



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Obtención de un consorcio microbiano granular para la
biodegradación de fenol en un reactor discontinuo de
alimentación secuenciada**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTA:

VIOLETA VALERA DAMIÁN

ASESORES:

DRA. GABRIELA ALEJANDRA VÁZQUEZ RODRÍGUEZ

DR. JULIO WAISSMAN VILANOVA



El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para el desarrollo del proyecto de investigación titulado "Optimización de un proceso SBR mediante técnicas de control por aprendizaje iterativo" (Responsable: Dr. Julio Weissman Vilanova; Ref. SEP-2003-CO2-45394).

Violeta Valera Damián agradece al CONACYT la beca de Licenciatura otorgada.

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

- Calvario Rivera C.I., **Valera Damián V.**, Waissman Vilanova J. y Vázquez Rodríguez G. (2006) Modelado de la inhibición de la biodegradación del fenol por gránulos aerobios. *Proceedings of the 2nd International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering 2IMEBE* (ISBN: 970-95106-0-6), CINVESTAV-IPN, Mexico D.F., September 26-29.
- **Valera D.V.**, Calvario R.C.I., Waissman V.J. y Vázquez R.G.A. (2006) Modelado de la inhibición de la biodegradación de fenol por gránulos aerobios. Memorias del *XI Congreso Nacional y V Internacional de Ciencias Ambientales* (ISBN: 968-878-265-3), Academia Nacional de Ciencias Ambientales, Oaxtepec Mor., 7-9 junio.
- Calvario C., **Valera V.**, Waissman J. y Vázquez G. (2006) Cinética de biodegradación de fenol por gránulos aerobios. Memorias del *XI Congreso Nacional y V Internacional de Ciencias Ambientales* (ISBN: 968-878-265-3), Academia Nacional de Ciencias Ambientales, Oaxtepec Mor., 7-9 junio.
- Calvario C., **Valera V.**, Waissman J. y Vázquez G. (2005) Tratamiento de fenol en un reactor tipo SBR con biomasa granular aerobia. *1st International Workshop of Biotechnology*, Universidad Politécnica de Pachuca, Pachuca Hgo., 21-25 noviembre.

Así mismo, dio lugar a la publicación del siguiente artículo:

- **Valera D.V.**, Calvario R.C.I., Martínez H.H.E., Waissman V.J. y Vázquez R.G.A. (2005) Desarrollo de un proceso biológico para el tratamiento de fenol utilizando biomasa granular. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 21 Supl. 1, 1131-1136.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias Ambientales, perteneciente al Centro de Investigaciones Químicas, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

DEDICATORIA

A mis padres: Dolores Damián Villegas y Javier Valera Chávez, por su apoyo constante para llegar al término de un ciclo más de mi preparación; por su esfuerzo para hacer de mí una profesionalista y por la educación que siempre recibí.

A mis hermanos: Andrea, Trinidad Javier y Ana Itzel, porque de una u otra manera contribuyeron en mi realización.

A los seres que siempre quise y que recordaré con amor: Anita Chávez, Paulina Villegas, Hilaria Valera y Benito Mera.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar a esta importante etapa de mi vida.

A mi asesora la Dra. Gabriela Vázquez por sus enseñanzas y afecto que me brindó para hacer posible este proyecto, así como el Dr. Julio Weissman que me apoyó incondicionalmente.

A mis sinodales por hacer reconocer mis errores, pero sobre todo por ayudarme a recordar como ser precisa, clara y lacónica.

A mis compañeros de laboratorio con los cuales aprendí muchas cosas y pasé gratos momentos: Claudia, Alberto, Ángeles, Dora y Yosselín.

A mis compañeros que participaron en la parte electrónica del proyecto y que siempre trataron de adaptarse al reglamento del laboratorio: Hugo, Marco, Consuelo y Liliam.

A mis amigas que me soportaron durante la carrera, con las cuales pasé momentos difíciles y también divertidos: Mayra, Leticia, Jazmín, Gabriela e Isaura.

ÍNDICE

	Página
Lista de abreviaturas y símbolos	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	viii
Resumen	ix
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 La contaminación del agua	3
2.2 El fenol	4
2.2.1 Estructura y nomenclatura	4
2.2.2 Propiedades físicas y químicas	5
2.2.3 Síntesis en el laboratorio	5
2.2.4 Usos e industrias que descargan fenol al medio ambiente	6
2.2.5 Ocurrencia de los compuestos aromáticos en la biosfera	6
2.3 Biodegradación aerobia del fenol	7
2.4 Procesos biológicos de tratamiento del agua	9
2.4.1 Procesos de lodos activados	10
2.4.1.1 Reactores discontinuos de alimentación secuenciada (SBR)	11
2.4.2 Procesos con biomasa fija	12
2.4.2.1 Reactores de lecho anaerobio de flujo ascendente (UASB)	14
2.4.3 Procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales fenólicas	15
2.5 Procesos aerobios con biomasa granular	15
2.5.1 Formación de gránulos aerobios	16
2.5.2 Factores que afectan la granulación aerobia	18
2.5.2.1 Composición del sustrato	18
2.5.2.2 Velocidad de carga orgánica	18
2.5.2.3 Fuerza de desgarre hidrodinámico	19
2.5.2.4 Tiempo de sedimentación	19
2.5.2.5 Tiempo de retención hidráulico	20
2.5.2.6 Carencia nutricional	21
2.5.2.7 Presencia del ión calcio en la alimentación	21
2.5.2.8 Estrategia de alimentación intermitente	22
2.5.2.9 Oxígeno disuelto, pH y temperatura	22
2.5.2.10 Inóculo	22

2.5.2.11 Configuración del reactor	23
2.5.2.12 Inhibición de la granulación aerobia	23
2.5.3 Estructura y diversidad microbiana	24
2.5.3.1 Estructura microbiana	24
2.5.3.2 Diversidad microbiana	25
2.5.4 Aplicaciones de la granulación aerobia	26
2.5.4.1 Tratamiento de aguas residuales con alta carga orgánica	26
2.5.4.2 Remoción simultánea de materia orgánica y nitrógeno	27
2.5.4.3 Remoción de fósforo	27
2.5.4.4 Bioadsorción de metales pesados por gránulos aerobios	28
2.5.4.5 Bioadsorción de colorantes por gránulos aerobios	28
2.6 Tratamiento de fenol en reactores granulares aerobios	29
3. Planteamiento del problema y justificación	31
3.1 Planteamiento del problema	31
3.2 Justificación	31
4. Objetivos	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivos específicos	32
5. Materiales y métodos	33
5.1 Inóculos microbianos	33
5.2 Medios de cultivo	35
5.2.1 Agua residual sintética	35
5.3 Cultivos microbianos	37
5.3.1 Cultivo de biomasa granular	37
5.3.2 Cultivos en matraces agitados	38
5.4 Instrumentación del reactor de biomasa granular	38
5.5 Métodos analíticos	39
5.5.1 Determinación de la concentración de la biomasa	39
5.5.2 Microscopía electrónica de barrido	40
5.5.3 Determinación de la concentración de fenol	40
5.5.3.1 Método colorimétrico de la 4-aminoantipirina	40
5.5.3.2 Método espectrofotométrico UV	41
5.5.4 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)	41
6. Resultados y discusión	43
6.1 Granulación de la biomasa a partir de un agua residual sintética	43
6.1.1 Obtención de los gránulos	43

6.1.2 Eficiencia de la depuración	46
6.1.3 Cinética de degradación de la materia orgánica	48
6.2 Aclimatación de los gránulos al fenol	49
6.2.1 Aclimatación a 100 mg fenol/L	49
6.2.1.1 Cinética de degradación de fenol	50
6.2.2 Aclimatación a 200 mg fenol/L	56
6.2.2.1 Cinética de degradación del fenol a 150 mg/L	57
6.2.2.2 Cinética de degradación del fenol a 200 mg/L	58
6.3 Modelado de la inhibición de la biodegradación de fenol	59
6.4 Simulación del modelo de biodegradación de fenol	62
7. Conclusiones y perspectivas	63
8. Referencias bibliográficas	64

