadamente, para X^2_{HC} , X^2_{XENOB} y X^2_{PTARCU} , respectivamente, revelando con ello que el aumento de los microorganismos sucede más rápidamente con el X^2_{XENOB} , y a su vez el consumo de sustrato se lleva a cabo más pronunciadamente en comparación con los otros dos consorcios. Después de la intercepción nuevamente se forma el espejo entre dichas curvas.

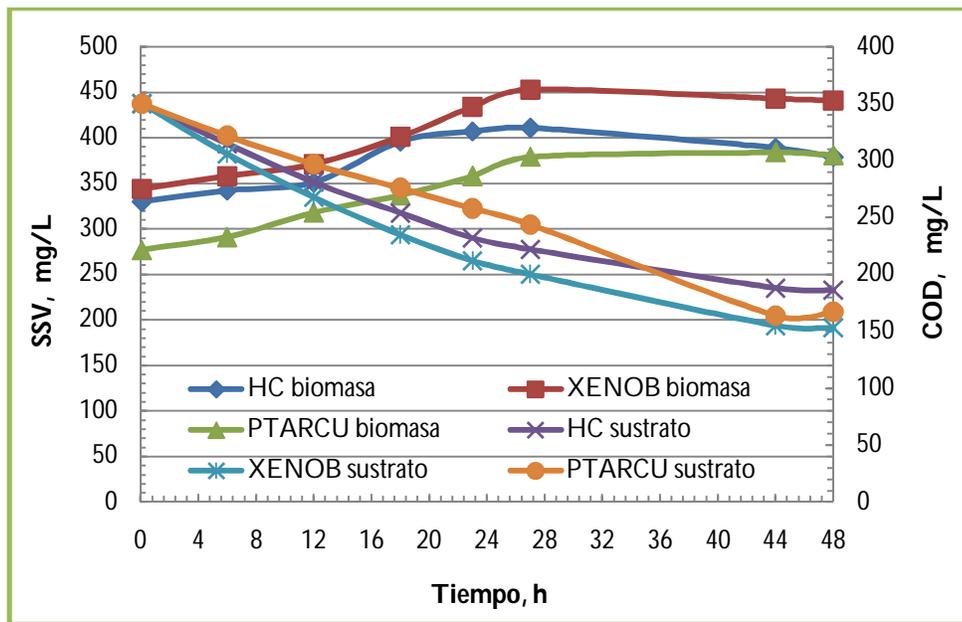


Figura 4.27 Rendimiento de los cultivos para X^2_{HC} , X^2_{XENOB} , X^2_{PTARCU} para COD

De acuerdo al porcentaje de remoción que se obtuvo con el X^2_{PTARCU} en relación al X^2_{HC} el primero fue superior al segundo porque con una concentración menor de biomasa se logró obtener una mayor remoción.

Desde el inicio del tratamiento (con una biomasa inicial de 345 mgSSV/L) hasta las 27 horas el X^2_{XENOB} se reprodujo e incrementó su población bacteriana, se puede apreciar la fase exponencial en la Figura 4.26 o bien en la Figura 4.27. Entre las 27 y 44 horas ocurrió la fase estacionaria y después de esta sobreviene la

fase de declinación apenas perceptible, que consiste en una disminución de la concentración de la biomasa debida a la lisis celular. El máximo porcentaje de remoción alcanzado fue del 51 % para DQO₅ y del 43 % para COD, quedando un remanente sin biodegradar casi del 50 %. Los factores que pudieran intervenir en la incompleta biodegradación es que si bien es cierto que existe aún materia orgánica medida como COD, no todos los compuestos se mineralizan en una reacción enzimática. La hipótesis es que al incrementar la concentración de biomasa se aumenta la posibilidad de que las bacterias desarrollen la capacidad de metabolizar dichos componentes.

Se calculó la relación DBO₅/DQO₅ a las 12 horas del tratamiento del reactor por lote obteniéndose los siguientes resultados: 0.375, 0.417 y 0.403 para X^2_{HC} , X^2_{XENOB} y X^2_{PTARCU} , respectivamente. Se tomó la muestra para la medición de la DBO₅ a las 12 horas porque se observó en esos momentos que la biodegradabilidad estaba llevándose de manera continua. La relación DBO₅/DQO₅ del agua cruda fue de 0.21, demostrándose con ello que el C_{XENOB} fue el que mayor incrementó su índice de biodegradabilidad.

La relación DBO₅/DQO₅ una vez finalizado el tratamiento (48 horas) fue de 0.11, 0.073 y 0.09 para X^2_{HC} , X^2_{XENOB} y X^2_{PTARCU} , respectivamente. El X^2_{XENOB} fue el que menor valor de índice de biodegradabilidad obtuvo, esto es indicativo de que este consorcio fue el que llevó a cabo la mayor degradabilidad, dejando una menor concentración de compuestos recalcitrantes.

Se deduce que el sistema de tratamiento por lotes con un tiempo de retención hidráulica de 2 días y con la concentración de biomasa empleada limita por sí mismo la sucesiva remoción de los parámetros de respuesta.

Otro factor que puede decididamente influir en el proceso de mejora es la adaptación de los microorganismos al influente contaminante. Por consiguiente, es crucial seleccionar los más resistentes microorganismos con las más altas capacidades metabólicas. Por esta razón, es necesario establecer cuidadosamente las condiciones operacionales en esta etapa, la cual fuertemente afectará el resultado de estudios subsecuentes.

El sistema de reactor por lote permitió calcular los parámetros cinéticos (μ_{max} , K_S y Y_{XS}) utilizando la ecuación de Monod como herramienta. Si bien es cierto que el sistema de reactor por lote es el más difundido también es cierto que es el que menos posibilidades de control ofrece, ya que una vez sembrado

el inóculo y fijados los valores de pH, temperatura, agitación y aireación, las células quedan “sujetas a su potencialidad”, que se manifiesta creciendo a la máxima tasa que les permite el medio empleado.

4.3 SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL

Con base en los resultados de la primera etapa experimental, se seleccionó el consorcio bacteriano comercial especializado en la biodegradación de compuestos xenobióticos (X^2_{XENOB}). En el presente apartado se empleará nuevamente la nomenclatura: C_{XENOB} .

En el capítulo anterior se observó que con un tiempo de retención hidráulica de 2 días y una concentración bacteriana inicial de 345 mg/L se obtuvo un porcentaje de remoción del 51 % para DQO_s y un 43 % para COD, la premisa es que al reducir el tiempo de retención hidráulica a 24 horas y aumentando la concentración de microorganismos inoculados se logrará incrementar el porcentaje de remoción de los parámetros de respuesta.

4.3.1 Inoculación directa del consorcio bacteriano hacia el sistema SBR

La Tabla 4.5 muestra los valores promedio calculados del sistema de tratamiento biológico con inoculación directa del C_{XENOB} hacia el SBR.

Tabla 4.5 Valores promedio del sistema de tratamiento con inoculación directa del C_{XENOB}

PARÁMETRO DE DISEÑO	UNIDAD	VALOR
Flujo promedio	m ³ /d	3.00E-03
Promedio de carga DBO	kg/d	3.18E-04
Número de tanques	Número	1
Tiempo del ciclo	horas	24
Tiempo de retención de sólidos	días	18
Volumen del tanque	m ³	3.33E-03
Volumen de llenado/ciclo	m ³	3.00E-03
Volumen de llenado/ volumen del tanque	relación	0.90
SSTLM	g/m ³	900

PARÁMETRO DE DISEÑO	UNIDAD	VALOR
SSVLM	g/m ³	465
Tasa de bombeo decantado	m ³ /min	3.33E-05
Producción de lodos	kg/d	1.67E-04
Producción observada	kg SSV/kg DBO	0.270
	kg SST/kg DQOb	0.328
Promedio de oxígeno requerido/tanque	kg/d	3.43E-04
Promedio de velocidad de transferencia de oxígeno	kg/h	1.80E-05

Carga orgánica

Carga orgánica (CO) se refiere a la cantidad de alimento suministrado a los microorganismos por unidad de tiempo. En los sistemas discontinuos, de la misma forma que en otros procesos la carga orgánica es un parámetro importante que representa la cantidad de sustrato (expresado como DBO o DQO) suministrado al sistema en un día, ya sea referido al volumen de operación, a la cantidad de biomasa o al área superficial (en sistemas de película biológica).

De acuerdo con González (1994), la CO se puede definir para algunas de las fases del ciclo o para la totalidad de éste. La expresión general del cálculo de la CO para reactores discontinuos se puede obtener a partir de la ecuación siguiente:

$$CO = \frac{Q \cdot DQO}{V_{reactor} \cdot SSTLM} \quad (69)$$

Donde:

CO: carga orgánica; **V_{reactor}:** volumen del reactor; **DQO:** demanda química de oxígeno en el influente; **SSTLM:** sólidos suspendidos totales en el licor mezclado; **Q:** caudal.

En la Figura 4.25 se presenta la carga orgánica del sistema con inoculación directa del C_{XENOB} hacia el SBR.

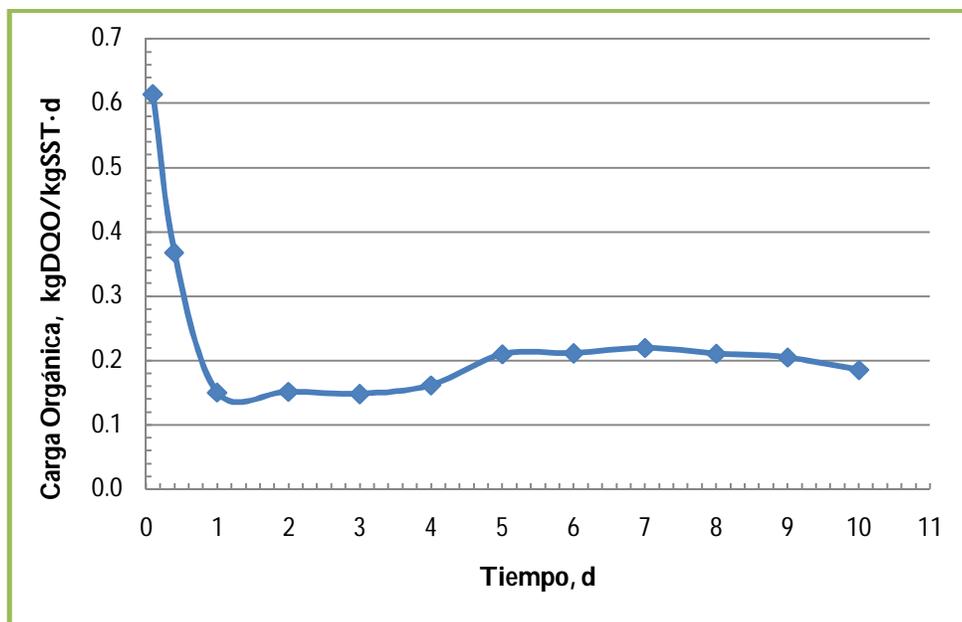


Figura 4.28 Carga orgánica del sistema con inoculación directa del C_{XENOB} hacia el SBR

En los resultados de bioaumentación de inoculación directa la carga orgánica al inicio del tratamiento (del arranque al primer día) fue disminuyendo de 0.61 a 0.15 kgDQO/(kgSST·d). Es posible que las bacterias al comenzar el tratamiento inmediatamente activaron sus capacidades metabólicas para crecer y reproducirse, además la gran oferta de alimento permitió a las bacterias desarrollar flagelos para vivir en forma aislada y no en colonias como en el caso de una carga orgánica baja.

Del primero al cuarto día la carga orgánica obtuvo valores similares probablemente porque al transcurrir los ciclos los microorganismos se aclimataron al sustrato y además durante este tiempo las bacterias estuvieron en la fase de crecimiento exponencial, lo cual es congruente con la Figura 4.32.

Del cuarto al quinto día la carga orgánica aumentó ligeramente y del quinto al décimo día la carga orgánica se mantuvo más o menos estable, este comportamiento pudiera deberse a la licuefacción que sufren las grasas y aceites, las cuales al parecer son moléculas difícilmente biodegradables. Sólo del cuarto al quinto día sucede esta emulsión porque después se estabiliza la carga orgánica.

La carga orgánica resultó ser inversamente proporcional con la remoción de DQO_5 durante todo el tratamiento.

La Figura 4.29 presenta la relación existente entre la DQO_5 y los SST.

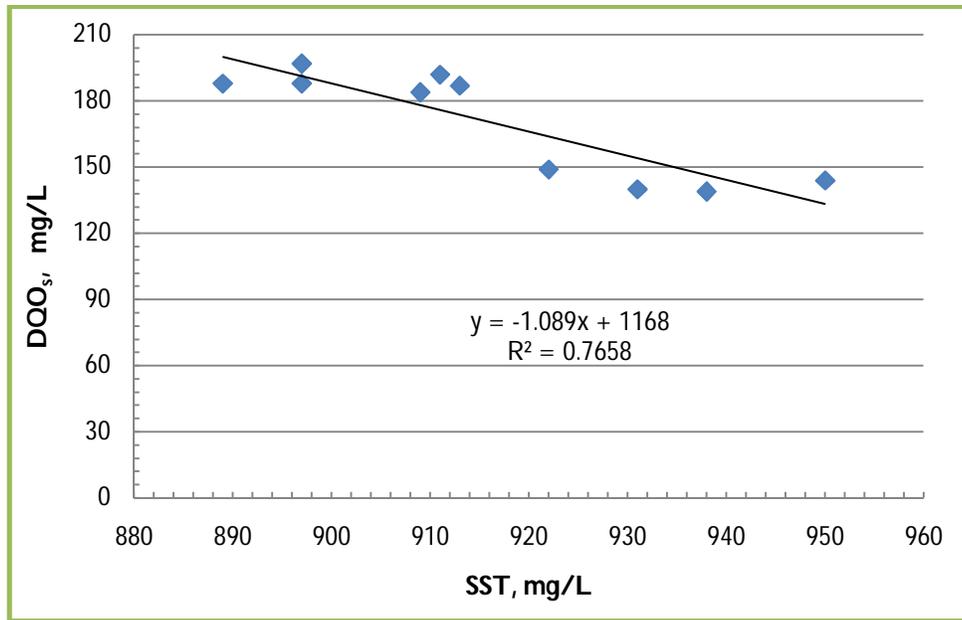


Figura 4.29 Relación DQO₅ y SST con inoculación directa del C_{XENOB}

La relación entre la DQO₅ del efluente y los SST en el reactor fue casi lineal ($R^2=0.766$), es decir, la biomasa fue incrementando su concentración en la medida que iba consumiendo el sustrato representado como DQO₅.

Las Figuras 4.30 y 4.31 muestran las biodegradaciones y remociones llevadas a cabo en el sistema de tratamiento con inoculación directa del consorcio microbiano C_{XENOB} hacia el sistema de tratamiento.

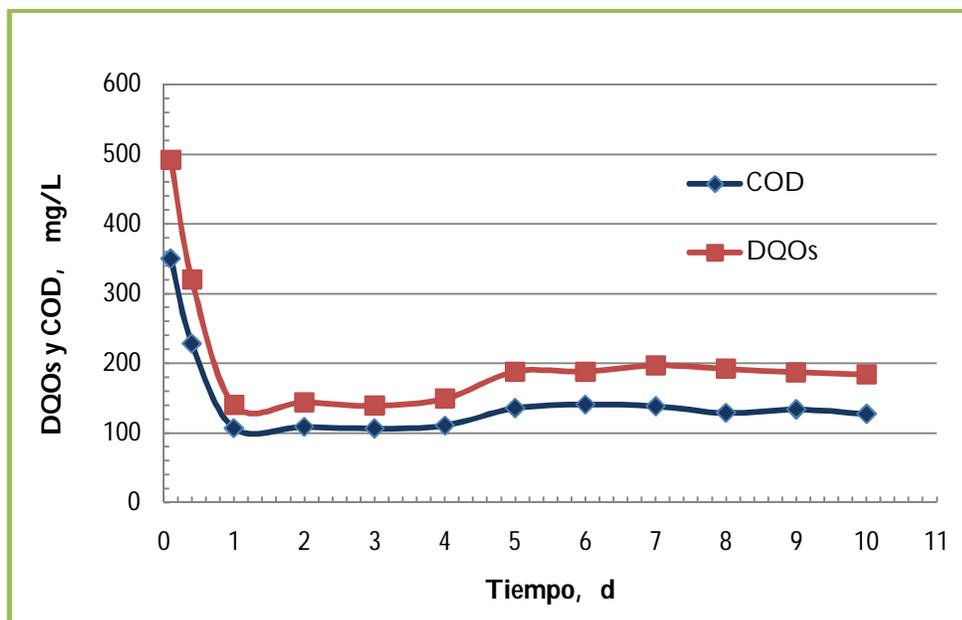


Figura 4.30 Biodegradación de DQO₅ y COD con inoculación directa al SBR con C_{XENOB}

La degradación entre DQO₅ y COD tuvo un comportamiento similar, la degradación de sustrato del arranque al primer día fue aumentando, posteriormente se mantuvo más o menos constante y del cuarto al quinto día disminuyó un poco para después mantenerse aproximadamente constante hasta el décimo día. Este comportamiento es indicativo de que al comienzo del tratamiento las bacterias presentaron su mayor velocidad de crecimiento y degradación debido a que sus capacidades metabólicas fueron activadas para llevar a cabo los procesos catabólicos y anabólicos. La estabilidad de los parámetros de respuesta del primero al cuarto día puede ser indicativo de que las bacterias presentaron la fase estacionaria y que los compuestos contaminantes que sirvieron como sustrato fueron consumidos a una tasa de degradación similar. Del cuarto al quinto día es posible que las bacterias hayan logrado romper y asimilar las moléculas de grasas y aceites, dado que la DQO₅ y el COD aumentaron ligeramente, sin embargo, este fraccionamiento de moléculas no fue continuo porque posteriormente no disminuyeron las concentraciones de los parámetros de respuesta si no que se mantuvieron aproximadamente constantes.