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ATP	Trifosfato de adenosina
BFB	<i>Fluidized Bed Bioreactor</i>
CLMS	<i>Confocal laser-scanning microscopy</i>
CSTR	<i>Completely stirred tank reactor</i>
C_{iw}^{sat}	Solubilidad acuosa
C_v	Carga volumétrica
ΔG_o	Energía libre estándar
ΔH_o	Entalpía estándar
ρ_i	Densidad [g/cm ³]
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
EBPR	<i>Enhanced biological phosphorus removal</i>
EGSB	<i>Expanded Granular Sludge Blanket</i>
2-hmas	Semialdehído 2-hidroximucónico
IC	<i>Internal Circulation</i>
k_0	Constante cinética de orden cero
K_A	Constante de ionización ácida
K_i	Constante de Haldane
K_{iaw}	Constante de separación aire-agua
K_{iow}	Constante de separación octanol-agua
K_{ia}	Constante de acidez
K_s	Constante de Monod
M_i	Masa molar [g/mol]
n	Constante de Haldane
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina en forma reducida
OD	Oxígeno disuelto
P_i	Presión de vapor
q_s	Velocidad específica de degradación
$q_s \text{ max}$	Velocidad específica máxima de degradación
Q_{med}	Flujo medio por unidad
r^2	Coefficiente de correlación de Pearson

r_s	Velocidad inicial de degradación
S	Concentración de fenol
SBR	<i>Sequencing batch reactor</i>
SEM	<i>Scanning electron microscope</i>
SOURs	<i>Specific oxygen utilization rates</i>
SST	Sólidos suspendidos totales
SVI	<i>Sludge volume index</i>
θ_c	Edad de lodos
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
V	Velocidad de transformación de Haldane
V_{max}	Velocidad máxima de transformación de Haldane
V_s	Velocidad superficial

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 2.1	Estructura química del fenol	4
Figura 2.2	Precusores de la lignina	6
Figura 2.3	Rutas alternativas de degradación aerobia de compuestos aromáticos: <i>o</i> - y <i>m</i> -.	9
Figura 2.4	Etapas de funcionamiento de un reactor SBR	12
Figura 2.5	Esquema de un reactor de lecho anaerobio de flujo ascendente (UASB)	14
Figura 2.6	Mecanismo de granulación propuesto después del arranque del reactor tipo SBR con un tiempo corto de sedimentación	17
Figura 5.1	Diagrama de bloques del proceso de tratamiento de aguas residuales del ITESM Campus Pachuca	33
Figura 5.2	Esquema del reactor de granulación	38
Figura 5.3	Panel de control de un reactor SBR granular	39
Figura 5.4	Curva de calibración para la determinación de fenol por el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina	41
Figura 5.5	Curva de calibración para la determinación de la DQO.	42
Figura 6.1	Macroestructura de un gránulo aerobio después de 40 días de operación	44
Figura 6.2	Vista de las bacterias que componen el gránulo	44
Figura 6.3	Distribución del tamaño de los gránulos después de 74 días de operación	45
Figura 6.4	Distribución del tamaño de los gránulos después de 124 días de operación	45
Figura 6.5	Porcentajes de remoción de DQO utilizando medio simple	47
Figura 6.6	Gráfica de porcentaje de remoción de DQO con medio concentrado	47
Figura 6.7	Degradación de la materia orgánica en el reactor de granulación en el efluente (○) simple y (●) concentrado	49
Figura 6.8	Degradación del fenol en el reactor de granulación alimentado con 100 mg/L de fenol en el medio de cultivo	51

Figura 6.9	Degradación de la materia orgánica en el reactor de granulación alimentado con 100 mg/L de fenol en el medio de cultivo	51
Figura 6.10	Degradación de fenol con 0.5 g de biomasa en matraz agitado y en presencia de etanol	52
Figura 6.11	Degradación de fenol con 1 g de biomasa en matraz agitado y en presencia de etanol	53
Figura 6.12	Degradación de fenol en matraces agitados con concentraciones iniciales de (●) 40, (○) 84, (■) 209 y (□) 281 mg/L de fenol	54
Figura 6.13	Degradación de fenol en matraces agitados con concentraciones iniciales de (●) 375, (○) 433 y (■) 723 mg/L de fenol	55
Figura 6.14	Degradación de fenol en matraces agitados con concentraciones iniciales de (●) 821, (○) 1013 y (■) 1112 mg/L de fenol	56
Figura 6.15	Degradación de fenol en el reactor de granulación alimentado con 300 mg/L de fenol en el medio de cultivo	57
Figura 6.16	Degradación de fenol en el reactor de granulación alimentado con 400 mg/L de fenol en el medio de cultivo	58
Figura 6.17	Ajuste de un modelo de Haldane a la cinética de degradación de fenol por gránulos aerobios	61
Figura 6.18	Simulación del modelo de Haldane para las concentraciones iniciales de fenol estudiadas experimentalmente	62

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 2.1	Propiedades físicas y químicas del fenol a 25 °C	5
Tabla 2.2	Ventajas y desventajas de los reactores con biopelícula particulada.	13
Tabla 5.1	Parámetros de diseño de la planta de tratamiento de aguas residuales del ITESM	34
Tabla 5.2	Parámetros de diseño del tanque de aireación	34
Tabla 5.3	Parámetros de diseño del clarificador.	34
Tabla 5.4	Composición del agua residual sintética	35
Tabla 5.5	Composición de la solución de elementos traza	35
Tabla 5.6	Composición del agua residual sintética para el estudio cinético de la degradación de la materia orgánica	36
Tabla 5.7	Composición del agua residual sintética para los estudios cinéticos a 300 y 400 mg/L de fenol	36

RESUMEN

La biodegradación de fenol por gránulos aerobios fue investigada utilizando un reactor discontinuo de alimentación secuenciada (*Sequencing Batch Reactor*, SBR). Los gránulos se obtuvieron a partir de una muestra de sobrenadante de lodos activados y después de 40 días de cultivo sobre agua residual sintética, con etanol como fuente de carbono y de energía. La duración de las etapas del ciclo de trabajo que proporcionó mejores resultados fue la siguiente: llenado (2 min), aireación (231 min), sedimentación (5 min) y extracción (2 min). El tiempo de retención hidráulica fue de 7.78 h, con una relación de intercambio volumétrica del 47.6%. La remoción de materia orgánica fue en promedio del 88%. Se observó que la velocidad superficial (V_s) del aire es crucial en el proceso, ya que una V_s de 5 L/min permitió la obtención de gránulos, a diferencia de una V_s equivalente a 2.8 L/min. El fenol es un inhibidor del crecimiento microbiano y su biodegradación es entorpecida por la toxicidad que ejerce a altas concentraciones; por tal motivo, los gránulos se aclimataron a 100 y 200 mg/L de fenol en el medio de cultivo. En ambos casos, se comprobó la remoción total del fenol. Así mismo, se estudió la cinética de biodegradación del fenol dentro y fuera del reactor de granulación, a diferentes concentraciones iniciales del sustrato y biomasa, utilizando los gránulos aerobios aclimatados. Se encontró que, dentro del reactor y con las concentraciones antes mencionadas de fenol en el medio de cultivo, la cinética es de orden cero, debido principalmente a las altas concentraciones de biomasa. Sin embargo, en matraces agitados se observó que la relación entre la velocidad específica de consumo de fenol (q_s) y su concentración (S) es de tipo Haldane. Por tal motivo, los datos experimentales se ajustaron a este modelo, y se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos: $q_{s,max} = 29.7$ mg/gSST·h, $k_s = 77.55$ mg/L, $k_i = 738.61$ mg/L y $n = 2.276$. El modelo de Haldane representa adecuadamente la cinética de biodegradación de fenol a altas concentraciones de dicha molécula, y podría aumentar el conocimiento existente acerca de la capacidad de los gránulos aerobios para tratar aguas residuales industriales que contengan compuestos químicos tóxicos.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los cuatro recursos básicos en que se apoya el desarrollo, junto con el aire, la tierra y la energía; sin embargo, puede llegar a estar tan contaminada por las actividades humanas (crecimiento demográfico, al desarrollo industrial y a la urbanización) que ya no sea útil, sino de calidad deficiente o nociva.

La importancia que ha cobrado la calidad del agua ha permitido evidenciar que entre los factores o agentes que causan su contaminación se encuentran agentes patógenos, desechos que consumen oxígeno, sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, nutrientes vegetales que ocasionan el crecimiento excesivo de plantas acuáticas, sedimentos o material suspendido, sustancias radioactivas y el calor.

En los países en desarrollo, entre el 90 y el 95 por ciento de las aguas residuales y el 70 por ciento de los desechos industriales se vierten sin ningún tratamiento en cuerpos acuáticos que consecuentemente pueden también contaminar las fuentes de agua potable.

La presencia cada vez mayor de contaminantes tóxicos en el medio ambiente ha llevado al estudio de nuevas tecnologías para el control, corrección y regeneración de los ecosistemas afectados. La degradación biológica es un método de descontaminación del agua muy utilizado, ya que elimina de manera efectiva estos compuestos, aunque es necesario adaptar microorganismos con capacidad para hacerlo, debido a que suelen carecer de las enzimas necesarias para degradarlos; además, las cargas de estos contaminantes frecuentemente son inestables, lo que representa un inconveniente importante para tales procesos, ya que a altas concentraciones inhiben e incluso bloquean la actividad microbiana.

En este trabajo de investigación se pretende aumentar la eficacia de los sistemas biológicos de depuración de compuestos tóxicos, por medio de la obtención de un consorcio microbiano granular aerobio en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada (*Sequencing Batch Reactor*, SBR). Como molécula de estudio se seleccionó al fenol, un contaminante frecuente de las aguas residuales industriales.

El presente documento se constituye de la siguiente manera. En el Capítulo 2 se muestra la revisión bibliográfica de los aspectos más importantes para esta investigación, como son las características de la molécula de estudio, su biodegradación aerobia, los procesos biológicos de tratamiento del agua, los modelos cinéticos que han sido estudiados y publicados, entre otros temas.

En los Capítulos 3 y 4 se expone el planteamiento del problema y su justificación, así como los objetivos de la investigación, respectivamente. En el Capítulo 5 se describen los materiales y métodos utilizados durante el trabajo experimental. Luego, en el Capítulo 6, se discuten los resultados obtenidos respecto a la obtención de los gránulos aerobios, la aclimatación y degradación a diferentes concentraciones de la molécula en estudio, así como el modelado cinético. Por último, en el Capítulo 7 se exponen las conclusiones y perspectivas del trabajo.

MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA

La contaminación del agua puede ser definida como la introducción de sustancias o energía en el medio ambiente por el hombre, que puede causar peligro a la salud humana, daño a los recursos y sistemas ecológicos, daño a estructuras, o interferencia con legítimos usos del medio ambiente (Harrison, 1996).

Para saber si el agua está contaminada primero hay que saber cuáles son sus propiedades físicas y químicas y así establecer si hay materia extraña en ella y qué tanto afecta. Según su tamaño, las sustancias extrañas que se encuentran en el agua se pueden clasificar en: partículas en suspensión, coloidales y disueltas. Las partículas suspendidas son de mayor tamaño, se pueden filtrar, sedimentar y absorben la luz. Las partículas coloidales son pequeñas y no se pueden sedimentar y filtrar, el agua se puede observar clara a simple vista, pero en un ángulo de 90° se aprecia turbia. Por último, la materia disuelta es muy pequeña y no se puede sedimentar. Se le puede clasificar como moléculas o iones, dependiendo si tienen o no carga.

A la materia extraña también se le puede clasificar como viva o inerte, orgánica o mineral, radiactiva o no radiactiva, tóxica o inofensiva, naturales o añadidas por el hombre.

La mayoría de los compuestos orgánicos que se encuentran en el agua son desintegrados por bacterias, protozoarios y otros microorganismos mayores. Estos organismos, mediante reacciones que utilizan oxígeno, transforman sustancias ricas en energía en sustancias con menor energía. Los organismos que se encuentran en el agua compiten por obtener oxígeno de sustancias que son introducidas en ella.

La *demanda bioquímica de oxígeno*, DBO, es la velocidad a la que la materia orgánica puede consumir oxígeno por descomposición bacteriana. Esto depende de la temperatura del medio ambiente, del tipo de microorganismos y de los elementos nutritivos presentes.

2.2 EL FENOL

2.2.1 Estructura y nomenclatura

Los compuestos que poseen un grupo hidroxilo unido en forma directa con el anillo bencénico se llaman fenoles. Entonces, fenol es el nombre específico para el hidroxibenceno y es el nombre general para la familia de compuestos que se derivan de este último (Solomons, 2000).

Su nombre y su fórmula indican que podría corresponder en la serie aromática a los alcoholes en la serie alifática (Fig. 2.1). Sin embargo, éste no es el caso. El fenol es conocido comúnmente como ácido carbólico; se ioniza para dar H^+ hasta ciertos límites ($K_A=1.2 \times 10^{-10}$), y en soluciones concentradas es bastante tóxico para las bacterias. Ha sido muy usado como germicida, y los desinfectantes han sido graduados en “coeficientes de fenol”, *i. e.*, poder desinfectante relativo con respecto al fenol. Actualmente ese sistema se considera arcaico (Sawyer *et al.*, 2001).

El fenol se extrae del alquitrán de hulla y se produce sintéticamente en grandes cantidades. Se usa en la síntesis de compuestos orgánicos, en especial resinas de tipo fenólico. Existe como componente natural en los desechos industriales del gas de carbón, del carbón coque y de las industrias del petróleo, además de encontrarse en una gran variedad de desechos industriales de procesos que utilizan el fenol como materia prima (Sawyer *et al.*, 2001).

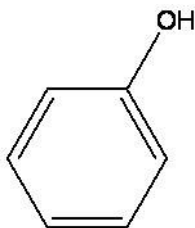


Figura 2.1. Estructura química del fenol

2.2.2 Propiedades físicas y químicas

La capacidad para formar enlaces de hidrógeno fuertes con las moléculas de agua confiere a los fenoles una solubilidad moderada en agua. En la tabla 2.1 (Schwarzenbach *et al.*, 2003), se resumen las propiedades físicas y químicas de este compuesto.

Tabla 2.1. Propiedades físicas y químicas del fenol a 25 °C

Fórmula molecular	C ₆ H ₆ O
Masa molar, M _i (g.mol ⁻¹)	94.1
Densidad, ρ _i (g.cm ⁻³)*	1.05
Temperatura de fusión (°C)	40.9
Temperatura de ebullición (°C)	181.8
log P _i [*] / Pa	1.79
-log C _{iw} ^{sat}	0.005
-log K _{iaw} calculada (experimental)	4.59 (4.79)
log K _{ioW}	1.44
pK _{ia}	9.95

* Dato obtenido a 20 °C

P_i^{*}: presión de vapor

C_{iw}^{sat}: solubilidad acuosa

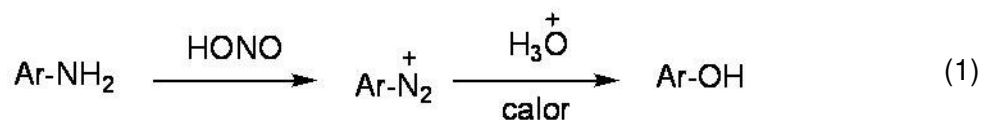
K_{iaw}: constante de separación aire-agua

K_{ioW}: constante de separación octanol-agua

K_{ia}: constante de acidez

2.2.3 Síntesis en el laboratorio

La síntesis en el laboratorio más importante del fenol es por hidrólisis de las sales de arenidiazonio (Reacción 1). Este método es muy versátil y las condiciones necesarias para el paso de diazotación y de hidrólisis son suaves. Esto significa que es poco probable que se afecten otros grupos presentes en el anillo.