La Figura 4.31 muestra el porcentaje de remoción de DQO₅ y COD con inoculación directa al SBR.

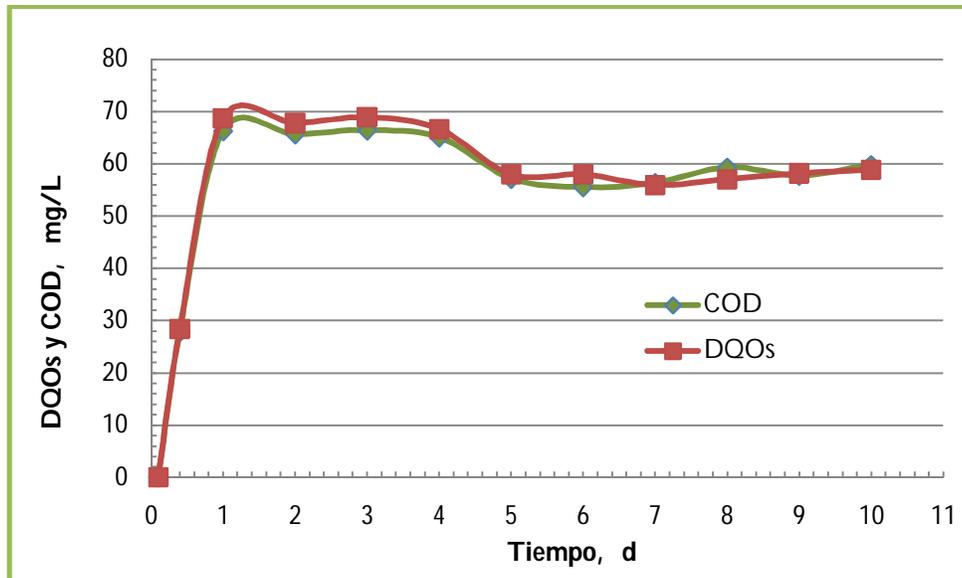


Figura 4.31 Remoción de DQO_s y COD con inoculación directa al SBR

Se observa que desde el primer momento en que se inocula el C_{XENOB} hasta el cuarto día, se logra obtener el mayor porcentaje de remoción para DQO_s y COD (69 y 66 %, respectivamente) con respecto a los días restantes. Del quinto día hasta el décimo se estabiliza el sistema con aproximadamente un 59 % de remoción para DQO_s y 60 % para COD.

La Figura 4.32 muestra los sólidos totales y volátiles en SBR con inoculación directa del C_{XENOB} .

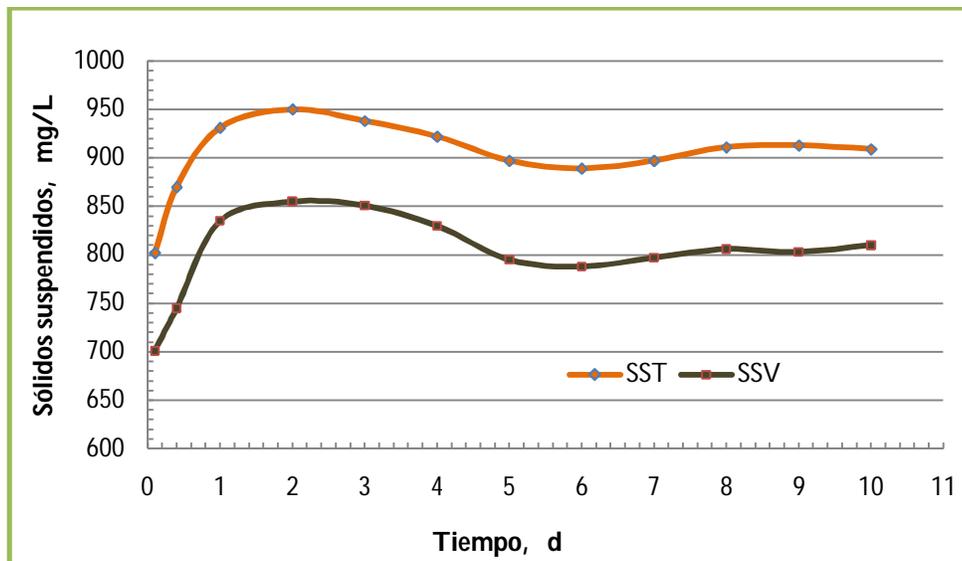


Figura 4.32 Sólidos en SBR con inoculación directa del C_{XENOB}

El crecimiento bacteriano presentó un comportamiento parecido al porcentaje de remoción de los parámetros de respuesta, pues como lo muestran las Figuras 4.31 y 4.32, del arranque al primer día se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción de DQO_5 y COD y las mayores concentraciones de sólidos, este hecho puede explicarse al tener en cuenta que el reactor al inicio del tratamiento estaba completamente vacío, por lo que al existir mayor oferta de alimento las bacterias aumentaron su población y por ende los porcentajes de remoción fueron mayores que el resto del tratamiento.

Del segundo ciclo en adelante, el reactor ya no estaba completamente vacío, se tenía el 90 % de la profundidad del tanque, es decir, la oferta de alimento disminuyó un poco y por tanto la población bacteriana. A medida que los ciclos transcurren, se lleva a cabo la fase estacionaria para posteriormente entrar a la fase de muerte.

La prueba de la DBO_5 fue determinada empleando bacterias del C_{XENOB} . El valor de la DBO_5 fue de 160 mg/L y el valor de la DQO_5 medido a las 12 horas después del arranque del tratamiento fue de 350 mg/L, resultado un índice de biodegradabilidad de 0.46. Este índice aumentó en 0.25 unidades con respecto al índice calculado del agua cruda, así que este parámetro indica que la biodegradabilidad del sustrato fue aumentada al emplear este tipo de bacterias. Se tomó la muestra a las 12 horas para la determinación de la DBO_5 y DQO_5 porque se observó que la degradabilidad estaba llevándose a cabo de manera continua.

Dado que las bacterias esporuladas inician raudamente su actividad una vez inoculadas al sistema, se deduce que no es necesario inocularlas en condiciones adecuadas para reactivarlas, sin embargo, como se aprecia en la Figura 4.38, la reactivación llevada a cabo primero en el biorreactor para posteriormente realizar inoculaciones sucesivas hacia el SBR logra incrementar los porcentajes de remoción.

4.3.2 Sistema de tratamiento: Biorreactor – SBR

Se realizó la incubación del consorcio bacteriano en el biorreactor para posteriores inoculaciones al sistema SBR (inoculaciones sucesivas). La Tabla 4.6 muestra los valores promedio calculados del sistema de tratamiento biológico, una vez que todas estas inoculaciones fueron llevadas a cabo y después de un tiempo de estabilización.

Tabla 4.6 Valores promedio con inoculaciones sucesivas del C_{XENOB} hacia el SBR

PARÁMETRO DE DISEÑO	UNIDAD	VALOR
Flujo promedio	m ³ /d	3.00E-03
Promedio de carga DBO	kg/d	3.18E-04
Número de tanques	Número	1
Tiempo del ciclo	Horas	24
Tiempo de retención de sólidos	días	34
Volumen del tanque	m ³	3.33E-03
Volumen de llenado/ciclo	m ³	3.00E-03
Volumen de llenado/ volumen del tanque	relación	0.900
SSTLM	g/m ³	1667
SSVLM	g/m ³	666
Velocidad de bombeo decantado	m ³ /min	3.33E-05
Producción de lodos	kg/d	1.630-04
Producción observada	kg SSV/kg	0.205
	DBO	
	kg SST/kg	
	DQOb	0.321
Promedio de oxígeno requerido/tanque	kg/d	3.84E-04
Promedio de velocidad de transferencia de O ₂	kg/h	2.01E-05

La Figura 4.33 muestra la carga orgánica con inoculaciones sucesivas.

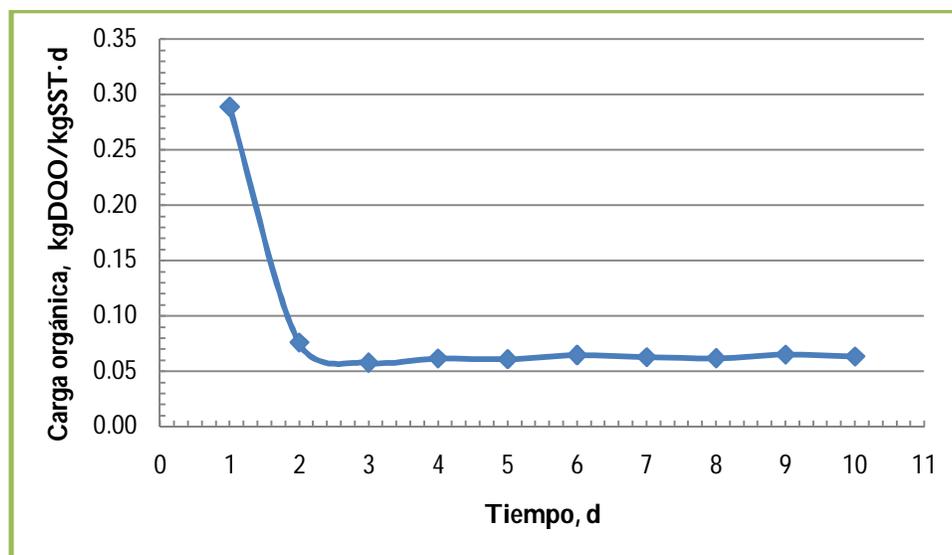


Figura 4.33 Carga orgánica con inoculaciones sucesivas del C_{XENOB}

Sólo para el primer día el valor de la carga orgánica en inoculaciones sucesivas fue casi el doble de la carga orgánica que en inoculación directa (0.289 y 0.150 kgDQO/kgSST·d respectivamente), esto es debido a dos razones; la primera es que para el primer día la concentración de DQO_s en inoculaciones sucesivas es mayor que en inoculación directa y la segunda es que también para el primer día la concentración de SSV en inoculaciones sucesivas es menor que la concentración de SSV en inoculación directa. Para inoculaciones sucesivas la carga orgánica del segundo día en adelante se mantiene más o menos constante, y sus valores son menores que los valores de la carga orgánica con inoculación directa, la razón radica en que los SSV son mayores en inoculaciones sucesivas que en inoculación directa (alrededor de 770 mg/L mayores). Según las Figuras 4.37 y 4.38 la carga orgánica resultó nuevamente ser inversamente proporcional con la remoción de DQO_s.

La Figura 4.41 muestra la biomasa representada como SST y SSV generada en el biorreactor.

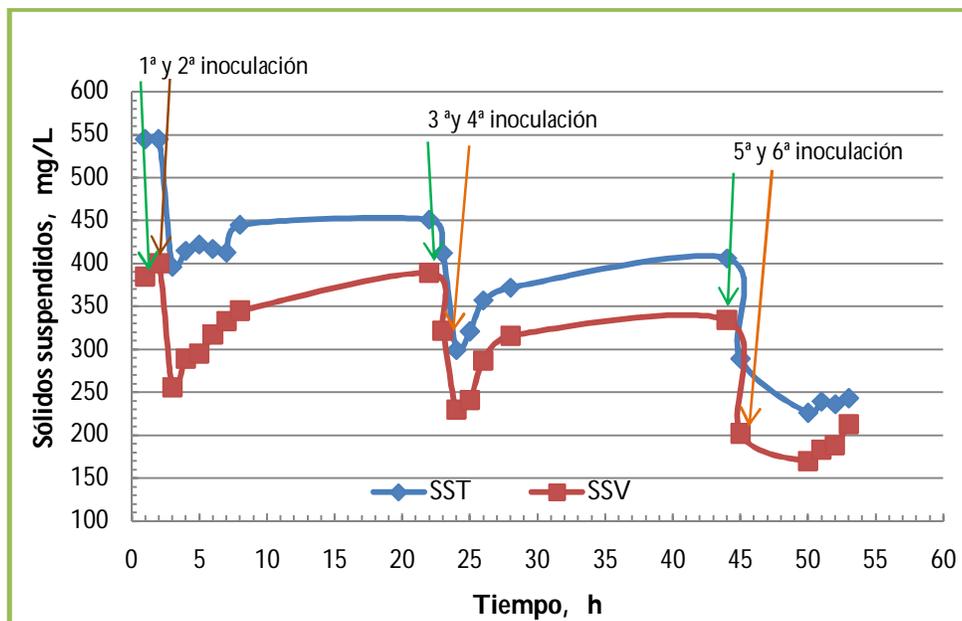


Figura 4.34 SST y SSV del C_{XENOB} generados en el biorreactor

Se aprecia que en la primera y segunda hora después del arranque del biorreactor la concentración de SSV es de 385 y 400 mg/L, respectivamente, estas concentraciones son las máximas alcanzadas en todo el tiempo de operación. Después de cada inoculación los SSV disminuían drásticamente debido a las diluciones ocasionadas por el suministro de agua de la llave y por ende el derrame de cultivo bacteriano. La recuperación en la concentración de los SSV era casi inmediata después de cada inoculación, no obstante,

fue cada vez menor debido a la progresiva dilución del cultivo. La diferencia entre SSV y SST disminuyó conforme la operación del biorreactor se llevó a cabo porque la turbulencia generada por la turbina (1500 rpm) provocaba la salida de los nutrientes. A medida que transcurría el tiempo, se formaba una película bacteriana alrededor de la media de nylon (Figura 3.7), la cual impedía paulatinamente que tanto los nutrientes como las bacterias salieran de la tela de nylon, limitando así por transferencia de masa la eficiencia del biorreactor.

La Figura 4.35 muestra las UFC del C_{XENOB} generadas en el biorreactor.

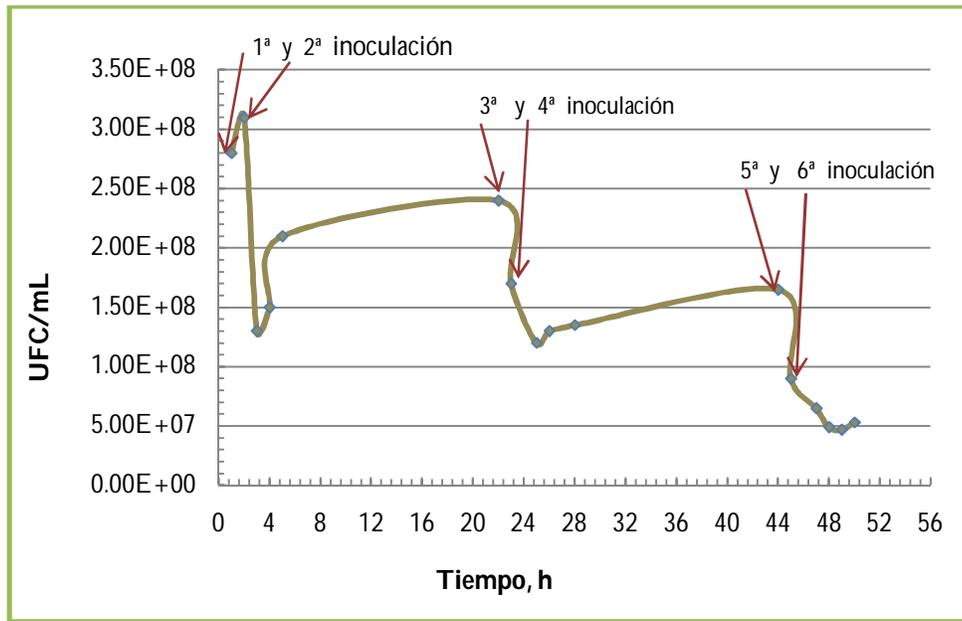


Figura 4.35 UFC generadas del C_{XENOB} en el biorreactor

La tendencia de las curvas de la Figura 4.34 es la misma que la Figura 4.35. Es muy notorio que las UFC crecieron exponencialmente en las dos primeras horas después del arranque de operación del biorreactor, las condiciones adecuadas permiten este gran ascenso, deduciéndose así que la reactivación del consorcio bacteriano dentro del biorreactor sucede inmediatamente. Como era de esperarse después de las descargas de cultivo bacteriano, las células viables disminuyeron fuertemente su cantidad a causa de las diluciones realizadas. De igual forma que lo sucedido con los sólidos, en cada derrame de cultivo las bacterias continúan reduciendo su población, sin embargo, hasta después de las 45 horas las UFC se reducen sólo una potencia. Por otro lado, la recuperación en las UFC ocurre inmediatamente después de la segunda inoculación, después de la cuarta inoculación la recuperación no es tan pronunciada como la anterior.

Estos datos expresan que la dilución del cultivo disminuye la población bacteriana, sin embargo, el sistema por si mismo se restablece porque el sustrato y nutrientes continúan presentes, el restablecimiento cada vez es menor al realizarse más diluciones del medio.

La Figura 4.36 presenta las UFC del C_{XENOB} en el SBR.