2.2.4 Usos e industrias que descargan fenol al medio ambiente

El fenol es un producto químico industrial muy importante; sirve como materia prima para una gran cantidad de productos comerciales que van desde la aspirina hasta un sinnúmero de plásticos. Se le utiliza en la producción de resinas de policarbonato, explosivos, pinturas, tintas, perfumes, conservadores de madera, textiles, medicinas y como agente antibacterial y antifúngico o desinfectante. En medicina, es usado actualmente como anestésico o antiséptico. Así, la producción mundial de fenol supera los tres millones de toneladas al año, por lo que se encuentra entre las 40 sustancias más producidas en los Estados Unidos (Tay *et al.*, 2005).

2.2.5 Ocurrencia de los compuestos aromáticos en la biosfera

Por millones de años, la biosíntesis y ruptura de anillos aromáticos ha sido una parte importante del ciclo global del carbono. La madera de las plantas y los árboles está compuesta primordialmente de celulosa y lignina; ésta última es un material polimérico heterogéneo que contiene anillos aromáticos fenólicos unidos a tres carbonos alifáticos. La biosíntesis de la lignina ocurre por polimerización radicalica del alcohol *p*-coumarílico (a), el alcohol coniferílico (b), y el alcohol sinapílico (c) (figura 2.2; Bugg y Winfield, 1998).

La ruptura de la lignina es iniciada por hongos tales como *Phanerochaete chrysosporium* mediante la enzima extracelular lignina peroxidasa. Los fragmentos aromáticos que se generan, al ser más pequeños, pueden degradarse subsecuentemente tanto por hongos como por bacterias.

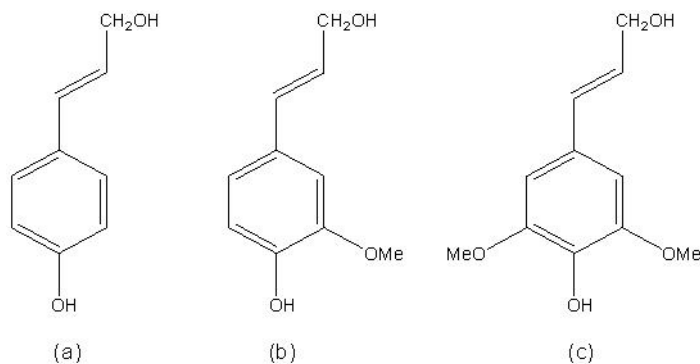


Figura 2.2 Precursores de la lignina

Así mismo, los compuestos fenólicos pueden generarse por actividades antropogénicas. Las industrias que producen o usan fenol pueden liberarlo al medio ambiente, a concentraciones incluso por encima de 10,000 mg/L (Tay *et al.*, 2005). Sin un tratamiento adecuado, estas aguas son una importante fuente de fenol antropogénico en el medio ambiente.

El fenol puede ser eliminado por extracción con solventes, adsorción, oxidación química, incineración y otros métodos fisicoquímicos (Tay *et al.*, 2005). Sin embargo, estos métodos sufren serios inconvenientes, tales como el alto costo y la posible formación de productos peligrosos.

2.3 BIODEGRADACIÓN AEROBIA DEL FENOL

La degradación biológica es un método de descontaminación del agua muy utilizado, debido a sus bajos costos y a la posibilidad de mineralizar completamente las moléculas orgánicas a CO₂ y H₂O en condiciones aerobias. Sin embargo, el contenido de fenol en aguas residuales es difícil de tratar, ya que al ser un inhibidor del crecimiento microbiano, su biodegradación es entorpecida por la toxicidad que ejerce a altas concentraciones. El efecto bactericida general del fenol está basado en la capacidad del compuesto para disociarse dentro de las células, con lo que las funciones de la membrana citoplasmática se ven interrumpidas, causando la muerte de las células (Tay *et al.*, 2005).

Las rutas de biodegradación del fenol han sido investigadas extensamente. La mayoría de los estudios se han dirigido a la biodegradación aerobia del fenol, la cual se lleva a cabo por la mediación de una amplia variedad de microorganismos. Entre las cepas bacterianas que degradan fenol pueden citarse *Acinetobacter calcoaceticus* (Paller *et al.*, 1995), *Burkholderia cepacia* G4 (Shalaby, 2003), *Klebsiella oxytoca* (Heesche-Wagner *et al.*, 1999), *Pseudomonas pickettii* (Fava *et al.*, 1995), *Pseudomonas putida* (Hill y Robinson, 1975), *Ralstonia eutropha* (Léonard *et al.*, 1999) y *Rhodococcus sp.* (Straube, 1987). Así mismo, existen levaduras que degradan fenol, tales como *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra* y *Trichosporon cutaneum* (Komarkova *et al.*, 2003; Shalaby, 2003), y algas como *Ochromonas danica* (Semple y Cain, 1996).

Por otra parte, se han efectuado numerosos estudios utilizando cultivos microbianos mixtos, principalmente lodos activados, para la biodegradación de fenol (Mörsen y Rehm, 1990; Nuhoglu y Yalcin, 2005).

La biodegradación del fenol inicia con una reacción de canalización, que prepara el anillo aromático para su ruptura y posterior conversión en moléculas precursoras y/o en CO₂. Esta conversión genera energía, ya sea en forma de ATP o de poder reductor (*i.e.*, NADH). Las reacciones de canalización producen moléculas de menor estabilidad termodinámica que los sustratos, lo cual se logra por la inserción de oxígeno en forma de un grupo hidroxilo. Esta importante etapa de la biodegradación es catalizada por una monooxigenasa, la cual introduce uno de los átomos de oxígeno de la molécula de O₂, al tiempo que reduce el otro a H₂O.

El catecol así formado es el principal intermediario en el catabolismo del fenol. Este compuesto puede posteriormente fisionarse de dos maneras, debido a lo cual existen sendas rutas posibles, conocidas como *orto* y *meta*. En la ruta *orto*, el anillo se rompe al interior del enlace diol y se produce el cis-, cis-muconato, mientras que en la ruta *meta* la ruptura ocurre en un enlace adyacente al enlace diol y se genera el semialdehído 2-hidroximucónico (2-hmas). Ambas rupturas son catalizadas por dioxigenasas, las cuales, a diferencia de las monooxigenasas, insertan los dos átomos del O₂ en el catecol. Se ha reportado que la ruta *meta* caracteriza la biodegradación de fenol por parte de *Pseudomonas pickettii*, *P. putida*, *Ralstonia eutropha* y *Ochromonas danica* mientras que *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra* y *Trichosporon cutaneum* utilizan la vía *orto* (Semple y Cain, 1996; Komarkova *et al.*, 2003; Shalaby, 2003). En general, se le encuentra en microorganismos asociados al suelo, y particularmente en grupos bacterianos asociados a plantas (*i.e.*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* spp.; Ramírez-Cerón, 2005).

En la ruta *meta*, el 2-hmas se descarboxila a través de la acción de la enzima 2-hmas hidrolasa para originar el 2-oxo-penta-4-enoato (Fritsche y Hofrichter, 1999). Este compuesto es luego degradado por hidratación a 4-hidroxi-2-oxovalerato y después a acetaldehído y piruvato por mediación de una aldolasa. Estos productos siguen oxidándose al incorporarse al ciclo de Krebs. Esta ruta de biodegradación de fenol se observa en la figura 2.3.