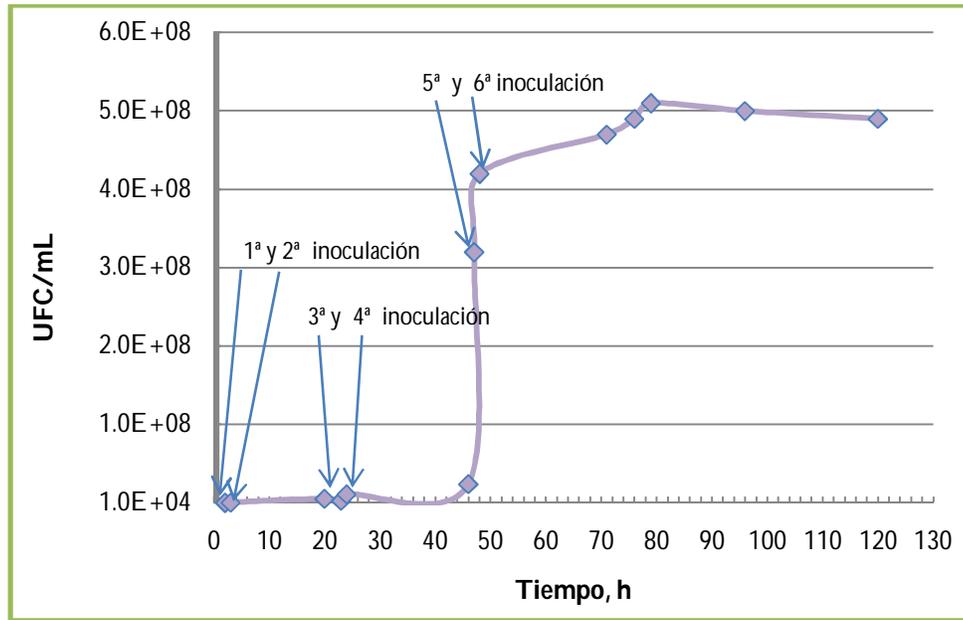


Figura 4.36 UFC del C_{XENOB} en SBR con inoculaciones sucesivas

La Figura 4.36 muestra el efecto contrario a la Figura 4.35, dado que el SBR es el que recibe al cultivo bacteriano proveniente del biorreactor. Las primeras cuatro inoculaciones son las que aportan el mayor conteo de UFC (partiendo desde cero y llegando hasta aproximadamente $1.00E+07$). El ascenso de las UFC es continuo y pronunciado hasta las 48 horas, la quinta inoculación incrementa un poco más las UFC aunque no tan marcadamente como lo hicieron las cuatro primeras, después de la sexta inoculación nuevamente hay una elevación de UFC pero notoriamente inferior con respecto a las anteriores inoculaciones. Con base en esta curva se decidió interrumpir las inoculaciones, pues el sistema posee una determinada capacidad en el medio de sustentar a una población bacteriana. Los factores principales involucrados en esta capacidad de mantenimiento celular son variados, entre los que sobresalen la cantidad de sustrato disponible, disponibilidad de oxígeno disuelto, contenido y cantidad de nutrientes.

Después de las 80 horas del comienzo del tratamiento, la curva de UFC se vuelve asintótica indicando la estabilidad en cuanto al conteo de la población bacteriana se refiere.

La Figura 4.37 muestra la biodegradación de DQO_s y COD con inoculaciones sucesivas.

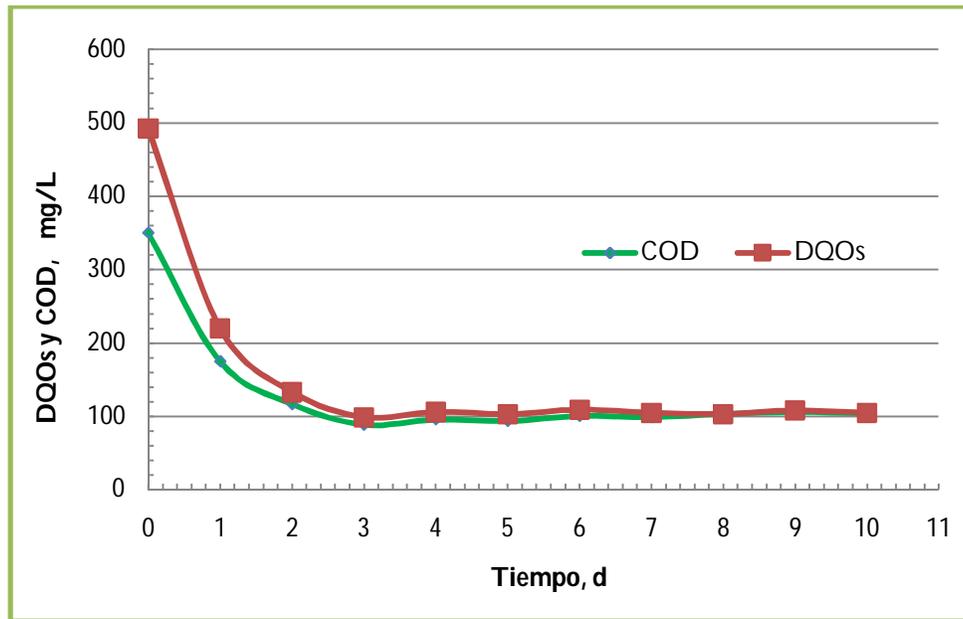


Figura 4.37 Biodegradación de DQO_s y COD con inoculaciones sucesivas

La biodegradación del sustrato representado como COD y DQO_s contenido en el agua contaminada se llevó a cabo los primeros 3 días de tratamiento. La tendencia de ambas curvas es análoga, siendo la biodegradación de COD ligeramente superior a DQO_s. La biodegradabilidad para DQO_s y COD se acentúa drásticamente el primer día, del segundo al tercer día continúa aunque de manera menos acelerada hasta llegar a una aparente estabilidad el resto del tratamiento. Este comportamiento indica que las primeras cuatro inoculaciones determinan en gran medida la máxima biodegradabilidad que se puede alcanzar en el tratamiento.

La relación DQO_s/COD calculada en el tercer día de tratamiento en inoculación directa fue de 1.31, para inoculaciones sucesivas fue de 1.11. La relación DQO_s/COD en el influente fue de 1.41. Al ser el valor de dicha relación más bajo en el efluente que en el influente se deduce que los materiales orgánicos en efluente ya fueron oxidados, esto indica que el efluente contiene compuestos que ya no son tan fáciles de degradar.

La Figura 4.38 muestra el porcentaje de remoción de DQO_s y COD en SBR con inoculaciones sucesivas.

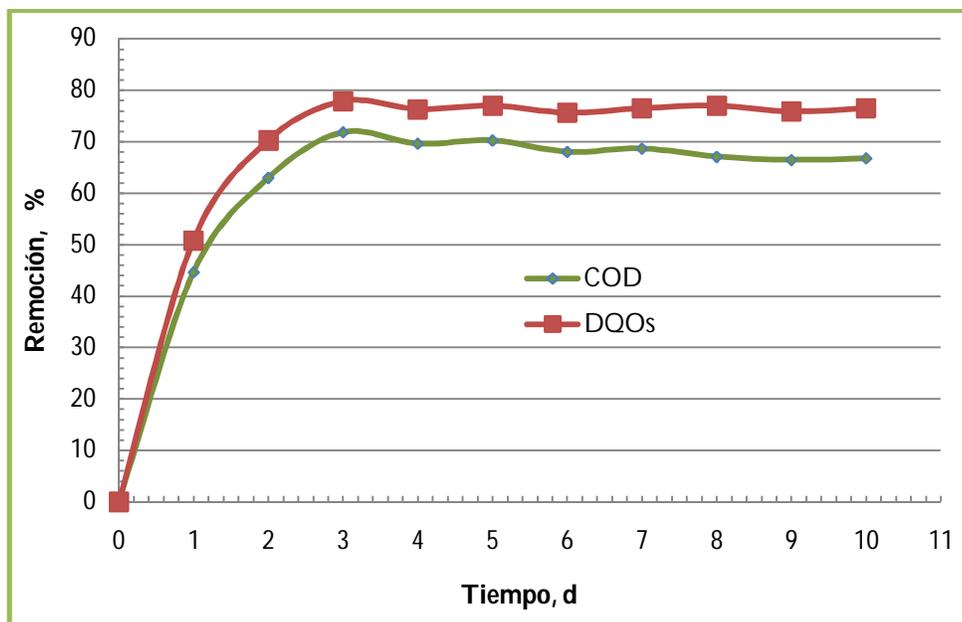


Figura 4.38 Remoción de DQO_s y COD en SBR con inoculaciones sucesivas del C_{XENOB}

Evidentemente la Figura 4.38 muestra que las cuatro primeras inoculaciones incrementan aceleradamente el porcentaje de remoción del COD y de la DQO_s. La quinta y sexta contribuyen sólo a reforzar o complementar el tratamiento. A pesar del cambio abrupto de medio al inocular al SBR, que involucra por ejemplo choque térmico y cambio de sustrato, la primera y segunda inoculaciones fueron las decisivas para lograr el tratamiento biológico del agua contaminada, este hecho significa que la reactivación inmediata (bacterias en fase de crecimiento exponencial) y la posterior inoculación bacteriana implica que los microorganismos tienen la capacidad de tomar como fuente de sustrato la fécula de maíz y rápidamente adaptarse a consumir los compuestos para los que comercialmente fueron especializados. El máximo porcentaje de remoción alcanzado fue del 72 % para el COD y del 78 % para la DQO_s obtenido a los 3 días de tratamiento, posteriormente el porcentaje disminuye tenuemente hasta los 10 días de tratamiento.

La Figura 4.39 muestra los SSV en el SBR con inoculaciones sucesivas del C_{XENOB}.

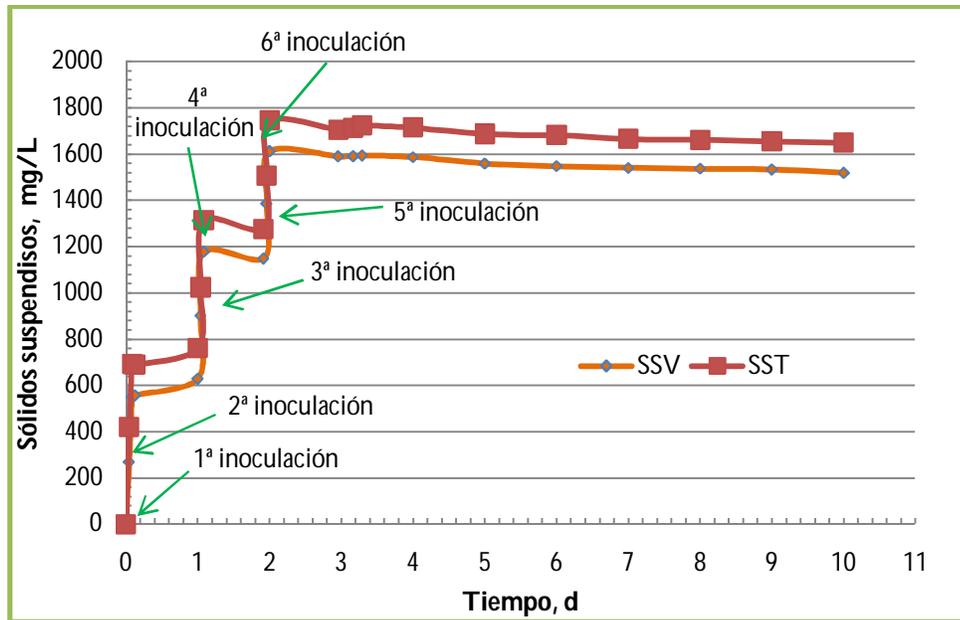


Figura 4.39 SSV en SBR con inoculaciones sucesivas del C_{XENOB}

La curva de la Figura 4.39 indica que alrededor de 1600 mg/L de SSV es la concentración apropiada o conveniente para lograr la máxima remoción posible de los contaminantes presentes en el agua de la ex refinería 18 de Marzo. Es posible incrementar aún más la concentración de microorganismos inoculados al sistema, y con ello incrementar los porcentajes de remoción de los parámetros de respuesta, sin embargo, la capacidad del sistema para mantener una adecuada cantidad o concentración de biomasa estuvo cerca del límite. Es de apreciarse que cuando no se realizaron las inoculaciones hay un ligero estancamiento de los sólidos, esto es debido a que al no continuar con la aportación del cultivo, el sistema tiende a estabilizarse y al realizarse las posteriores inoculaciones se contribuye al aumento de la biomasa.

El valor de la DBO_5 fue de 115 mg/L y el valor de la DQO_5 medido a las 12 horas después del arranque del tratamiento fue de 305 mg/L, resultado un índice de biodegradabilidad de 0.38. Este índice aumentó en 0.17 unidades con respecto al índice calculado del agua cruda, así que este parámetro indica que la biodegradabilidad del sustrato fue aumentada al emplear este tipo de bacterias.

La Figura 4.40 muestra la comparación de SSV en inoculación directa y en inoculaciones sucesivas.

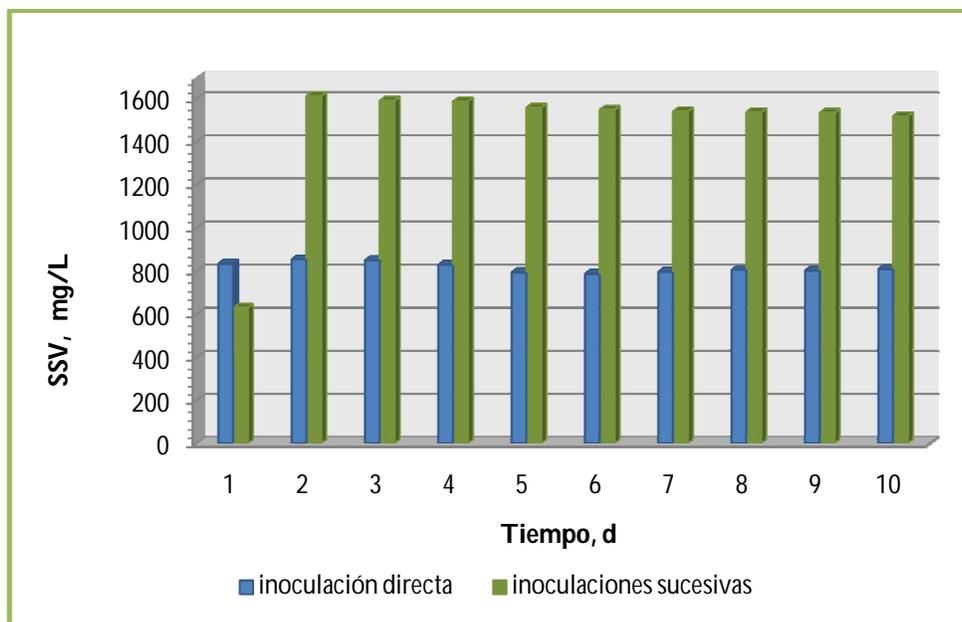


Figura 4.40 Comparación de SSV: inoculación directa e inoculaciones sucesivas en SBR con C_{XENOB}

Teóricamente se esperaba un incremento en la concentración de la biomasa para el tratamiento con inoculación directa de bacterias en el SBR, no sucedió así, ya que los sólidos se mantuvieron prácticamente constantes todo el tiempo. Lo que pudo haber ocurrido es que la película bacteriana formada alrededor de la tela de nylon impidió que las bacterias y nutrientes emergieran del medio que las contenía, así que la transferencia de masa obstaculizó el desempeño del tratamiento. Al inicio la degradación fue grande porque al no existir aún la película bacteriana el contacto entre los contaminantes o sustrato y las bacterias era aceptable. En el caso del tratamiento con inoculaciones sucesivas, sólo para el primer día la concentración de sólidos es inferior con respecto a inoculación directa, posteriormente se incrementa al doble debido a la continuas inoculaciones.

Las Figuras 4.41 y 4.42 muestran las fotografías ópticas en aumento de 40 y 20 X de los microorganismos en el biorreactor y en el SBR. En ambos reactores se observa la presencia, principalmente, de bacterias esféricas (cocos), bacterias en forma de bastones (bacilos), bacterias encorvadas (vibriones) y bacterias en forma de espiral (espiroquetas)

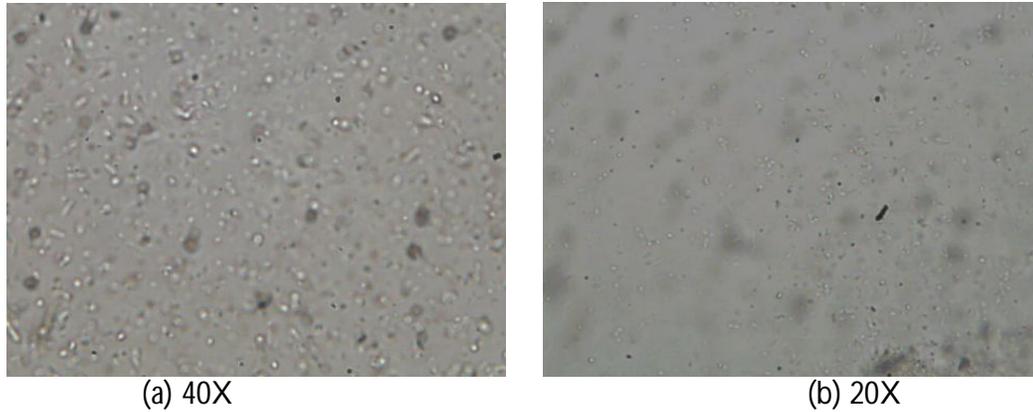


Figura 4.41 Microorganismos en el biorreactor después de 2 días del arranque del sistema

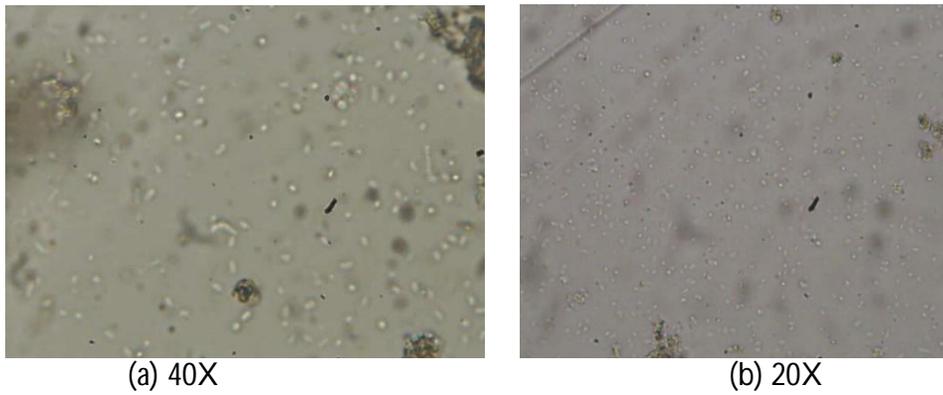


Figura 4.42 Microorganismos en SBR después de 2 días del arranque del sistema

Las Figuras 4.43 y 4.44 muestran las UFC que crecieron en las placas de recuento en medio TSA de una de las muestras de cultivo que se tomaron del biorreactor.