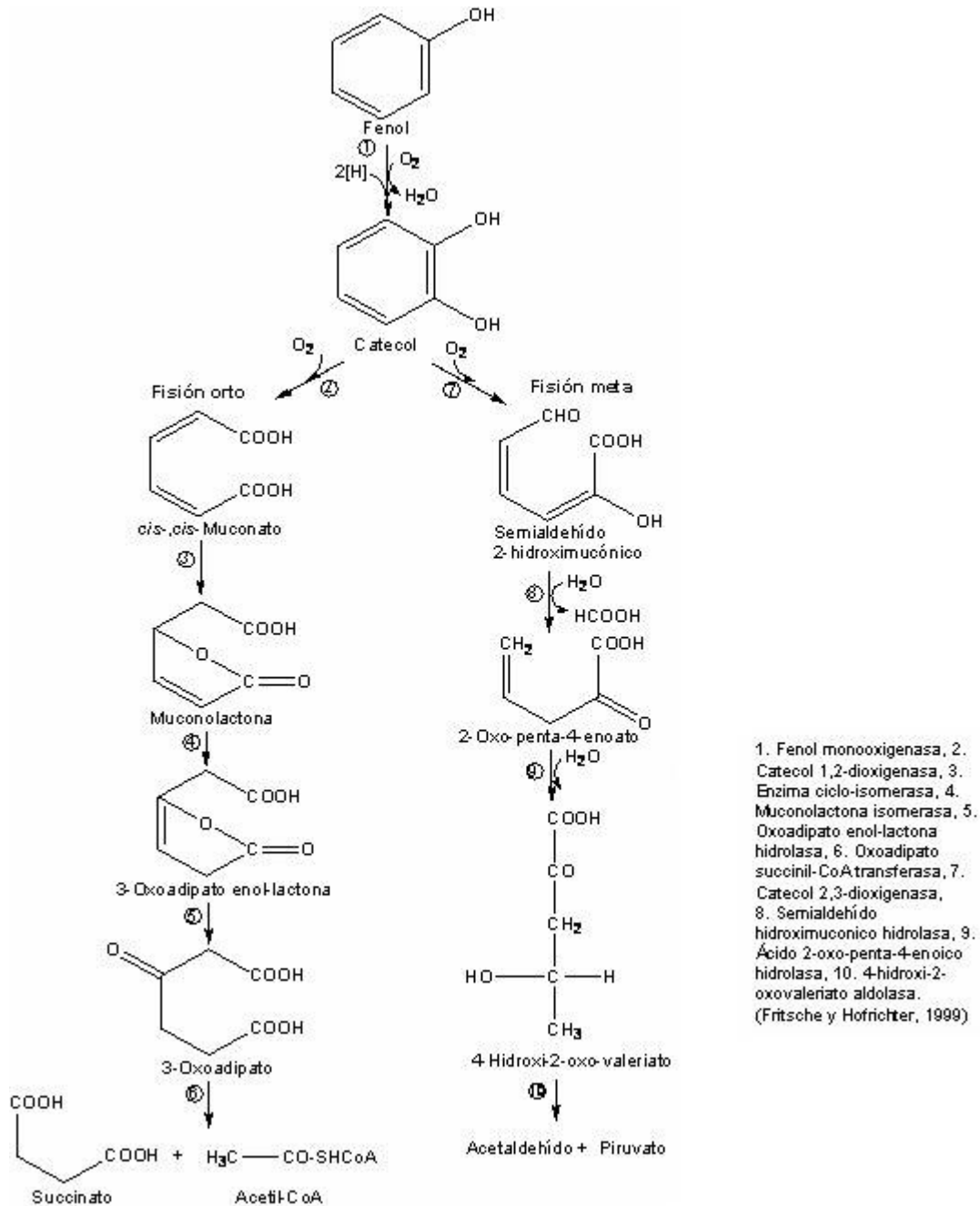


Figura 2.3. Rutas alternativas de degradación aerobia de compuestos aromáticos: *o*- y *m*-.

2.4 PROCESOS BIOLÓGICOS DE TRATAMIENTO DEL AGUA

Los procesos biológicos de tratamiento del agua se basan en la utilización, por parte de microorganismos, de la energía contenida en la materia orgánica contaminante medida como DQO o como DBO (Jiménez, 2002). En este proceso, también conocido como biodegradación, una parte de los contaminantes es oxidada para la producción de la

energía requerida por los microorganismos, mientras que la otra parte es utilizada para formar nuevas células. Al escasear el sustrato la población microbiana entra en la fase de respiración endógena; resultan como productos finales CO_2 , H_2O , NH_3 y sustancias no biodegradables.

Los procesos biológicos pueden ser de cuatro tipos: aerobios, anaerobios, anóxicos y facultativos. Los procesos aerobios requieren de oxígeno disuelto; en los anaerobios hay ausencia de éste. Los anóxicos se llevan a cabo en presencia de oxígeno combinado (NO_3^- , SO_4^{2-} , etc.). En los procesos facultativos existen poblaciones microbianas mixtas que son indiferentes a la presencia o ausencia de oxígeno. La vía anaerobia produce pocos lodos (células), mientras que la aerobia genera una cantidad aproximadamente cinco veces mayor.

En función de la forma en que se encuentre la biomasa, los procesos biológicos se clasifican en:

- *Sistemas con biomasa suspendida*: en estos sistemas los microorganismos se encuentran libres dentro del tanque. Son muy aplicados, pero el mayor inconveniente es que, frecuentemente, tienen problemas de decantación, por ello los microorganismos se escapan con el efluente. El principal proceso de este tipo es el conocido como de lodos activados.
- *Sistemas con biomasa fija*: en estos sistemas los microorganismos se encuentran adheridos en un soporte. Tienen menor volumen que los sistemas con biomasa suspendida y producen flóculos con alto grado de sedimentabilidad. Algunos procesos de este tipo son los que utilizan filtros percoladores, biodiscos rotatorios o lechos fluidificados.

2.4.1 Procesos de lodos activados

Se llama proceso de lodos activados al conjunto de procedimientos cuyo fundamento es el contacto del agua residual con una masa biológica preexistente en un tanque de aeración (Jiménez, 2002). La materia orgánica biodegradable contenida en el agua residual es degradada en forma aerobia por microorganismos presentes en los flóculos en

sustancias más simples e inocuas para el ambiente. Algunas variantes del proceso de lodos activados son las siguientes:

- Tratamiento convencional. El proceso convencional de lodos activados se caracteriza por operar con régimen de flujo pistón. Este proceso consiste de un tanque de aeración, un sedimentador secundario y una recirculación del lodo. Tanto el influente de agua residual como el lodo recirculado entran al tanque por un extremo y son aireados durante seis horas como valor típico.
- Completamente mezclado. Este proceso se caracteriza por operar en un régimen hidráulico de mezcla completa. El agua residual y el lodo de retorno se introducen en diversos puntos del tanque de aeración a lo largo de un canal central.
- Aeración extendida. Proceso conocido como de oxidación. Se fundamenta en la idea de minimizar la cantidad de lodo, lo que se consigue incrementando el tiempo de retención hidráulica y celular, manteniendo una baja cantidad de materia orgánica, con el objeto de consumir casi todo el lodo producido en el reactor por respiración endógena.
- Reactores discontinuos de alimentación secuenciada (SBR). A diferencia del proceso de lodos activados clásico, el cual está orientado en relación al espacio, el proceso SBR se orienta respecto al tiempo, ya que tanto el flujo de influente como el volumen del reactor son variables, siguiendo una estrategia de funcionamiento previamente establecida, la cual se detalla en el siguiente apartado.

2.4.1.1 Reactores discontinuos de alimentación secuenciada (SBR)

En su forma más simple, un sistema SBR está constituido por un recipiente que se llena con el agua residual durante un cierto período de tiempo y que posteriormente funciona como un reactor discontinuo (Figura 2.4). Después del tratamiento requerido, la suspensión se decanta y el sobrenadante se elimina del recipiente. Un ciclo de un sistema SBR se divide en cinco períodos o fases: llenado, reacción, decantación, vaciado y un tiempo muerto. La duración de cada una de las fases se determina en base a las características del agua residual a tratar y a los requerimientos de depuración del

efluente. Estos ciclos de funcionamiento deben ser lo más frecuentes posible, siempre que cada fase se lleve a cabo según los requerimientos de depuración.