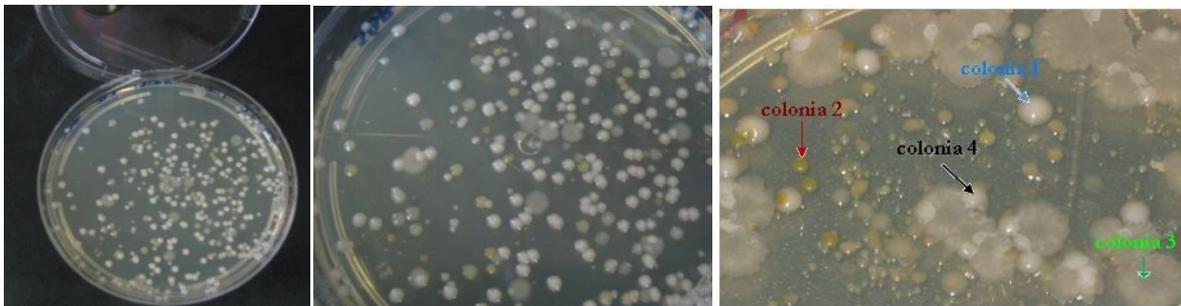


Figura 4.43 UFC presentes en el biorreactor

Se observa la presencia de cuatro diferentes colonias bacterianas: 1) colonia elevada, blanquecina de consistencia mucoide de diámetro aproximado de 3 a 4 mm, 2) colonia amarilla plana de consistencia mucoide de diámetro aproximado de 2 a 3 mm, 3) colonia blanquecina de consistencia esponjosa, rugosa,

irregular, de diámetro aproximado de 4 a 6 mm y 4) colonia puntiforme, translúcida de consistencia mucoide de diámetro aproximado de 1 a 2 mm.

Posterior a la incubación en medio TSA se tomó una muestra de cada una de las colonias para realizarse tinción diferencial Gram, teniendo como resultado que la colonia uno está conformada por bacilocos Gram negativos; la colonia dos por bacilos; la colonia tres por bacilos Gram negativos; y la colonia cuatro por bacilocos Gram negativos.

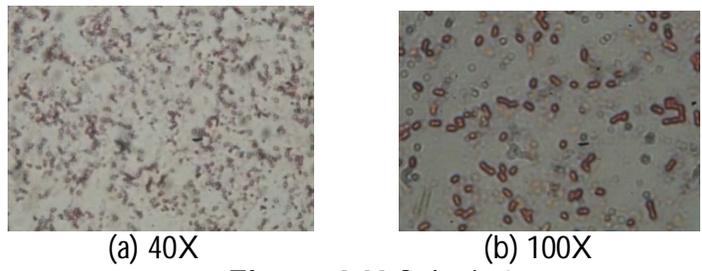


Figura 4.44 Colonia 1

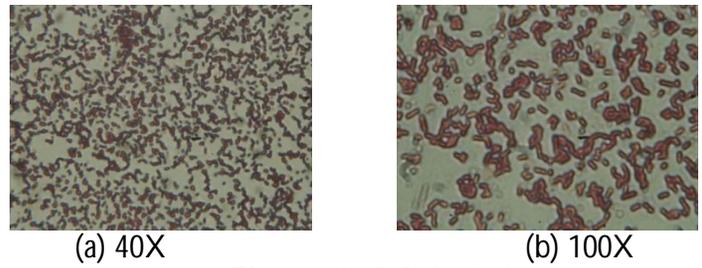


Figura 4.45 Colonia 2

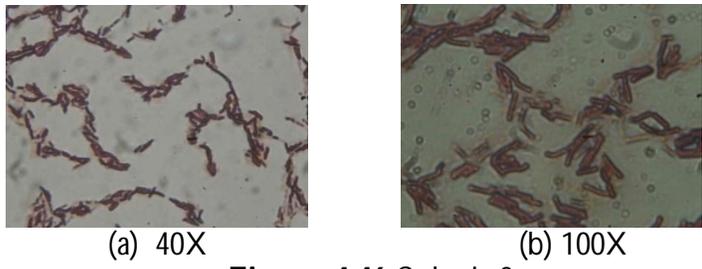


Figura 4.46 Colonia 3

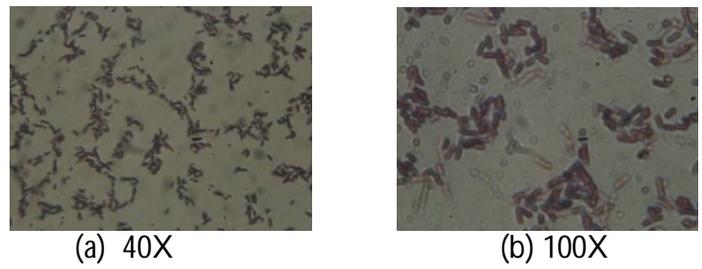


Figura 4.47 Colonia 4

En las pruebas de reactores por lote se concluye que el tiempo de retención hidráulico, la aclimatación y el tipo de especies microbianas jugaron un papel primordial en el desempeño del tratamiento biológico. El tiempo de retención hidráulico necesario para lograr la máxima degradación bajo las mismas condiciones operacionales fue de 2 días para los tres consorcios. La aclimatación permitió incrementar la concentración de biomasa y por ende la biodegradabilidad para los tres consorcios, indicando así que a pesar de que X^2_{XENOB} y X^2_{HC} fueron comercialmente entrenados para llevar a cabo la degradación de compuestos derivados del petróleo requieren al igual que X^2_{PTARCU} de la adaptación para lograr su máxima potencialidad degradativa. El tipo de especies microbianas fue concluyente; el X^2_{HC} posee degradación limitada, el X^2_{XENOB} presentó un espectro de degradación más amplio que los otros dos, y el X^2_{PTARCU} tuvo un comportamiento similar al X^2_{XENOB} , pero con un menor desempeño.

El C_{XENOB} fue elegido para la realización de las pruebas de bioaumentación con inoculación directa hacia el SBR y con reactivación en el biorreactor para realizar inoculaciones sucesivas hacia el SBR.

En la prueba de bioaumentación sin previa reactivación hacia el SBR, del arranque al primer día los resultados relevantes son la disminución drástica de la carga orgánica, el porcentaje de remoción de DQO_5 y COD fue el mayor alcanzado (69 y 66 %, respectivamente), y el incremento del índice de biodegradabilidad a las 12 horas de tratamiento con respecto al del influente fue del 54 %. Concluyéndose así que no es necesario incubar el C_{XENOB} en condiciones adecuadas para reactivarlas ya que las bacterias esporuladas activan inmediatamente sus capacidades metabólicas para crecer y reproducirse. Sin embargo, la reactivación llevada a cabo en un biorreactor para posteriores inoculaciones hacia el SBR logra incrementar los porcentajes de remoción.

En la prueba de bioaumentación empleando un biorreactor para llevar a cabo una previa reactivación del consorcio y efectuar inoculaciones sucesivas hacia el SBR los resultados relevantes son que del arranque hasta el tercer día de tratamiento la carga orgánica disminuyó considerablemente, el máximo porcentaje de remoción alcanzado fue del 72 % para el COD y del 78 % para la DQO_5 . El incremento del índice de biodegradabilidad a las 12 horas con respecto al del influente fue del 45 %. Por tanto se concluye que la reactivación bacteriana en condiciones adecuadas para su posterior inoculación determina el mejoramiento en el desempeño del SBR con respecto al tratamiento sin previa reactivación.

1. Abalos, A., Viñas, M., Sabaté, M., Manresa, A., Solanas, A. 2004. *Enhanced biodegradation of casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by pseudomonas aeruginosa AT10*. Biodegradation 15. pp. 249-260.
2. ABD-EL-HALEEM, D., 2003. *Acinetobacter*: Environmental and Biotechnological Applications. African J. Biotechnol., 2, 71–74.
3. Adav, S.S and Lee, D.J. 2008. *Single-culture aerobic granules with Acinetobacter calcoaceticus*. Appl Microbiol Biotechnol 78:551-557.
4. Adav, S.S., Chen, M.Y., Lee, D.J and Ren, N.Q 2007a. *Degradation of phenol by Acinetobacter strain isolated from aerobic granules*. Chemosphere. 67:1566-1572.
5. Aguilar, L. 2005. *Determinación de los procesos de contaminación al subsuelo por compuestos orgánicos de fase no-acuosa más ligeros que el agua, en medios de baja permeabilidad. Alternativas de remediación*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
6. Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Madrid: Academic Press, San Diego, USA.
7. Alexander, M. 1999. *Biodegradation and bioremediation*. San Diego, USA; Academic Press,. Pp. 453. ISBN 978-0-12-049861-1.
8. Altamira, N.R., Marín, J.C. Fernández, N. 2005. *Degradación de fenoles totales durante el tratamiento biológico de aguas de producción petroleras*. Maracaibo: Ciencia. Vol. 13, 3.
9. Amann, R.L., Ludwig, W and Schleifer, K.H. 1995. *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. s.l. Microbiol Rev. Vol. 59.
10. Antizar-Ladislao, B and Lopez-Real, Beck, A.J. 2004. *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated waste using composting approaches*. s.l. Critical Reviews in Environmental Science & Technology. Vol. 34.
11. Atlas, R.M and Cerniglia, C.E. 1995. *Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation*. Vol. 45.
12. Atlas, R.M and Cerniglia, C.E. 1995. *Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation*. Vol. 45.
13. Atlas, R.M. 1992. *Molecular methods for environmental monitoring and containment of genetically engineered microorganisms*. Biodegradation 3, 137.
14. Atlas, R.M., Boehm, P.D and Calder, J.A. 1981. *Chemical and biological weathering of oil from the Amoco Cadiz spillage, within the littoral zone*. s.l. Estuar. Coast Shelf Sci. Vol. 12.
15. Bathe, S., Schwarzenbeck, N and Hausner, M. 2005. *Plasmid-mediated bioaugmentation of activated sludge bacteria in a sequencing batch moving bed reactor using pNB2*. s.l. The society for Applied Microbiology. Vol. 41.

16. Bennett, P. C., Siegel, D.E., Baedecker, M.J and Hult, M.F. 1993. *Crude oil in a shallow sand and gravel aquifer-I. Hydrogeology and inorganic geochemistry*. s.l. Applied Geochemistry. Vol. 8, 529 - 549.
17. Boeris, P.S, Domenech, C.E and Lucchesi, G.I. 2007. *Modification of phospholipid composition in Pseudomonas putida A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium*. Córdoba, Argentina. Journal of Applied Microbiology.
18. Brenner, A., Chozick, R and Irvine, R.L. 1992. *Treatment of high strength mixed phenolic waste in an SBR*. s.l. Wat. Environ, Res.
19. Bressler, D., Balzer, M., Dannehl, A., Flemming, H-C and Wingender, J. 2009. *Persistence of Pseudomonas aeruginosa in drinking-water biofilms on elastomeric material*. Germany. Water Science & Technology. Water supply. Vol. 9.1.
20. Buitrón, G., González, A., López, L. 1998. *Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria*. *Water Sci. Technol.* 37: 371-378.
21. Campbell, M. K and Farrell, S.O. 2004. *Bioquímica*. S.l. Editorial Thomson. Cuarta edición. pp. 143
22. Casellas, M., Grifoll, J., Solanas, A. 1998. *Isolation and characterization of a 9-fluorenone degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorine by a consortium*. *Can. J. Microbiol.* 44: 734-742.
23. Coronado, F., Travieso, M.L and Urgel, M. 2008. *Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by Pseudomona putida*. Granada, España: FEMS Microbiol Lett. Vol. 288.
24. Chapelle, F.H. 1999. *Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated ground water: the perspectives of history and hydrology*. s.l. Ground Water. Vol. 37, pp. 122-132.
25. Chong, N., Pai, S.L and Chen, C.H. 1996. *Bioaugmentation of an activated sludge receiving pH shock loadings*. Taiwan: Bioresource Technology. Vol. 59.
26. Chong, N.M., Pai, S.L and Chen, C.H. 1996. *Bioaugmentation of an activated sludge receiving pH shock loadings*. Taiwan: Bioresource Technology. Vol. 59.
27. Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M and Verstraete, W. 2001. *Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links*. s.l. Environmental Microbiology. Vol. 3.
28. Demergasso, S., Galleguillos, P., Escudero, G., Lam, E. 2000. *Estudio de la cinética de bioconversión de aguas residuales en la producción de agua potable*. XXVII Congreso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre, Brasil, 3-8 de diciembre 2000.
29. Denger, K., Mayer, J., Hollemeyer, K and Cook, A. 2008. *Amphoteric surfactant N-oleoyl-N-methyltaurine utilized by Pseudomonas alcaligenes with excretion of N-methyltaurine*. Saabrucken, Germany: Fems Microbiol Lett. Vol. 288.
30. Diario Oficial de la Federación (DOF). 2000. *Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización*. . s.l. Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de la Salud.

31. Dionisi, D., Bertin, L., Bornoroni, L., Capodicasa, S., Papini, M.P and Fava, F. 2006. *Removal of organic xenobiotics in activated sludge under aerobic conditions and anaerobic digestion of the adsorbed species*. s.l. Chem Technol. Biotechnol. Vol. 81.
32. Drouin, M., Lai, C.K., Tyagi, R.D and Surampalli, R.Y. 2008. *Bacillus licheniformis proteases as high value added products from fermentation of wastewater sludge: pre-treatment of sludge to increase the performance of the process*. Quebec, Canada: s.n. Vol. Water Science & Technology, 57.3.
33. Edmunds, W.M., Carrillo-Rivera, J.J and Cardona, A. 2002. *Geochemical evolution of groundwater beneath*. Mexico City . s.l. Journal of Hydrology. Vol. 258.
34. Eikelboom, D. 1975. *Filamentous organisms observed in activated sludge*. Wat. Res. 9, 365-388.
35. Eikelboom, D. 1977. *Identification of filamentous organisms in bulking activated sludge*. Wat. Tech.8.
36. Fan, C.Y and Krishnamurthy, S. 1995. *Enzymes for enhancing bioremediation of petroleumcontaminated soils: a brief review*. s.l. Air Waste Manage. Vol. 45, 453-460.
37. Ferguson, A.S. 2007. *Microbial analysis of soil and groundwater from a gasworks site and comparison with a sequenced biological reactive barrier remediation process*. s.l. J Appl Microbiol. Vol. 102.
38. Ferguson, S.H., Franzmann, P.D., Revill, A.T., Snape, I and Raynar, J.L. 2003. *The effects of nitrogen and water mineralisation of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial antartics soils*. s.l. Cold Reg Sci Technol. Vol. 37.
39. Flores, P.M., Torras, O.S and Téllez, G.R. 2004. *Medidas de contaminación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre*. México: Secretaría de Telecomunicaciones y Transporte. 257.
40. Fonseca, F. 1998. *Bioproducto para combatir derrames de petróleo en el mar*. Tesis de maestría. Universidad de la Habana Cuba.
41. Gaoa, Y., Yu, X.Z., Wu, S.C., Cheung, K.C., Tamb, N.F.Y., Qian, P.Y and Wong, M.H. 2006. *Interactions of rice (Oryza sativa L.) and PAH-degrading bacteria (Acinetobacter sp.) on enhanced dissipation of spiked phenanthrene and pyrene in waterlogged soil*. Sci Total Environ 342:1-11.
42. Geankoplis, C.J. 2007. *Procesos de transporte y principios de procesos de separación*. s.l. Grupo Editorial Patria.
43. Gerardi, M.H. 2006. *Wastewater bacteria*. New Jersey: Wiley-Interrscience.
44. Gil, R. 1998. *Demanda bioquímica de oxígeno de efluentes con productos xenobióticos*. Vol. 5 No. 4 pp. 47.
45. González, O. 1994. *Un algoritmo para optimizar el diseño hidráulico de reactores discontinuos*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ingeniería Ambiental. s.l. Departamento de estudios de posgrado, Facultad de Ingeniería, UNAM.
46. Gordon, L and Dobson, A.D.W. 2001. *Fluoranthene degradation in Pseudomonas alcaligenes PA-10*. s.l. Biodegradation. Vol. 12.
47. Grifoll, M., Selifonov, A., Gatin, S., Chapman, P. 1995. *Actions of a versatile fluorene degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3711-3723.