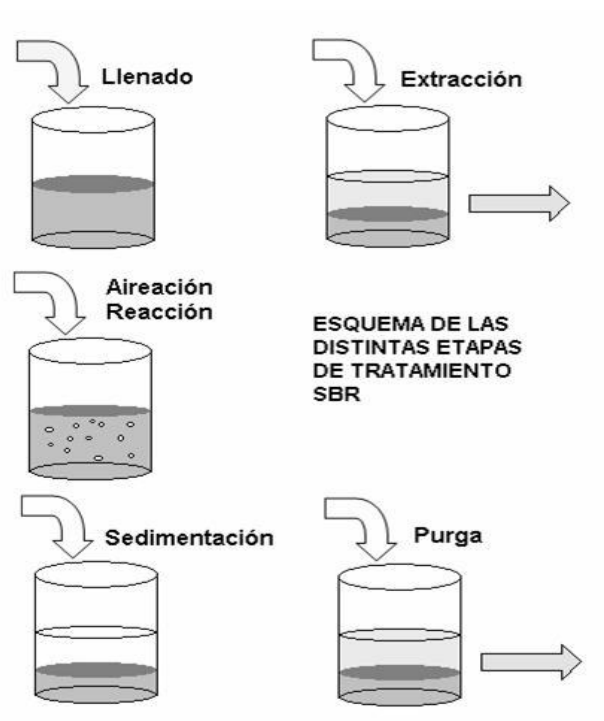


Figura 2.4. Etapas de funcionamiento de un reactor SBR

2.4.2 Procesos con biomasa fija

En estos sistemas los microorganismos se encuentran adheridos a un soporte, formando biopelículas. Las biopelículas son de gran interés en biotecnología, ya que ofrecen diversas ventajas con respecto a células individuales suspendidas en procesos de tratamiento de aguas residuales, debido a que facilitan la separación célula-líquido por sedimentación. Así mismo, toman un papel muy importante en la biorremediación del suelo o de aguas subterráneas, en donde transforman agentes contaminantes en formas menos dañinas (Nicoletta *et al.*, 2000).

Una biopelícula puede definirse como un conjunto de microorganismos inmovilizado sobre un sustrato y no necesariamente uniforme en el tiempo o espacio (Bryers, 2000; Characklis, 1990). La cohesión de los microorganismos se debe a una matriz de polímeros extracelulares de origen microbiano.

Al permitir una rápida separación de la biomasa y del agua tratada, los procesos de tratamiento del agua con biomasa fija pueden prescindir del decantador característico de los procesos de lodos activados. Así, tienen menor volumen que los sistemas con biomasa suspendida y producen agregados microbianos con alto grado de sedimentabilidad. Algunos procesos de este tipo son los que utilizan filtros percoladores, biodiscos rotatorios o lechos fluidificados.

La mayoría de los reactores de biomasa fija utilizan biopelículas adheridas a un material portador impermeable y estático, aunque hay otros tipos de reactores, *i.e.* donde las biopelículas se adhieren a membranas (Debus *et al.*, 1994; Wobus *et al.*, 1996). Sin embargo, las biopelículas pueden crecer ya sea sobre soportes suspendidos o bien en forma de gránulos densos (Lettinga *et al.*, 1980). A este último grupo se le conoce como reactores de biopelícula particulada. Sus principales ventajas e inconvenientes se presentan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Ventajas y desventajas de los reactores con biopelícula particulada.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Alta velocidad de sedimentación (50 m/h, mientras que para lodos floculares es de 5 m/h), lo que elimina la necesidad de un clarificador externo	Formación de biopelículas sobre un material portador, lo que lleva a un período de inicio relativamente grande.
Altas concentraciones de biomasa en el reactor (70 kg/m ³ para reactores UASB, mientras que para un sistema de lodos activados es de 3 kg/m ³).	El control del espesor de la biopelícula es muy complicado.
Biopelículas con una gran área superficial (3000 m ² /m ³ ; para filtros percoladores de 300m ² /m ³).	El crecimiento excesivo de las biopelículas puede lavar la biomasa del reactor.
La alta concentración de biomasa produce altas capacidades de conversión.	La distribución del líquido en sistemas fluidizados es muy costosa para reactores a gran escala y presenta problemas de congestión y de fluidización uniforme.
Reactores compactos.	
Edad de la biomasa relativamente elevada (algunas semanas), que minimiza el exceso de producción de lodos.	

Fuente: Nicolella *et al.* (2000).

2.4.2.1 Reactores de Lecho Anaerobio de Flujo Ascendente (UASB)

El principio de operación de los reactores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*; Figura 2.5) es similar al de los reactores de biopelícula de lecho fluidizado (Lettinga *et al.*, 1980); sin embargo, en los primeros las condiciones hidrodinámicas son más quiescentes, debido a las bajas velocidades superficiales de líquido. Los procesos UASB se basan en el desarrollo de gránulos densos (1-4 mm) en el reactor. Las aguas residuales entran desde el fondo del reactor y ascienden a través de un lecho denso de lodos anaerobios (con concentraciones de biomasa de 60-70 kg/m³). La DQO soluble es rápidamente convertida a biogás, el cual es rico en metano. Una sección de sedimentación permite que ocurra una desgasificación efectiva. Las densas partículas de lodo granular están exentas de gas y por lo tanto se hunden, permitiendo el retorno de la circulación descendente. Esto asegura el contacto efectivo de los lodos con el agua residual. El diseño del reactor permite una alta concentración de biomasa activa y con esto, altas velocidades de carga (10-15 kgDQO/m³-d), además de un corto tiempo de retención hidráulico (menor de 48 h en la mayoría de las aplicaciones).

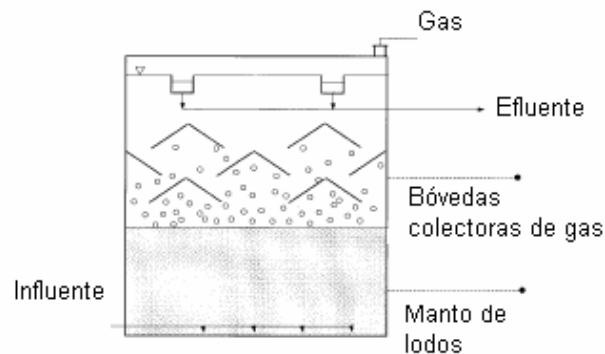


Figura 2.5. Esquema de un reactor de lecho anaerobio de flujo ascendente (UASB)

Los sólidos suspendidos en el influente, los cuales se acumulan en el reactor, representan un problema mayor para la operación del UASB y reducen su capacidad. Para vencer estas limitaciones se desarrollaron los reactores de lecho fluidizado (BFB), y más tarde los reactores granulares de lecho expandido (EGSB) y los reactores de circulación interna (IC).

2.4.3 Procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales fenólicas

El tratamiento biológico de aguas residuales fenólicas se ha llevado a cabo principalmente en sistemas de lodos activados convencionales. Sin embargo, el fenol es un sustrato tóxico e inhibitorio a altas concentraciones, cuya presencia durante el tratamiento biológico de aguas residuales puede conducir a la inestabilidad del proceso y al lavado de los microorganismos (Allsop *et al.*, 1993). Así, los procesos de lodos activados presentan un funcionamiento deficiente con cargas de fenol fluctuantes o superiores a $1 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{d}$ de fenol (Watanabe *et al.*, 1996).

Los problemas inhibitorios asociados con altas cargas de aguas residuales fenólicas pueden superarse por estrategias tales como la inmovilización de la biomasa. Recientemente, se ha propuesto la granulación aerobia como una nueva forma de inmovilización de células, que puede ser explotada en el tratamiento biológico de aguas residuales (Tay *et al.*, 2005).

2.5 PROCESOS AEROBIOS CON BIOMASA GRANULAR

Una manera en que los procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales pueden optimizarse es incidiendo en el tiempo necesario para que la depuración ocurra. En este sentido, recientemente se ha reportado que la granulación de la biomasa en reactores SBR aerobios permite lograr un tratamiento eficiente y rápido de la materia orgánica, reduciendo los tiempos de decantación necesarios y proporcionando una biomasa activa y resistente a los cambios de carga contaminante (Beun *et al.*, 1999).

El SBR de granulación consiste por lo general en una columna de burbujeo, en la cual el agua residual es tratada aeróbicamente en un ciclo de pocas horas. En el reactor, la biomasa se encuentra en forma de gránulos aerobios. Al comienzo de todos los ciclos se agrega una cierta cantidad de agua residual al reactor, dando inicio a la aireación y a la conversión de la materia orgánica. Al final del ciclo, la aireación es apagada y los gránulos sedimentan en pocos minutos, mientras que el efluente clarificado, es removido por la parte superior del reactor; así, se tiene un solo reactor con una alta concentración de lodo granular y altos porcentajes de remoción. El tamaño de la partícula debe permanecer pequeño para prevenir limitaciones en la difusión de los gránulos (Beun *et al.*, 1999).

La granulación de la biomasa que lleva a cabo la degradación de la materia orgánica en pequeñas esferas de rápida decantación ha permitido disminuir la duración de los ciclos de un SBR, y por ende aumentar la capacidad de tratamiento de los sistemas (Beun *et al.*, 1999). También se ha reportado que son eficientes en sistemas de nitrificación-desnitrificación (Jang *et al.*, 2003), de eliminación de fósforo (Liu *et al.*, 2003a), de metales pesados (Liu *et al.*, 2002, 2003b, c) y de moléculas persistentes como la rodamina B, un colorante catiónico (Zheng *et al.*, 2005).

2.5.1 Formación de gránulos aerobios

Los gránulos pueden ser considerados como agregados microbianos compactos y densos con forma externa esferoidal (Liu y Tay, 2002; Yang *et al.*, 2004a). El crecimiento de los gránulos aerobios es algunas veces considerado como un caso especial de desarrollo de biopelículas. De hecho, la granulación aerobia puede ser definida como la aglomeración de células para formar una asociación multicelular estable bajo distintas condiciones fisiológicas.

Tay *et al.* (2001a) usaron diferentes técnicas microscópicas para investigar cómo se forma un gránulo aerobio a partir de un inóculo de lodos activados. Cultivaron gránulos en dos reactores SBR alimentando glucosa en un caso y acetato en otro, como única fuente de carbono. El inóculo de lodos activados tenía una estructura muy suelta e irregular, dominado por bacterias filamentosas. Después de operar los SBR durante una semana, aparecieron agregados compactos. Las bacterias filamentosas desaparecieron gradualmente en el reactor alimentado con acetato; sin embargo, en el reactor alimentado con glucosa, continuaron predominando.

Dos semanas después del arranque, en ambos reactores se formaron gránulos de apariencia externa definida. Aunque las bacterias filamentosas desaparecieron completamente del reactor alimentado con acetato, estas bacterias predominaron en el reactor alimentado con glucosa. Esto puede implicar que una composición con alto contenido de carbohidratos soporta el crecimiento de bacterias filamentosas, tal como se ha reportado previamente en procesos de lodos activados (Chudoba, 1985). Después de 3 semanas de operación los gránulos aerobios maduraron en ambos reactores, y adquirieron una superficie exterior más regular y redonda. La relación de aspecto

promedio¹ fue de 0.79 y 0.73 para los gránulos alimentados con glucosa y acetato, respectivamente.

Los gránulos alimentados con glucosa mostraron una superficie más esponjosa debido a la predominancia de las bacterias filamentosas. Las observaciones a través del Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) revelaron que los gránulos aerobios alimentados con glucosa tenían efectivamente una superficie exterior filamentososa, mientras que los gránulos alimentados con acetato tenían una estructura más compacta, en la cual las células se enlazaban más estrechamente y las bacterias con forma esférica predominaban. Esto parece confirmar que la granulación aerobia es un proceso gradual que involucra la progresión de los lodos alimentados a agregados compactos, ocasionando la granulación de los lodos y finalmente su maduración.

Basándose en observaciones microscópicas, Beun *et al.* (1999) proponen un mecanismo para la formación de gránulos en un reactor aerobio sin la presencia de un material portador. Este mecanismo se esquematiza en la figura 2.6.

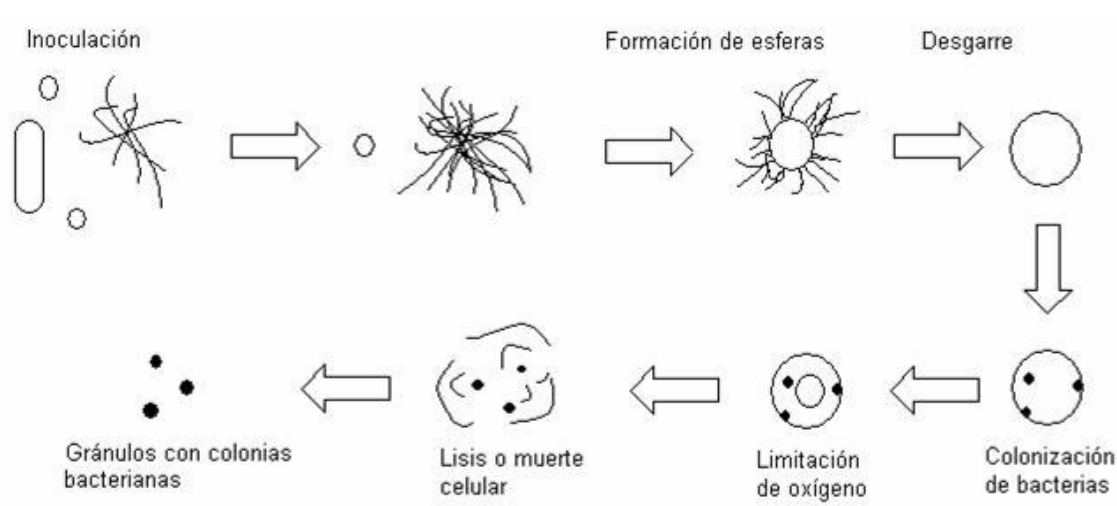


Figura 2.6. Mecanismo de granulación propuesto después del arranque del reactor tipo SBR con un tiempo corto de sedimentación (Beun *et al.*, 1999).

¹ La relación de aspecto de una partícula es la proporción de las longitudes del eje menor y del eje mayor de una elipse equivalente a la partícula.

2.5.2 Factores que afectan la granulación aerobia

2.5.2.1 Composición del sustrato

Los gránulos aerobios han sido cultivados en una extensa variedad de sustratos incluyendo glucosa, acetato, etanol, fenol y agua residual (Beun *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 1999; Tay *et al.*, 2001a, 2004; Moy *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005; Schwarzenbeck *et al.*, 2003). Sin embargo, la microestructura de los gránulos y la diversidad de especies parece relacionarse al tipo de fuente de carbono. Los gránulos aerobios alimentados con glucosa han mostrado estructura filamentososa, mientras que los alimentados con acetato son estructuras bacterianas compactas en las cuales predominan especies esféricas. Los gránulos aerobios también han sido cultivados a partir de bacterias nitrificantes, los cuales han mostrado altas capacidades de conversión (Tay *et al.*, 2002b; Tsuneda *et al.*, 2003).