48. Hater, R.G and Goldsmith, D.C. 1989. *Bioremediation System*. 4850745 Estados Unidos, Julio 25.
49. Ingraham, L., Ingraham, C. 1997. *Introducción a la microbiología*. Ed. Reverté, S.A. de C.V.
50. Irvin, R., Miller, A and Bhamrah. 1979. *Sequencing batch biological reactors an overviews*, J. Water Pollut. Control Fed. 51.
51. Ishii, S., Koki, J., Unno, H and Hori, k. 2004. *Two morphological types of cell appendages on a strongly aghesive bacterium, Acinetobacter sp. Strain*. Tol. 5. Appl Environ Microbiol 70:5026-5029.
52. Johri, A.K., Blank, W., Kaplan, D.L. 2002. *Bioengineered emulsans from Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 transposon mutants*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59:217-223.
53. Kaplan, C.W and Kitts, C.L. 2004. *Bacterial succession in a petroleum land treatment unit*. s.l. Appl Environ Microbiol. Vol. 70.
54. Kayalvizhi, N and Gunasekaran, P. 2008. *Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from Bacillus licheniformis MKU3*. Madurai, India: Letters in Applied Microbiology. Vol. 47.
55. Kazunga, C., Aitken, M. 2000. *Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria*. Appl. Environ Microbiol. 66: 1917-1922.
56. Kazunga, C., Aitken, M., Gold y Sangaiah, R. 2001. *Fluoranthene-2,3 and -1.5-diones are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene*. Environ. Sc. Technol. 35: 917-922.
57. Kim, D.J., Choi, J.W., Choi, N.C., Mahendran, B and Lee, C.E. 2005. *Modeling of growth kinetics for Pseudomonas ssp. during benzene degradation*. Korea : Appl. Microbiol Biotehnlol. 69.
58. Lazcano, L.M. 2010. *Estudio de la oxidación química y de la biodegradabilidad en la depuración del efluente acuoso final de una refinera: eliminación de fenoles e hidrocarburos*. México: s.n.
59. Leahy, J.G. and Colwell, R. 1990. *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment*. Microbiol Rev 54: 305-315.
60. Lee, S.H., Kim, D.Y and Kim, J.D. 2007. *Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions*. s.l. J Hazard Mater. Vol. 143.
61. López, R., Nuñez, O., Morales, F., Calderón, C., and Liewald, W. 1999. *Aplicación de sistemas oxidantes avanzados en el tratamiento de aguas residuales de la Industria Petrolera (sistema Fenton*. Acta Científica Venezolana, Vol. 50, No.1, pp. 75-80.
62. Madigan, T.M., Martinko, M.J., Parke, r J. 2004. *Biología de los microorganismos*. Madrid : Prentice Hall.
63. Magot, M, Ollivier, B and Patel, .K.C. 2000. *Microbiology of petroleum reservoirs*. s.l. Antonie Van Leeuwenhoek. Vol. 77.
64. Margesin, R and Schinner, F. 2001. *Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil contaminated soil in an alpine glacier skiing area*. s.l. Appl Environ Microbiol. Vol. 67.
65. Martínez, S and Rodríguez, M. 2005. *Tratamiento de aguas residuales con Matlab*. México, D.F: Reverté, S.A.
66. Merchuk, J. 1994. *Microbiología Industrial*. Ed. Acriba.

67. Metcalf, Eddy. 2004. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. New York : Mc Graw Hill. Vol. 4th ed.
68. Molin, S. 1993. *Environmental potential of suicide genes*. Curr. Opin. Biotechnol. 4, 299.
69. Moore E. 2006. *Non medical: Pseudomonas*. The Prokaryotes. Springer, 3(6), p. 646-703.
70. Morales-Mejia, J.C. 2006. *Remoción biológica simultánea de fósforo y nitrógeno de agua residual en un reactor de lecho móvil*. s.l. : Instituto de Ingeniería, UNAM, 2006.
71. Moreno, I., Buitrón, G. 2004. *Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol*. Wat.Sci.Technol. 50: 251-258.
72. Movahedyan, H., Khorsandi, H., Salehi, R and Nikaeen, R. 2009. *Detection of phenol degrading bacteria and Pseudomonas putida in activated sludge by polymerase chain reaction*. Isfahan, Iran: J. Environ. Health. Sci. Eng. Vol. 6, 2.
73. Nápoles, J. 2005. *Ensayos de tratabilidad en suelos contaminados con petróleo*. s.l. Tesis en opción al título de Máster en Biotecnología. Mención Ambiental. Universidas de Oriente.
74. Nápoles, J. 2005. *Ensayos de tratabilidad en suelos contaminados con petróleo*. s.l. Tesis en opción al título de Máster en Biotecnología. Mención Ambiental. Universidas de Oriente.
75. Noordman, W. H and Janssen, D. B. 2002. *Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by Pseudomona aeruginosa*. s.l. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 68.
76. Noordman, W.H and Janssen, D.B. 2002. *Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by Pseudomona aeruginosa*. s.l. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 68.
77. Norma Mexicana, NMX-AA-003-1980. Aguas residuales. Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de marzo de 1980.
78. Norma Mexicana, NMX-AA-008-SCFI-2001. Análisis de agua. Determinación del pH. Método de prueba.
79. Norma Mexicana, NMX-AA-026-SCFI-2001. Análisis de agua. Determinación de nitrógeno Kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.
80. Norma Mexicana, NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de agua. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO₅) y residuales tratadas.
81. Norma Mexicana, NMX-AA-029-SCFI-2001. Análisis de agua. Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.
82. Norma Mexicana, NMX-AA-03-SCFI-2001. Análisis de agua. Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.
83. Norma Mexicana, NMX-AA-30-SCFI-2001. Análisis de agua. Determinación de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de diciembre de 2000.
84. Norma Oficial Mexicana, NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, *Límites máximos permisibles de*
85. Novozymes, Biologicals Inc. 2003.

86. Orozco, C., Pérez, A., González, M., Rodríguez, F., Alfayate, J. 2004. *Contaminación ambiental: una visión desde la química*. Primera edición. Thomson. Madrid, España. pp. 453-450.
87. Ortíz, B., Ize, L and Gavilán, G. 2003. *La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México*. Gaceta ecológica. INE-SEMARNAT MÉXICO. 69, pp. 83-92.
88. Pandya, M.T. 2007. *Treatment of industrial wastewater using photooxidation and bioaugmentation technology*. Mumbai, India: Water Science & Technology. Vol. 56, 7.
89. Pinto, M., Arruda, G, K., Franceschi, A and Bonotto, M.D et al. 2007. *Laboratory Study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station*. s.l. Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 38.
90. Piróllo, M.P., Mariano, A.P., Lovaglio, R.B., Costa, S.G., Walter, V., Hausmann, R and Contiero, J. 2008. *Biosurfactant synthesis by Pseudomonas aeruginosa LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site*. São Paulo, Brasil: Journal of Applied Microbiology. Vol. 105.
91. Plangklang, P and Reungsang, A. 2009. *Bioaugmentation of carbofuran by Burkholderia ceparia PCL3 in a bioslurry phase sequencing batch reactor*. Thailand: Process Biochemistry. Vol. 45.
92. Popp, N., Schlomann, M and Mau, M. 2006. *Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils*. s.l. Microbiology. Vol. 152.
93. Prince, R.C, Parkerton, T.F and Lee, C. 2007. *The primary aerobic biodegradation of gasoline hydrocarbons*. s.l. Environ. Sci. Technol. Vol. 41.
94. Rajani, Ch., Rambabu, N., Himabindu, V and Y Anjaneyulu. 2009. *A comparison of production of rhamnolipid biosurfactant by two different strains of Pseudomonas aeruginosa using various economical nutrient sources*. India: The Icfai University Journal of Environmental Sciences. Vol. III, 1.
95. Ramalho, R. 2003. *Tratamiento de Aguas Residuales*. Ed. Reverté, S.A. de C.V. 253-254.
96. Rodrigues, C., Madeira, L and Boaventura, R. 2009. *Treatment of textile effluent by chemical (Fenton's Reagent) and biological (sequencing batch reactor) oxidation*. Portugal : Journal of Hazardous Materials , 2009. Vol. 172.
97. Rodríguez, A., Fernández, A and Letón, P. 2006. *Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales*. Madrid: CEIM Dirección General de Universidades e Investigación.
98. Rodríguez, G.J.F. 2006. *Introducción a la biotecnología*. México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco.
99. Rodríguez, J.F., Mayorga, J.L., Quintana, M.B., Contreras, J.L., Gordon, M.D. 2002. *Equipo para el desarrollo de microorganismos para degradación de compuestos orgánicos*. México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana, IPN-E.S.I.Q.U.I.E.
100. Rosenberg, E. 1992. *The hydrocarbon-oxidizing bacteria*. s.l. Springer Verlag, Heidelberg, Germany.
101. Rozich, A.F and Colvin, R.J. 1985. *Effects of glucose on phenol biodegradation by heterogeneous populations*. . s.l. Biotechnol Bioeng. Vol. 28.

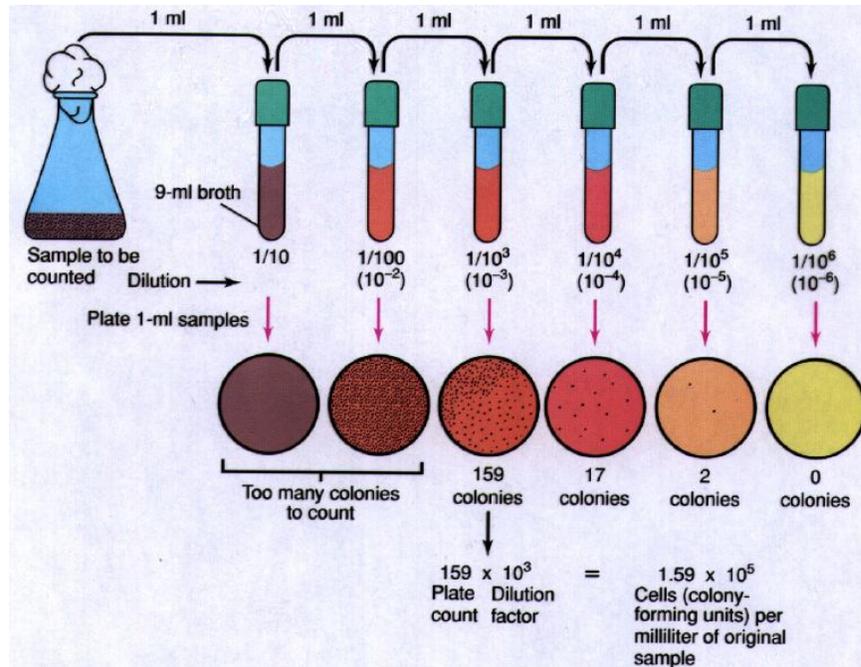
102. Rozich, A.F., Gaudy, A.F. and D'Adamo, P.D. 1983. *Predictive model for treatment of phenolic wastes by activated sludge*. s.l. Water Res.
103. Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A.H. and Es'haghi, Z. 2009. *Separation and determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene compounds in water using directly suspended droplet microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector*. Iran: Elsevier B.V. Vol. 78.
104. Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O.P. 2004. *Developments in the use of Bacillus species for industrial production*. s.l. Can J Microbiol. Vol. 50.
105. Segura, J.B. 2007. *Efecto de la variación de oxígeno disuelto en la velocidad específica de nitrificación de agua y agua residual enriquecida con amonio*. México: s.n., 2007.
106. Shi, X.Y., Sheng, G.P., Li, X.Y. and Yu, H.Q. 2009. *Operation of a sequencing batch reactor for cultivating autotrophic nitrifying granules*. Hong Kong: Bioresource Technology. Vol. 101.
107. Sille Bendix Larsen., Dimitar Karakashev., Irini Angelidaki and Jens Ejbye Schmidt. 2008. *Ex-situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge*. s.l. Journal of Hazardous Materials. Vol. 164.
108. Sirianuntapiboon, S. and Boonchupleing, M. 2008. *Effect of bio-sludge concentration on the efficiency of sequencing batch reactor (SBR) system to treat wastewater containing Pb²⁺ and Ni²⁺*. Bangkok: Journal of Hazardous Materials. Vol. 166.
109. Sobiecka, E., Cedzyska, K., Bielski, C. and Antizar-Ladislao, B. 2008. *Biological treatment of transformer oil using commercial mixtures of microorganisms*. s.l. International Biodeterioration & Biodegradation. Elsevier. Vol. 63.
110. Srivastava, S., Yadav, A., Seem, S., Mishra, S., Chaudhary, V. and Nautiyal, C.S. 2008. *Effect of high temperature on Pseudomonas putida NBR10987 biofilm formation and expression of stress sigma factor RpoS*. India: Curr Microbiol. Vol. 56.
111. Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R., *The Microbial World*, 5th edn. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Co, 1986.
112. Tortora, J., Funke, R., Case, C. 2007. *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.
113. Tychinskii, V.P., Nikolaev, Y.A., Lisovskii, V.V., Kretushev, A.V., Vyshenskaya, T.V., Muluyukin, A.L., Suzina, N.E., Duda, V.I. and El-Registan, G.I. 2007. *Research on the Early Stages of Spore Germination*. Moscow, Russian: Microbiology. Vol. 76, 2.
114. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2000. *Fact Sheet. Drinking Water Advisory: Consumer Acceptability Advice and Health Effects Analysis on Methyl Tertiary-Butyl Ether (MTBE)*. Washington : s.n., 1997.
115. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2000. *National Water Quality Inventory. Groundwater and Drinking Water Chapters*. Washington: Environmental Protection Agency.
116. Van Limbergen, H., Top, E.M. and Verstraete, W. 1998. *Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives*. s.l. Appl. Microbiol Biotechnol. Vol. 50.
117. Vázquez-Sánchez, E. and Jaimes-Palomera, R. 1989. *Geología de la cuenca de México*. s.l. Geofis. Int. Vol. 28.

- 118.Velasco, Francisco. 2008. Agencia Latinoamericana de Información. [Online] Junio 3, 2008. [Citado: agosto lunes, 2011] <http://alainet.org/active/24456&lang=es>.
- 119.Venkata, M.S., Falkentoft, C., Venkata, N.Y., Sturm, B.S., Wattiau, P., Wilderer, P.A., Wuertz, S and Hausner, M.. 2008. *Bioaugmentation of microbial communities in laboratory and pilot scale sequencing batch biofilm reactors using the TOL plasmid*. Toronto: Bioresource Technology. Vol. 100.
- 120.Vieira, P.A., Faria, S., Vieira, R.B., De França, F.P., and Cardoso, V.L. 2008. *Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology*. Rio de Janeiro: World J Microbiol Biotechnol. Vol. 25.
- 121.Vieira, P.A., Vieira, R.B., de França, F.P., and Cardoso, V.L. 2007. *Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline*. J Hazard Mater. 140, 1-2, pp.52-9.
- 122.Vieira, P.A., Vieira, R.B., Faria, S., Ribeiro, E.J and Cardoso, V.I. 2009. *Biodegradation of diesel oil and gasoline contaminated effluent employing. Biodegradation of diesel oil and gasoline contaminated effluent employing*. pp. 1-7. Journal of Hazardous Materials. Volume: 168, Issue: 2-3, Pages: 1366-1372
- 123.Viñas, M. 1999. *Biorremediación de aguas contaminadas por hidrocarburos*. Maestría en biología experimental. Departamento de biología. Universidad de Barcelona.
- 124.Wang, M., Yang, G., Min, H., Lv, Z and Jia, X. 2009. *Bioaugmentation with the nicotine-degrading bacterium Pseudomonas sp. HF-1 a sequencing batch reactor treating tobacco wastewater: Degradation study and analysis of its mechanisms*. s.l. Journal of Hazardous Materials. Vol. 43.
- 125.Wilderer, P., Irvin, R and Goronszy, M. 2001. *Sequencing Batch Reactor Technology*. s.l. IWA Scientific and Technical Report , Inglaterra. Vol. 10.
- 126.Yoong, E and Lant, P. 2001. *Biodegradation of high strength phenolic wastewater using SBR*. s.l. Wat Sci Technol. Vol. 42, 3.

ANEXO 7.1 Técnica de dilución y siembra en placa

Los pasos a seguir son ocho y son los siguientes:

- 1.- Hacer diluciones decimales del cultivo de 10^{-5} hasta 10^{-9} en condiciones estériles. Se colocan en cajas de Petri con agar soya tripticaseína por triplicado 0.1 mL de las últimas tres diluciones.
- 2.- Distribuir cuidadosamente el inóculo en toda la caja con ayuda de una varilla de vidrio doblada en "L" previamente esterilizada a la flama del mechero y enfriada.
- 3.- Dejar absorber el líquido durante 10 minutos.
- 4.- Incubar las cajas en forma invertida a 35° durante 24-48 horas.
- 5.- Hacer la cuenta de las colonias de las placas, seleccionando la dilución donde el número de colonias sea entre 30 y 300.
- 6.- Se calcula el número promedio de colonias por dilución y este número se multiplicará por el inverso de la dilución X10 (por ajuste de volumen inoculado) para obtener el número total de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en la muestra original.



BIOREMEDIATION SYSTEM

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention relates broadly to a bioremediation system and more specifically to a microbiological process for treating soil contaminants by metabolizing the components of petroleum hydrocarbons, such as gasoline, to CO₂ and water.

Typical in situ bioremediation systems introduce organisms and/or stimulate the indigenous bacteria. This technique can take periods of time up to several months depending on the hydrogeological setting. There exists a continuing need for improved bioremediation techniques which can be activated on demand when needed, and which are convenient and economical to use.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is directed to the concept of the *Bacterial Contaminant Interceptor™ (BCI)™ for use at sites requiring remediation of soil left in-place. The BCI uses selected bacteria capable of metabolizing all the components of petroleum hydrocarbons such as gasoline, diesel fuel, kerosene and used oil to CO₂ and water. *BCI is a biochemical filter in *Trademark of Sybron Chemicals Inc., Birmingham, N.J. which digestible gases feed the bacteria as air moves through the soil and pea gravel media. By contrast, soil venting generally uses more air and the air is passed through carbon for adsorption of the gasoline.

The BCI offers several advantages over conventional bioremediation techniques and soil venting. Some of these advantages are listed below:

1. Typical in situ bioremediation moves introduced organisms and/or stimulates the indigenous bacteria. This can take several months depending on the hydrogeologic setting. Through the present invention, time and services are saved by placing inactive dry bacteria in-place during reconstruction of a gasoline service station.

2. The bacteria in the BCI digest the benzene, toluene, and xylene fractions of gasoline directly, not through cometabolism like most indigenous organisms.

3. Since the gasoline vapors will be destroyed in situ, contingent liability will be reduced and the amount of carbon will be reduced or eliminated.

4. In grossly contaminated soils, greater than 500 ppm, the savings can be substantial by decreasing the time and spent carbon cost.

5. In porous soils the BCI will be extended into the contaminated area thereby utilizing in situ treatment to speed the entire reclamation process.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a perspective view of one embodiment of the piping structure of the present invention.

FIG. 2 is a side cross-sectional view of a tank placement area utilizing the piping structure of FIG. 1.

FIG. 3 is a side cross-sectional view of a tank placement area utilizing an alternative embodiment of the piping structure of FIG. 1.

FIG. 4 is a side cross-sectional view of a tank placement area utilizing a further embodiment of the piping structure of FIG. 1.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

A typical application of the present invention is in the bioremediation of contaminated soil caused by a tank leak of gasoline or other petroleum hydrocarbons at a service station. The leaking tank(s) is first removed, leaving a cavity. Soil remaining in the tank cavity is made approximately level and bacteria cultures in dry form are distributed either by hand or with a rotary lawn spreader. The cultures are typically the ABR™ - gasoline blend. These are placed on a suitable carrier such as a bran fiber and dried to about 7 to 10% moisture. In this state they remain viable for at least one year before their population density decreases significantly. Initial microbial populations on the tank pit floor should be in the range of about 1 × 10¹⁰ to 1 × 10¹² bacteria/foot squared. These microbes will become active when water and nutrients are later added to activate the system.

Suitable cultures available for use in the present invention are available under the ABR Trademark from Sybron Chemicals, Inc. of Birmingham, N.J. and are listed below in the Table.

TABLE

ABR™ GASOLINE CULTURE	
95%	<i>Pseudomonas putida</i>
5%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ABR™ DIESEL CULTURE	
20%	<i>Pseudomonas putida</i>
20%	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
20%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
30%	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i>
10%	<i>Bacillus licheniformis</i>
100%	
ABR™ SOLVENT CULTURE	
100%	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> bio. anitratus (<i>acicba</i>) for methyl ethyl ketone and methyl isobutyl ketone
100%	<i>Pseudomonas putida</i> for benzene, toluene or xylene

Pea gravel, having a size range of about ½ to 1 inch is then spread to a depth of about six to nine inches over the applied dry culture. Distribution piping is then laid out on top of the pea gravel at desired intervals with notches or holes through the pipe wall thickness about every three feet. One or two inch diameter piping made of black iron or galvanized steel able to withstand the weight and pressure from the fresh compacted fill dirt and gasoline tanks has been found to be suitable. All piping is connected to a central header with a vertical stand pipe for future hookup to be more fully described in conjunction with the drawings.

Pea gravel is then placed over the installed piping to a depth of about six to eighteen inches. Fill dirt and reconstruction relating to installation of the gasoline tank(s) can then commence. Lost time is less than six hours for most applications.

Activation of the system generally takes place two to four months after retanking and consists of the following:

Nitrogen and phosphorus demands are calculated based on estimated soil volume and gasoline concentration; Typical compounds which are used for nutrients include diammonium phosphate, ammonium chloride, potassium phosphate (mono and di-basic), ammonium nitrate, potassium nitrate, and sodium nitrate. Hydro-

carbon concentration is determined in the contaminated soil using a gas chromatograph.

The theoretical chemical oxygen demand (COD) created by the presence of these hydrocarbons is calculated by balancing the chemical reaction (oxidation) of the hydrocarbon to carbon dioxide and water: Chemical contaminant (hydrocarbon) + O₂ → CO₂ + H₂O;

Total theoretical nutrients required, i.e., nitrogen and phosphorus are calculated at 10% and 5%, respectively, of the calculated COD;

Water and nutrients are added to the gravel and dry culture (bran) to activate the bacteria;

Vacuum is started to supply oxygen to the bacteria and to draw hydrocarbon vapors across the bacteria containing area; Nitrogen and phosphorus may be added, if needed, through the existing piping at any future time.

Optionally during nutrient addition, a small dosage of surfactant may be added for diesel fuel and waste oil applications.

In practice the ratio of 100/10/5 (COD/nitrogen/phosphorus) is used to determine the ultimate needs of the system. The phosphorus value of five is inflated to allow for soil adsorption. This is standard practice in bioremediations. A minimum of 10% of this nutrient demand is added at the start-up and the remainder during the maintenance phase. Water and nutrients are added in a flooded-batch mode to float the organisms into the pea gravel. The pea gravel below the piping functions as the BCI unless the underlying soil is very porous sand, gravel, and/or composite. In this case the organisms will be partially washed into the native soil at start-up. Therefore, in porous conditions the BCI will also perform active in situ degradation of hydrocarbons in the surrounding soil and enhances the remediation.

Three process design option schematics or embodiments of the present invention which allow for variation in soil type, limited site size, and ongoing process manipulation are described as in the drawings as follows:

FIG. 1 illustrates one embodiment of a piping arrangement 10 of the present invention which is suitable for delivery of the nutrients and water to the cultures contained in the pea gravel. The piping is contained in cavity or tank placement area excavated from ground 32. The Bottom piping 12 is laid out at desired intervals with notches or holes 14 through the pipe wall thickness at intervals of about every 3 feet. The pipes 12 are capped at their ends 16 and connected to a central header 18 at their opposite ends. The header additionally contains a vertical stand pipe 20. In the illustrated embodiment a free standing PVC (polyvinyl chloride) pipe 22 about 4 to 6 inches in diameter is positioned adjacent a vertical stand pipe 20 which acts as the main component of a tank cavity well. Pipe 22 is positioned in the soil below the pea gravel in the capillary and unsaturated zone 24. The end of the pipe contains a standard well screen zone 26 which comprises slots through the pipe wall thickness to allow air flow through the bottom of the pipe. Both pipes 20 and 22 are encased in a cylindrical concrete sewer pipe 28 which provides an opening for future sampling of contaminated soil.

FIG. 2 illustrates a vertical sectional view of an excavated tank cavity with the piping arrangement of FIG. 1 in place in the pea gravel 30. The PVC pipe is positioned below the pea gravel and buried in the ground 32 adjacent the capillary and unsaturated zones 24. In this embodiment the tank cavity is approximately 40 feet by

(d) placing the appropriate tank in place within said cavity and covering the gravel and dirt, and filling said tank with a petroleum hydrocarbon.

2. Activating the method as set forth in claim 1 by providing said cultures with a source of nutrients through said piping followed by flowing air through the

40 feet square and 15 feet deep. The eventual location of dual 10,000 gallon gasoline tanks are illustrated in phantom by reference characters 34 and 36.

In operation, nutrients mixed with water are added through stand pipe 20 and flow through the holes 14 in pipes 12 into the pea gravel and contact the dry cultures. The passive air inlet at the open top of pipe 22 allows for a flow of air through the slots in the bottom of the pipe as illustrated by the arrows in FIG. 2 and this flow is continued by the use of a vacuum blower (not shown) which is attached to the top of stand pipe 20 in conjunction with piping 18 and 12 which then becomes a vacuum system. Organisms in the soil act as a biochemical filter. Vapors are digested as they pass through the soil and gravel media. Any standard vacuum blower such as a 1-½ to 2-½ HP Reeves Blower can be used in conjunction with pipe 20 to facilitate air flow through the system.

In porous soils the dry in-place organisms will be washed into the soil below the gravel and in-situ degradation of the adsorbed contamination will compliment the vapor digestion simultaneously. In this situation the piping arrangement may change. As shown in FIG. 3 wells on one side of the contaminant will function as air in-put while wells on the other side of the site will function as a vacuum system. This option probably has the fastest remediation time. In this embodiment, as in that illustrated in FIG. 4, a plurality of wells or pipes are located along the sides of the tank placement area.

In FIG. 4 the perimeter and/or tank cavity wells will function as the vacuum system while the original metal piping installed during retanking will serve as the air inlet. This option is especially beneficial when there is a perched contaminated aquifer. Not only can organisms be added to the vadose zone but also to the shallow aquifer. Furthermore, oxygen will maximize the aromatic degradation. The air flow in FIGS. 3 and 4 is illustrated by the arrows.

The geology for a particular application of the present invention will demand some manipulation and modification of the apparatus and process parameters.

Maintenance of the system will be conducted routinely and will involve nutrient addition and water replacement. Bacteria enumeration will be taken from split sample cores at least once a year. CO₂ evolution may possibly be used as a plausible degradation rate technique. However, it may be simpler to measure TPH (total petroleum hydrocarbons) in the off gases going to the above ground treatment system.

While the invention has been described in detail and with respect to specific embodiments thereof, it will be apparent to one skilled in the art that changes and modifications can be made therein without departing from the spirit and scope thereof.

What is claimed is:

1. A method for treating soil contamination by petroleum hydrocarbons which comprises:

- (a) applying in a dry form, a suitable bacterial culture capable of degrading petroleum hydrocarbons to the bottom of an excavated cavity,
- (b) applying gravel to a suitable depth over said dry cultures,
- (c) providing a system of distribution piping adjacent to said cultures, said piping being capable of supplying nutrients directly to said cultures, and also providing an air flow through the area containing said cultures,

piping to facilitate metabolization of the hydrocarbons contained in the soil.

3. The method of claim 1 in which the cultures are capable of degrading soil contaminated with at least one petroleum selected from the group consisting of gasoline, diesel fuel, kerosene and used oil.

* * * * *

ANEXO 7.3 Manual de Procedimiento de Reactivación de Consorcios Bacterianos Comerciales



La Naturaleza trabajando para ti.

Manual de Procedimiento de Reactivación de Consorcios Bacterianos Comerciales

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

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

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

Los productos mencionados en la tabla anterior se deben mezclar, dividir la mezcla en cuatro porciones iguales, posteriormente introducir cada porción en cuatro bolsas de nylon llamadas cargas bacterianas, las cuales se amarran y se sostienen de la tapa del biorreactor. A continuación se realiza la operación del biorreactor (consultar el Manual de Operación del Bio→Reactor MEN®).

Dr. Jorge F. Rodríguez González

Director General

ANEXO 7.4 Manual de Operación del Bio→Reactor MEN®



La Naturaleza trabajando para ti.

Manual de Operación del Bio→Reactor MEN®

El Bio→Reactor MEN® es un recipiente construido todo en acero inoxidable, cuenta con una tapa, un tubo para rebosadero, una válvula solenoide para regular la cantidad de inóculo que se dosifica al sistema, una válvula para poder vaciar el equipo, cuatro aireadores, una bomba de aire, una resistencia, un pirómetro para controlar la temperatura y la potencia de calentamiento, un relevador, un temporizador con dos controles de tiempo, uno para la pausa (máximo 6 horas) y el otro para el pulso (máximo 15 min), un porta fusible y un botón de encendido.

Ajuste del sistema de calentamiento

1.- Asegurarse que la resistencia se encuentre cubierta por el agua. El encender el equipo sin este mínimo de agua puede llevar a que la resistencia se funda y a derretir las mangueras de plástico interiores. Para conseguir este mínimo, se puede llenar manualmente con una cubeta, o bien desconectar la resistencia (se puede poner el "set point" o SP en un valor por debajo de la temperatura del agua ambiente y se abre la válvula solenoide al máximo (pulso en 15 min. o al máximo y la pausa al mínimo).

2.- Una vez que se cuenta con este mínimo de agua se puede ahora programar a la resistencia. Para esto se oprime el punto inferior a la izquierda del control de temperatura. Aparecerán las letras "SP" en la parte superior y con los botones de la parte inferior derecha se aumenta o se disminuye. El equipo está calibrado para mantener una temperatura de 30 °C, es recomendable mantenerla en este valor.

Los demás valores que aparecen en la pantalla se dejan tal y como están, el modificarlos puede hacer que el biorreactor tarde demasiado tiempo en calentar o por el contrario, puede calentar en poco tiempo y calentar el cable que conduce a la electricidad, pudiendo llegar a fundirlo.

Ajuste gasto de agua

3.- Tomar un recipiente de un litro y con un reloj con segundero medir el tiempo en que sale el agua de la llave. (El tiempo que tarda en llenarse de agua el recipiente), la división siguiente indica cual es el flujo de agua en la llave.

Dr. Jorge F. Rodríguez González

Director General

ANEXO 7.5 Hojas técnicas de: C_{XENOB} (BI-CHEM® DC 1008CB) y C_{HC} (ABR® Hydrocarbon Blend)

INDUSTRIAL WASTEWATER TREATMENT

BI-CHEM® DC 1008CB General Chemical



BI-CHEM® DC 1008CB encompasses a wide variety of organic degradation capabilities to target a variety of industrial wastes. The microbial blend incorporates strains capable of degrading fatty acids, surfactants, hydrocarbons, phenolic compounds, ketones and recalcitrant organics.

The microbial activity of DC 1008CB blend is recommended to enhance BOD, COD, and TOC removal associated with industrial wastewaters.

BI-CHEM® DC 1008CB is recommended when:

- A broad-based spectrum of activity for wastes is desired or needed.
- The goal is recalcitrant COD reduction.
- A different BI-CHEM® 1000-series product is not specifically indicated.
- BI-CHEM® 1008SF and BI-CHEM® CWT Standard Blend were used in the past.
- A full-scale application is desired as an alternative to lab testing on previously untested organic compounds.

Note: The waste composition may indicate that a different BI-CHEM® product will provide the best benefits for waste application. Contact your Novozymes Biologicals' sales representative to determine the best BI-CHEM® product for your application.

Features

- Improves maximum rates of organic removal as measured by BOD, COD, or TOC.
- Provides higher growth and utilization rates in response to organic overloads for greater stability.
- Improves biodegradation of petroleum hydrocarbons, solvents, tannery wastes, mineral oils, pharmaceuticals, and surfactants.
- Reduces nitrifier toxicity to allow initiation and maintenance of high rates of biological ammonia removal.
- Provides the ability to degrade a wide spectrum of recalcitrant industrial chemicals.

Enhanced Capabilities

- Ability to degrade variety of aliphatic and aromatic hydrocarbons, fatty acids, proteins, and lipids.
- Enhanced degradation of recalcitrant organics, surfactants, ketones, and phenolics.
- Rapid response to uncharacterized upsets with a broad-spectrum product.

Applications

BI-CHEM® DC 1008CB is recommended for improved biodegradation of wastewaters from the following industries when a rapid response to *undefined* upsets is needed:

- Petroleum and natural gas refining and petro-chemical manufacturing, including many amine-bearing organics.
- Steel making and coking operations.
- Food processing including dairies, fruit processing, distilleries, tanneries, poultry processing, vegetable oil recovery, corn sweetener and starch manufacture.
- Specialty chemical manufacturing such as paints, pigments, phenolic resins, rubber, styrene, lubricants, and surfactants.
- Textile mills and textile chemical plants.

General Benefits

- Improved waste system stability and reduced frequency and severity of upsets.
- Reduced effluent organics.
- Enhanced flocculation in activated sludge.
- Higher levels and diversity of protozoa.
- Rapid recovery from load-related and toxic upsets.
- Targeted removal of specific organics.
- Reduced impact of production increases or changes in product mix on effluent quality.
- Reduced municipal surcharges.
- More rapid new plant, seasonal, or post-maintenance start up.

Product Characteristics

Bacteria count	5 Billion/gram
Stability	Loss of 1.0 log/year when stored as recommended
Appearance	Free-flowing tan powder
Odor	Yeast-like

Available Packaging

- 25 pound pail
- 1 pound SoluPak

Product Code: 7009916

Product Preparation

BI-CHEM® DC 1008CB may be added directly to the waste influent stream or aerated basin. For toxic wastes or short retention times, re-hydration for 30-90 minutes prior to addition to a system is recommended using 2 gallons of water per pound of *DC 1008CB*. For best results, the make-up water temperature should be between 21° – 31°C (70° – 90°F). For convenience, *DC 1008CB* is available in pre-measured water-soluble SoluPaks.

Optimum Conditions for Use

The bacteria in *BI-CHEM® DC 1008CB* perform within a pH range of 6.0 to 9.0, with optimum activity near pH 7.0. Temperature affects the growth rate of the bacterial population, and activity improves with increasing temperature up to 40°C (104°F). No appreciable activity can be expected below 5°C (40°F).

Storage and Handling

Store in a cool dry place. Recommended storage temperature of 1° - 23°C (34° - 73°F). Avoid excessive inhalation. Avoid eye contact. Wash hands thoroughly with warm, soapy water after handling.


novozymes
Novozymes Biologicals, Inc.
5400 Corporate Circle
Salem, VA 24153

Offices in:
LaPect, France
Chiba-shi, Japan



Customer Service/Orders:
800.BUGS.HELP / 800.284.7435

Fax Orders:
540.389.9173

Sales and Marketing:
800.859.2972 / 540.389.9361
Fax: 540.389.2688

www.novozymes.com/microorganisms

Novozymes' microorganisms business and all related activities are the responsibility of Novozymes Biologicals, Inc., a wholly owned subsidiary of Novozymes A/S. Laws, regulations and third party rights may prevent customers from importing, processing, applying and/or reselling certain products in a given manner. It is the responsibility of the customer that their specific use of products of Novozymes does not infringe relevant laws and regulations and, furthermore does not infringe patents or other third party rights. The contents of this document are subject to change without further notice. **BI-CHEM®** is a registered trademark of Novozymes Biologicals, Inc.

Revised 08/17/04

2004-31019-01

ABR[®] HYDROCARBON BLEND

novozymes

ABR HYDROCARBON is a proprietary blend of bacterial cultures specifically designed to degrade the light-distilled oil fractions, as well as the heavier fractions of hydrocarbons normally associated with #4, #5, and #6 fuel oils, crude oil and coal tar.

ABR[®] cultures are not genetically engineered. These cultures are naturally occurring, selectively adapted, and tolerant of high contaminant concentrations.

Benefits

- Decontaminates soil and ground water containing hydrocarbons resulting from leaking underground storage tanks, transfer line leaks, and spills.
- Eliminates or reduces further environmental damage through biodegradation of contaminant plume.

Features

- Rapidly degrades all major organic components of #4, #5, and #6 fuel oils, crude oil and coal tar.
- Available in liquid and dry formulations.
- Can tolerate petroleum concentrations inhibitory to many indigenous populations.

Advantages

- Eliminates future liability risks associated with offsite disposal.
- Remediates with minimal site disruption.
- Provides a natural and ecologically sound approach to remediation.
- Improves degradation of petroleum hydrocarbons in biological wastewater treatment systems.

STUDIES AND PERFORMANCE

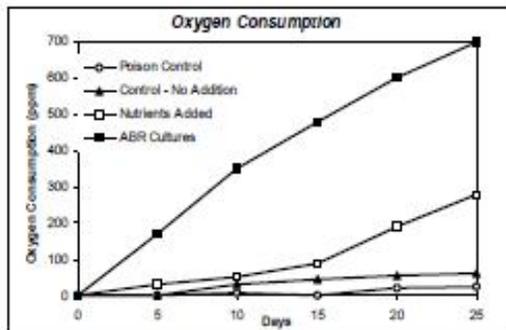


Figure 1

The rate of oxygen consumption was measured as an indicator of bacterial growth on No. 6 fuel oil (fig.1). The HYDROCARBON sample ("ABR Cultures") began consuming oxygen immediately, and as a result achieved an average TPH reduction rate 31% higher than nutrient-stimulated indigenous cultures ("Nutrients Added"). After only 25 days, the HYDROCARBON cultures reduced the target contaminant concentration by 86%, as compared to 59% when only nutrients were added.

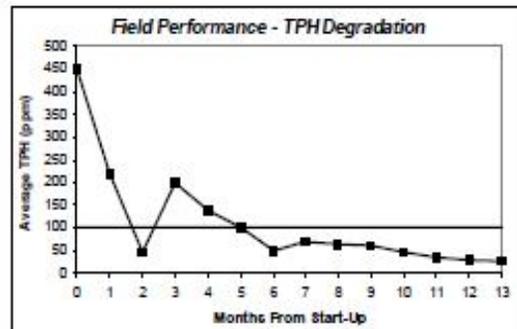


Figure 2

During field applications, HYDROCARBON cultures have proven to be just as effective, having reached the desired endpoints in just seven months (fig. 2). Through lab and field experience, Novozymes Biologicals has found that in most cases, augmenting or supplementing the existing cultures with ABR[®] cultures accelerates the decomposition process and achieves final concentrations faster than indigenous cultures.

Product Characteristics

Dry Culture

Bacteria count	3 billion/gram
Stability	Max loss of 1.0 log/yr when stored under recommended conditions
pH Range	6.0 - 8.5
Bulk Density	0.50 - 0.61 g/cm ³
Moisture content	15%
Appearance	Free-flowing, tan powder

Available Packaging

- 25 pound pail
- 1 pound SoluPak
- 50 pound drum
- 1 & 2 pound BIO-SOCK™

Liquid Culture

Non-stock item.	Call for shipping estimate. Typically 2-3 weeks backorder.
Bacteria Count	Min. 100 mil/mL, 380 billion/gal at time of manufacture
Stability	Max loss of 1.0 log/6 mos. when stored under recommended conditions
pH	Neutral
Specific Gravity	1
Appearance	Turbid liquid

Available Packaging

- 5 gallon pail
- 250 gallon tote
- 55 gallon drum

Optimum Conditions for Use

Bacteria in *BI-CHEM*® products perform within a pH range of 6.0 - 9.0, with the optimum typically near 7.0. Wastewater temperature affects activity, with an approximate doubling in maximum growth rate for each 18°F (10°C) increase in temperature to an approximate upper limit of 104°F (40°C), unless otherwise indicated. Very low activity can be expected below 41°F (5°C).

Storage and Handling

Store in a cool, dry place. Avoid inhalation. Wash hands thoroughly with warm, soapy water after contact. Avoid eye contact.

Nutrient Requirements

For best results, use Novozymes Biologicals' *Accelerator* product line for your nutrient and micronutrient needs. Each blend is carefully formulated to optimize microbial degradation and achieve desired end points in a minimum timeframe.



Novozymes Biologicals, Inc.
5400 Corporate Circle
Salem, VA 24153

Offices in:
LaPaque, France
Chiba-shi, Japan

Customer Service/Orders:
800.BUGS.HELP/ 800.284.7435

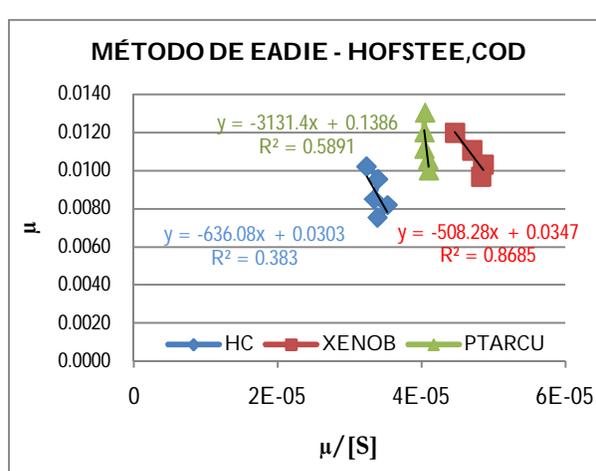
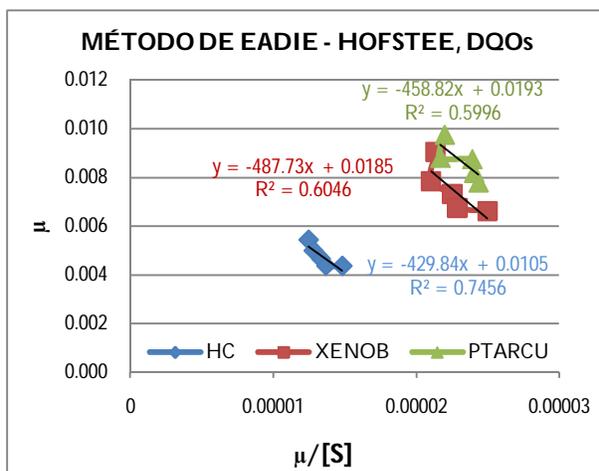
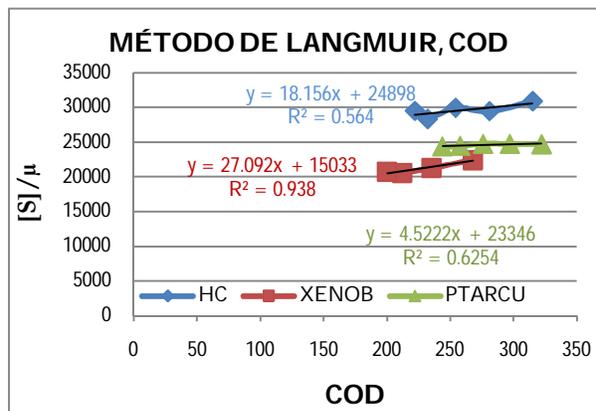
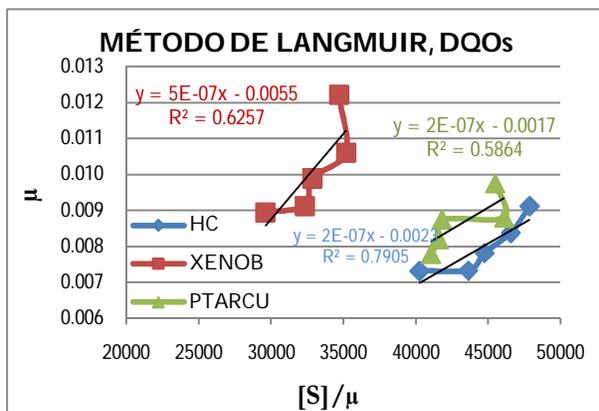
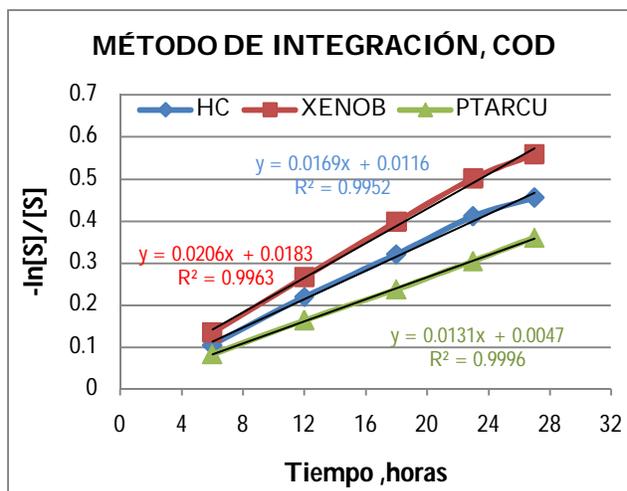
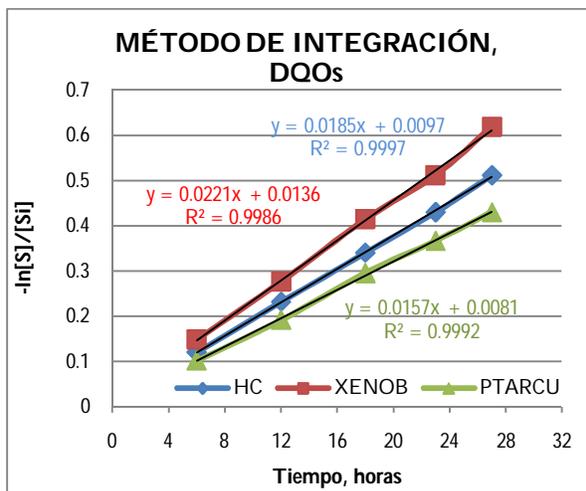
Fax Orders:
540.389.9773

Sales and Marketing:
800.859.2972/540.389.9367
Fax: 540.389.2688

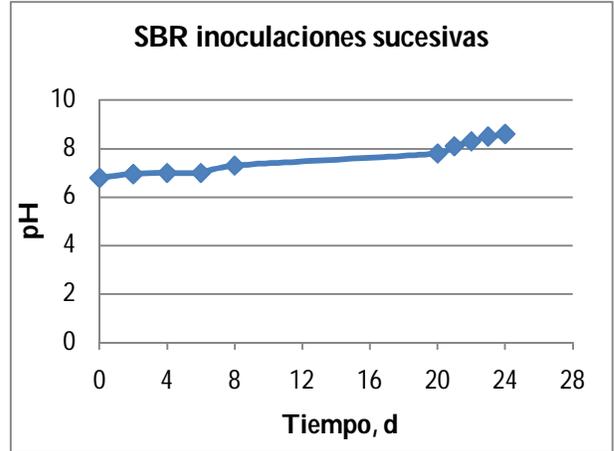
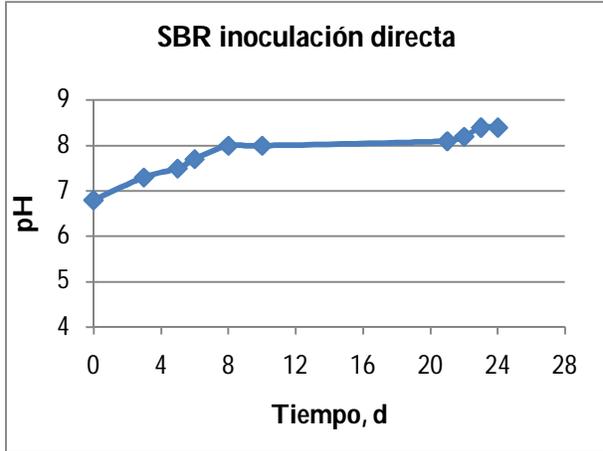
www.novozymes.com

laws, regulations and third party rights may prevent customers from importing, processing, applying and/or reselling certain products in a given manner. It is the responsibility of the customer to let their specific use of products of Novozymes does not infringe relevant laws and regulations and, furthermore, does not infringe patents or other third party rights. The contents of this document are subject to change without further notice. BI-CHEM® is a registered trademark of Novozymes Biologicals, Inc.
Revised 02/06/03 Novozymes Biologicals, Inc.

ANEXO 7.6 Linealizaciones de ecuación de Monod, tres métodos: Lineweaver-Burk, Langmuir y Eadie-Hofstee

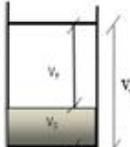


ANEXO 7.7 Gráficos de pH, inoculación directa e inoculaciones sucesivas del C_{XENOB} , C_{HC} , C_{XENOB} y C_{PTARCU} .



ANEXO 7.8 Cálculos de operación del sistema SBR con inoculación directa del C_{XENOB} e inoculaciones sucesivas

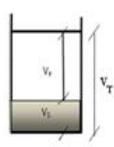
INOCULACIÓN DIRECTA DE C_{XENOB}

Desarrollo	Ecuación	Resultado
1.- Características del agua residual necesarias para el diseño		
a. Cálculo de DQOb (mg/L)	$DQOb = 1.6 (DBO)$	169.60
b. Concentración de SSVnb	$\frac{DQOb_{tp}}{DQOp} = \frac{(DQOb_{DBO})(DBO - DBO_0)}{DQO - DQO_0}$	0.98
	$SSVnb = \left[1 - \left(\frac{DQOb_{tp}}{DQOp} \right) \right] \cdot SSV$	0.25
c. Determinar los SSt, g/m	$SSt_t = SSt_o - SSV_o$	24.20
2. Determinar la operación cíclica del SBR		
T_c	$T_c = t_f + t_A + t_s + t_D + t_i$	24
t_f	$t_f = t_A + t_s + t_D$	1.5
Tiempos de ciclo:	horas	
t_A	19	
t_s	2	
t_D	1.5	
t_i	0	
Número de ciclos/tanque-d	$\frac{Nociclos}{tan\ k \cdot d} = \frac{24h/d}{T_c / ciclo}$	1
Número total de ciclos / día	$2tanques \left[\frac{Nociclos / d}{tan\ k} \right]$	1
$V_F =$ Volumen de llenado / ciclo	$Volumen_llenado = \frac{flujo(m^3 / d)}{No_total_ciclo/d}$	0.003
3. Fracción de llenado por ciclo (V_f/V_T) permitido y comparado para seleccionar el valor de diseño		
a. Balance de masas basado en los sólidos en el reactor Masa de los sólidos con volumen completo = Masa de sólidos sedimentados	$V_T X = V_s X_s$	
b. Balance de masas y fracción de llenado / ciclo IVL supuesto (mg/L) i. Estimar X_s basado en un IVL de mL/g, g/m ³	$X_s = \frac{(10^3\ mg / g)(10^3\ mL / L)}{(IVL, mL / g)}$	
ii. Determinar la fracción sedimentada	$\frac{V_s}{V_T} = \frac{X}{X_s}$	0.063
Disponer del 20% del líquido sobre la capa de lodo para que los sólidos no sean removidos por el mecanismo de decantación	$\frac{V_s}{V_T} = 1.2 \cdot \frac{V_s}{V_T}$	0.0756
iii. Determinar fracción de llenado	$\frac{V_f}{V_T} + \frac{V_s}{V_T} = 1.0$ $\frac{V_f}{V_T} = 1.0 - \frac{V_s}{V_T}$	0.924
V_f / V_T	0.9	
Valor seleccionado ¿correcto?	0.9 vs 0.92	

4. Determinar el tiempo de retención hidráulico total, θ		
Profundidad de líquido en reactor lleno, m	P_L	0.3
Profundidad del decantado	$P_D = 0.9(\text{profund. de líq.}), \text{ m}$	0.27
$V_T, \text{ m}^3/\text{Tank}$	$V_T = \frac{V_f / \text{Tank}}{0.9}$	0.003
θ (h)	$\theta = \frac{1 \text{ tanque} \cdot V_T \cdot 24 \text{ h/d}}{\text{flujo} (\text{m}^3 / \text{d})}$	26.667
5. Determinar el Tiempo de Retención de Sólidos (TRS)		
a) Cálculo de $(P_{X,TRS})\text{TRS}, \text{ g}$	$(P_{X, TRS})SRT = (V)(X_{MLSS})$	3.00
b) Introducción de los datos involucrados para calcular el TRS en las ecuaciones pertinentes		
$P_{X,SSV} = \frac{QY(S_0 - S)TRS}{1 + (k_d)TRS(0.85)} + Q(SSV_{ads})TRS + \frac{QY(NO_x)TRS}{1 + (k_d)TRS(0.85)} + \frac{(f_d)(k_d)QY(S_0 - S)TRS^2}{1 + (k_d)TRS(0.85)} + Q(SSV_i - SSV_0)TRS$		
Asumir que $S_0 \approx S_0 - S$		
$S_0 = DQO_0$		169.600
$Q = (\text{flujo}, \text{ m}^3/\text{d}) / 1 \text{ tanque}$		0.003
$iSSV_0 = SST_0 - SSV_0$		24.200
$NO_x = (0.8) \cdot (NTK / \text{m}^3)$		0.000
Coeficientes cinéticos		
$Y = 0.40 \text{ g SSV} / \text{ g DQO}$		0.400
$k_d, 12^\circ\text{C} = 0.12 \text{ g} / \text{ g d } (1.04)^{20-20}$		0.120
$Y_n = 0.12 \text{ g SSV} / \text{ g NO}_x$		0.120
$k_{dn}, 12^\circ\text{C} = 0.08 \text{ g} / \text{ g d } (1.04)^{20-20}$		0.080
$f_d = 0.15 \text{ g/g}$		0.150
Sustituyendo los valores en la ec.		
Valor de TRS	18	1.292
		0.013
		0.000
		0.419
		1.307
$(P_{X,TRS})\text{TRS}, \text{ g}$	3.00	3.030
6. Determinar la concentración de SSVLM		
a) $(P_{X,SSV})\text{TSR} = V_T(X_{SSVLM})$		
$(P_{X,SSV})\text{TRS} = \frac{QY(S_0 - S)TRS}{1 + (k_d)TRS} + Q(SSV_{ads})TRS + \frac{QY(NO_x)TRS}{1 + (k_d)TRS} + \frac{(f_d)(k_d)QY(S_0 - S)TRS^2}{1 + (k_d)TRS}$		
		1.159
		0.013
		0.000
		0.376
	$(P_{X,SSV})\text{TSR} = V_T(X_{SSVLM}) =$	1.548
	$X_{SSVLM} = \frac{(P_{X,SSV})\text{TRS}}{V_T}$	464.468
	$\frac{X_{SSVLM}}{X_{SSVM}}$	
b) Determinar la fracción de SSVLM		0.516

7. Determinar la cantidad de NH ₄ -N oxidado a NO _x		
	$NO_x = TKN - N_e - 0.12 P_{X,bio}/Q$ $P_{X,bio} = [items A + B + C]$	0.0644 0.0000 0.0209 $P_{X,bio} (g/d) = 0.0853$ $P_{X,bio} (kg/d) = 0.0001$ $NO_x = -3.4109$
8. Este punto no se toma en cuenta debido a que se refiere a la remoción del NH ₄ -N		
9. Determinar el flujo de bombeo decantado (decant pumping rate)		
Volumen de cantado=volumen de llenado		
$V_F (m^3) =$	0.003	
Tiempo de decantado, $t_D (min) =$	90	
Flujo de bombeo (pumping rate), $m^3/min = V_F / t_D$		0.0000333
10. Determinar el oxígeno requerido / tanque		
	$R_o = Q(S_o - S) - 1.42 P_{X,bio} + 4.33 Q(NO_x)$ $R_o, Kg/d =$	0.000343
	$Tiempo_total_de_aeración = \frac{t_f}{2} + t_A$	19
Tiempo de aeración / tanque		
Tiempo de aeración / ciclo, h =	19	
Número de ciclos/d =	1	
Tiempo total de aeración, h/d =	19	
Promedio de velocidad de transferencia de O ₂		0.0000181
	$Prom.de.velocidad.de.transferencia.de.O_2 = \frac{Prom.O_2.requerido / tanque}{Tiempo.aeración.total / d.tanque}$	
<p>Nota: la demanda de oxígeno será más alta en el comienzo del periodo de aeración, así que en el sistema de aeración la capacidad de transferencia de oxígeno podría ser más alta que este promedio de velocidad de transferencia. La velocidad de transferencia de oxígeno debería ser multiplicada por un factor de 1.5 a 2 para proporcionar suficiente transferencia de oxígeno en el comienzo del ciclo.</p>		
11. Determinar la producción de lodos (SSLM = X _{SS,T})		
$Masa\ de\ SSLM = (X_{SS,T}) \cdot V = (P_{X,SS,T}) \cdot SRT$	$P_{X,SS,T} = \frac{V \cdot SSLM}{SRT}$	0.0001667
DQOb removido, kg/d	$DQO\ removido = Q \cdot DQOb$	0.0005088
DBO removida, kg/d	$DBOremovida = \frac{DQOremovida}{DQOb / DBO}$	0.0003180
Producción observada, gSST/gDBO	$P_{observada} = \frac{P_{X,SS,T}}{DBOremovida}$	0.5241090
Producción observada, gSSV/gDBO		
	$P_{observada} = (P_{observada, gSST / gDBO}) \cdot (FracciónSSVLM(g, SSV / g, SST))$	0.2704800
Pobservada, gSST/gDQOb	$P_{observada} = \frac{P_{X,SS,T}}{DQOb.removida}$	0.3275681

INOCULACIONES SUCESIVAS DEL C_{XENOB}

Desarrollo	Ecuación	Resultados
1.- Características del AR necesarias para el diseño		
a. Cálculo de DQOb (mg/L)	$DQOb = 1.6 (DBO)$	169.60
b. Concentración de SSVnb	$\frac{DQOb_p}{DQO_p} = \frac{(DQOb/DBO)(DBO-DBOs)}{DQO-DQOs}$	0.98
	$SSVnb = \left[1 - \left(\frac{DQOb_p}{DQO_p} \right) \right] \cdot SSV$	0.25
c. Determinar los SSTi, g/m ³	$SSTi = SST_o - SSV_o$	24.20
2. Determinar la operación cíclica del SBR		
Tc	$Tc = t_f + t_A + t_s + t_D + t_i$	24.000
t _f	$t_f = t_A + t_s + t_D$	1.500
Tiempos de ciclo:	horas	
t _A	19	
t _s	2	
t _D	1.5	
t _i	0	
Número de ciclos/tanque·d	$N_{\text{de ciclos / tanque} \cdot d} = \frac{24h/d}{Tc / \text{ciclo}}$	1.000
Número total de ciclos / día	$2 \tan \text{ques} \left[\frac{No. \text{ciclos} / d}{\tan k} \right]$	1.000
V _f = Volumen de llenado / ciclo	$V_{\text{volumen_llenado}} = \frac{\text{flujo}(m^3/d)}{No_total_ciclo/d}$	0.003
3. Fracción de llenado por ciclo (V_f/V_T) permitido y comparado para seleccionar el valor de diseño (0.3)		
a. Balance de masas basado en los sólidos en el reactor		
Masa de los sólidos con volumen completo = Masa de sólidos sedimentados	$V_T \cdot X = V_s \cdot X_s$	
b. Balance de masas y fracción de llenado / ciclo		
IVL supuesto, mg/L		
i. Estimar X _s basado en un IVL de mL/g _s	$X_s = \frac{(10^3 \text{ mg/g})(10^3 \text{ mL/L})}{(IVL, \text{ mL/g})}$	14925.373
g/m ³		
ii. Determinar la fracción sedimentada	$\frac{V_s}{V_T} = \frac{X}{X_s}$	0.112
Disponer del 20% del líquido sobre la capa de lodo para que los sólidos no sean removidos por el mecanismo de decantación	$\frac{V_s}{V_T} = 1.2 \cdot \frac{V_s}{V_T}$	0.134
iii. Determinar fracción de llenado	$V_f + V_s = V_T$	
	$\frac{V_f}{V_T} + \frac{V_s}{V_T} = 1.0$ $\frac{V_f}{V_T} = 1.0 - \frac{V_s}{V_T}$	0.866
VF / VT	0.9	
Valor seleccionado ¿correcto?	0.9 vs 0.92	
4. Determinar el tiempo de retención hidráulico total, θ		
Profundidad de líquido en reactor lleno, m	P _l	0.300
Profundidad del decantado	P _D = 0.9(profund. de liq.), m	0.270
V _T , m ³ /Tank	$V_T = \frac{V_f / \text{Tank}}{0.9}$	0.003
θ (h)	$\theta = \frac{1 \text{ tanque} \cdot V_T \cdot 24h/d}{\text{flujo}(m^3/d)}$	26.667

5. Determinar el Tiempo de Retención de Sólidos (TRS)		
a) Cálculo de $(P_{X,TRSS})_{TRS}$, g	$(P_{X,TRSS})_{TRS} = (V)(X_{MLSS})$	5.557
b) Introducción de datos involucrados para calcular el TRS en las ecuaciones pertinentes		
$P_{X,SSV} = \frac{QY(S_0 - S)TRS}{1 + (k_d)TRS(0.85)} + Q(SSV_{in})TRS + \frac{QY(NO_x)TRS}{1 + (k_d)TRS(0.85)} + \frac{(f_d)(k_d)QY(S_0 - S)TRS^2}{1 + (k_d)TRS(0.85)} + Q(SSV_T - SSV_0)TRS$		
Asumir que $S_0 \approx S_0 - S$		
$S_0 = DQO_b$		169.600
$Q = (\text{flujo}, m^3/d) / 1 \text{ tanque}$		0.003
$iSST_0 = SST_0 - SSV_0$		24.200
$NO_x = (0.8) * (NTK/m^3)$		0.000
Coefficientes cinéticos		
$Y = 0.40 \text{ g SSV} / \text{g DQO}_b$		0.400
$k_d, 12^\circ C = 0.12 \text{ g} / \text{g d } (1.04)^{20-20}$		0.120
$Y_n = 0.12 \text{ g SSV} / \text{g NO}_x$		0.120
$k_{dn}, 12^\circ C = 0.08 \text{ g} / \text{g d } (1.04)^{20-20}$		0.080
$f_d = 0.15 \text{ g/g}$		0.150
Sustituyendo los valores en la ec.		
Valor de TRS	38	
		1.586
		0.028
		0.000
		1.085
		2.759
$(P_{X,TRSS})_{TRS}$, g	5.557	5.458
6. Determinar la concentración de SSVLM		
a) $(P_{X,SSV})_{TRS} = V_T(X_{SSVLM})$		
$(P_{X,SSV})_{TRS} = \frac{QY(S_0 - S)TRS}{1 + (k_d)TRS} + Q(SSV_{in})TRS + \frac{QY(NO_x)TRS}{1 + (k_d)TRS} + \frac{(f_d)(k_d)QY(S_0 - S)TRS^2}{1 + (k_d)TRS}$		
		1.391
		0.028
		0.000
		0.951
	$(P_{X,SSV})_{TRS} = V_T(X_{SSVLM}) =$	2.371
	$X_{SSVLM} = \frac{(P_{X,SSV})_{TRS}}{V_T}$	711.155
b) Determinar la fracción de SSVLM	$\frac{X_{SSVLM}}{X_{SSVM}}$	0.427
7. Determinar la cantidad de NH_4-N oxidado a NO_x		
	$NO_x = TKN - Ne - 0.12 P_{X,bio}/Q$	
	$P_{X,bio} = [\text{items A} + B + C]$	
	$P_{X,bio} = \frac{QY(S_0 - S)}{1 + (k_d)TRS} + \frac{QY(NO_x)}{1 + (k_d)TRS} + \frac{(f_d)(k_d)QY(S_0 - S)TRS^2}{1 + (k_d)TRS}$	
		0.0366
		0.0000
		0.0250
	$P_{X,bio} \text{ (g/d)} =$	0.0616
	$P_{X,bio} \text{ (kg/d)} =$	0.0001
	$NO_x =$	-2.4657
8. Este punto no se toma en cuenta debido a que se refiere a la remoción del NH_4-N		

9. Determinar el flujo de bombeo decantado (decant pumping rate)		
Volumen decantado = volumen de llenado		
$V_F (m^3) =$	0.0030	
Tiempo de decantado, $t_D (min) =$	90	
Flujo de bombeo (pumping rate), $m^3/min = V_F / t_D$		3.33333E-05
10. Determinar el oxígeno requerido / tanque		
	$R_O = Q(S_O - S) - 1.42P_{X_{bio}} + 4.33 Q(NO_x)$	
	$R_O, Kg/d =$	0.0004
	$Tiempo_total_de_aeración = \frac{t_f}{2} + t_A$	19
Tiempo de aeración / tanque		
Tiempo de aeración / ciclo, h =	19	
Número de ciclos/d =	1	
Tiempo total de aeración, h/d =	19	
Promedio de velocidad de transferencia de O ₂		2.04863E-05
	$Pr om.de.velocidad.de.transferencia.de.O_2 = \frac{Pr om.O_2\ requerido / tan\ que}{Tiempo.aeración.total / d.tan\ que}$	
Nota: la demanda de oxígeno será más alta en el comienzo del periodo de aeración, así que en el sistema de aeración la capacidad de transferencia de oxígeno podría ser más alta que este promedio de velocidad de transferencia. La velocidad de transferencia de oxígeno debería ser multiplicada por un factor de 1.5 a 2 para proporcionar suficiente transferencia de		
11. Determinar la producción de lodos (SSLM = X _{SST})		
Masa de SSLM = $(X_{SST}) * (V) = (P_{X,SST}) * SRT$	$P_{X,SST} = \frac{V * SSLM}{SRT}$	0.00015
$P_{X,SST}, kg/d$		
DQOb removido, kg/d	$DQO\ removido = Q * DQOb$	0.00051
DBO removida, kg/d	$DBOremovida = \frac{DQOremovida}{DQOb / DBO}$	0.00032
Producción observada, gSST/gDBO	$Pobservada = \frac{P_{X,SST}}{DBOremovida}$	0.45984
Producción observada, gSSV/gDBO		
	$Pobservada = (Pobservada, gSST / gDBO) * (FracciónSSVLM (g, SSV / g, SST))$	0.19617
Pobservada, gSST/gDQOb	$Pobservada = \frac{P_{X,SST}}{DQOb.removida}$	0.28740

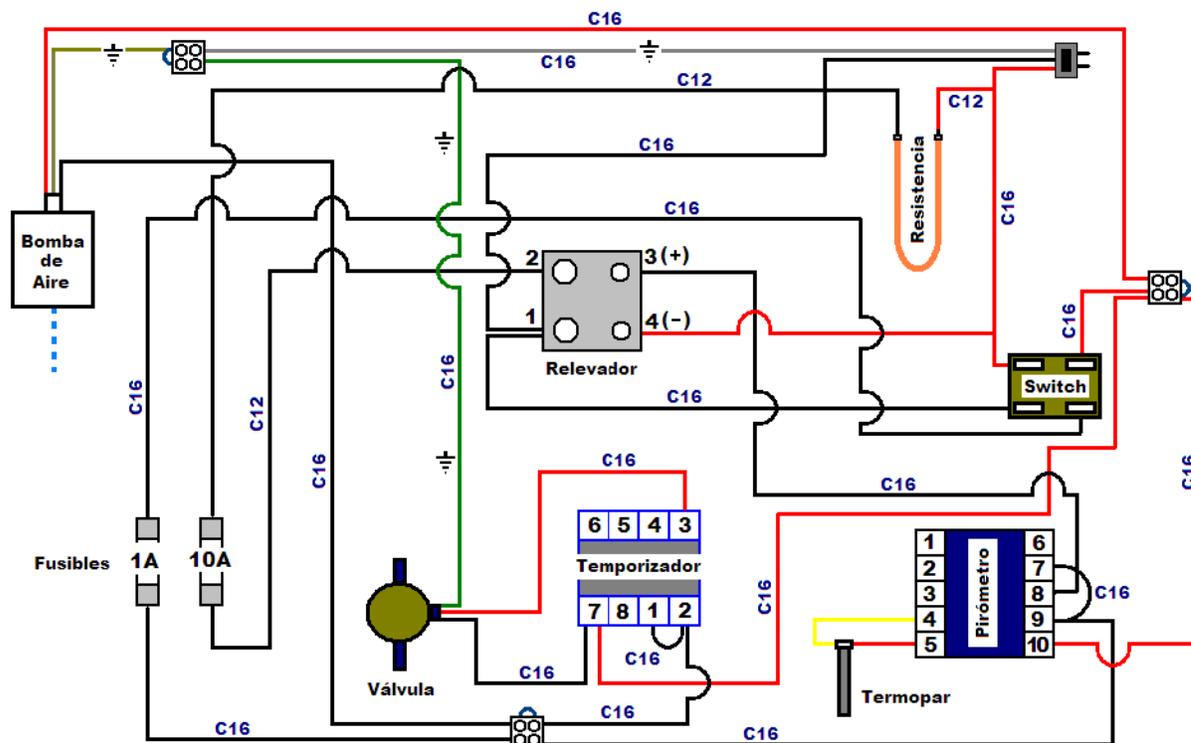
ANEXO 7.9 Características generales de la PTARCU

La planta de tratamiento de Ciudad Universitaria fue construida con el objetivo de tratar las aguas residuales generadas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la colonia Copilco el Alto, para su reutilización como agua de riego para las áreas verdes de la propia universidad. Por otro lado, la PTARCU ha participado y apoyado a la realización de diferentes estudios de investigación en el área de Ingeniería Ambiental.

La PTARCU fue diseñada para tratar un gasto de agua residual de 40 L/s, en esta planta de tratamiento de aguas residuales municipales no se cuenta con un sistema para el tratamiento de lodos residuales, siendo descargados al drenaje municipal sin medir los daños que causan a los cuerpos receptores y sobre todo a la salud humana.

La planta cuenta con 3 sistemas de tratamiento biológico en paralelo: lodos activados, biodiscos y filtro rociador, los cuales tratan el 50, 25 y 25 % respectivamente del caudal total. (Lazcano, 2003).

ANEXO 7.10 Diagrama eléctrico de operación del biorreactor



ANEXO 7.11 Distribución de unidades hidrogeológicas