2.5.2.2 Velocidad de carga orgánica

Una carga orgánica relativamente elevada facilita la formación de gránulos anaerobios en sistemas UASB. En contraste, la evidencia acumulada hasta el momento sugiere que los gránulos aerobios se pueden formar en un amplio rango de velocidades de carga orgánica, que van de 2.5 a 15 Kg DQO/m³·d (Moy *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003a). Con un incremento de la carga orgánica de 3 a 9 Kg DQO/m³·d, el tamaño de los gránulos aerobios aumentó sólo de 1.6 a 1.9 mm (Liu *et al.*, 2003a). Sin embargo, las características físicas de los gránulos aerobios dependen de esta velocidad. Su efecto en la morfología de los gránulos en términos de redondez fue insignificante, así como respecto a la densidad de biomasa seca, gravedad específica e índice de volumen de lodos (SVI). No obstante, la fuerza física de los gránulos aerobios disminuyó con el incremento de la velocidad de carga orgánica (Liu *et al.*, 2003a; Tay *et al.*, 2004). De forma similar, se ha encontrado que en la granulación anaerobia, una elevada velocidad de carga orgánica reduce la fuerza de los gránulos; esto es, a altas velocidades de carga orgánica puede ocurrir una pérdida parcial de la integridad y por consiguiente la desintegración de la estructura granular (Morvai *et al.*, 1992; Quarmby y Forster, 1995). Esto enfatiza que un incremento en la velocidad de carga orgánica puede elevar la

velocidad de crecimiento de la biomasa, lo que a su vez reduce la fuerza de la estructura tridimensional de la comunidad microbiana (Liu *et al.*, 2003b).

2.5.2.3 Fuerza de desgarre hidrodinámico

Se define como la fuerza que actúa perpendicularmente a la superficie de un sólido. Las evidencias muestran que una gran fuerza de desgarre favorece la formación y la estabilidad de los gránulos aerobios (Shin *et al.*, 1992; Tay *et al.*, 2001a). Se encontró que los gránulos aerobios pueden formarse sólo cuando la fuerza de desgarre, en términos de velocidad superficial de flujo de aire, es superior a 1.2 cm/s en una columna SBR. Con una elevada fuerza de desgarre hidrodinámico se desarrollaron gránulos aerobios más regulares, redondos y compactos (Tay *et al.*, 2001a).

La fuerza y densidad de los gránulos también se relacionó de manera proporcional con la fuerza de desgarre aplicada (Liu y Tay, 2004). Estas observaciones pueden implicar que la estructura de los gránulos aerobios es determinada principalmente por la fuerza de desgarre hidrodinámico presente en el biorreactor. Sin embargo, es conocido que los polisacáridos extracelulares pueden mediar entre la cohesión y la adhesión de las células, y que juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural en una comunidad de células inmovilizadas. Tay *et al.* (2001a) reportaron que la producción de polisacáridos extracelulares puede relacionarse a la fuerza de desgarre y a la consiguiente estabilidad de los gránulos aerobios (Tay *et al.*, 2001b). En el mismo estudio, se observó que la relación entre el contenido de polisacáridos y el contenido proteico se incrementó con la fuerza de desgarre.

2.5.2.4 Tiempo de sedimentación

En un SBR, las aguas residuales son tratadas en ciclos sucesivos que duran pocas horas. Al final de cada ciclo, la biomasa sedimenta antes de extraer el efluente. El tiempo de sedimentación actúa como presión de selección sobre la comunidad microbiana. De esta manera, un corto tiempo de sedimentación favorece a las bacterias que sedimentan rápidamente, al tiempo que el lodo con pobre sedimentabilidad es lavado. Qin *et al.* (2004) reportaron que los gránulos aerobios sólo llegaron a predominar cuando el SBR operaba con un tiempo de sedimentación de 5 minutos. A diferentes tiempos de sedimentación

(20, 15 y 10 minutos) se observaron mezclas de gránulos y lodos suspendidos en los ciclos del SBR. Con un tiempo de sedimentación corto se estimuló la producción de polisacáridos extracelulares y se mejoró significativamente la hidrofobicidad de la superficie. Estos descubrimientos ilustran el hecho de que la granulación aerobia se dirige por la presión de selección, con lo que la formación y las características de los gránulos pueden controlarse manipulando tal presión. Por lo tanto, la elección de un tiempo de sedimentación óptimo es muy importante en la granulación aerobia. Generalmente, los gránulos aerobios maduros tienden a sedimentar en un minuto, dejando un sobrenadante claro en el reactor (Tay *et al.*, 2001a). Los gránulos con excelentes propiedades de sedimentación son esenciales para el funcionamiento efectivo de un sistema biológico de tratamiento de aguas residuales.

2.5.2.5 Tiempo de retención hidráulico

Durante la granulación, la biomasa dispersa y ligera es lavada, mientras que los gránulos relativamente pesados son retenidos en el reactor. La duración de un ciclo en un reactor SBR representa la frecuencia de descarga de sólidos en el efluente de salida, mejor conocida como frecuencia de lavado, que está relacionada con el tiempo de retención hidráulico (TRH). Este último término se define como el volumen de efluente descargado dividido entre el volumen de trabajo del SBR. De esta manera, un ciclo corto podría reprimir el crecimiento de sólidos suspendidos debido al frecuente lavado de los mismos. Sin embargo, si los ciclos del SBR son demasiado cortos, se observa la pérdida de lodos a través del lavado hidráulico, debido a que el crecimiento bacteriano es incapaz de compensarlo. Como resultado, ocurre un lavado completo de lodos, que impide la granulación. Por consiguiente, el TRH debería ser bastante corto para suprimir el crecimiento de la biomasa suspendida, pero lo suficientemente largo para permitir el crecimiento y la acumulación microbiana.

Por su naturaleza, la operación de un SBR es cíclica. La duración de los ciclos puede constituir la principal presión de selección en la comunidad microbiana del sistema. Tay *et al.* (2002b) investigaron el efecto de la presión de selección hidráulica en el desarrollo de gránulos nitrificantes en una columna tipo SBR. Estos autores no observaron granulación nitrificante en el SBR operado con ciclos mayores a 24 horas, debido a la débil presión de selección hidráulica; por otra parte, los lodos nitrificantes se lavaron en los ciclos cortos de

3 horas, lo cual también impidió el desarrollo de los gránulos. En los ciclos de duración comprendida entre 6 y 12 horas, se desarrollaron excelentes gránulos nitrificantes. Un ciclo corto estimula la actividad microbiana y la producción de polisacáridos celulares, y también mejora la hidrofobicidad de las células.

2.5.2.6 Carencia nutricional

El funcionamiento de un reactor SBR se basa en un ciclo repetitivo de las siguientes operaciones: alimentación, aireación, sedimentación y descarga de fluidos sobrenadantes. Como resultado, los microorganismos desarrollados en el SBR están sujetos a condiciones ambientales fluctuantes. El periodo de aireación consiste en dos fases: una fase de degradación, en la cual el sustrato es agotado al mínimo, seguida por una fase de inanición en la cual el sustrato externo ya no puede ser aprovechado. El tiempo requerido para la degradación de residuos tiende a reducirse con el incremento en el número de ciclos de operación, lo cual resulta en períodos más prolongados de inanición. Bajo tales condiciones, los microorganismos tienen la capacidad de cambiar las características de su superficie y llegan a ser más hidrofóbicos, lo cual facilita la adhesión microbiana (Tay *et al.*, 2001a). Así, la agregación es probablemente una estrategia de las células contra la inanición. Aunque la inanición periódica en un SBR es importante para la agregación microbiana, no se debe descuidar la contribución de otras condiciones operacionales.

2.5.2.7 Presencia del ión calcio en la alimentación

Jiang *et al.* (2003) reportaron que la adición de Ca^{2+} aceleró el proceso de agregación microbiana. Con la adición de 100 mg/L de Ca^{2+} , la formación de gránulos aerobios tomó 16 días, en comparación con los 32 días que necesitó un cultivo sin adición de Ca^{2+} . Los gránulos cultivados con Ca^{2+} mostraron mejores características de fuerza y sedimentabilidad, así como un alto contenido de polisacáridos. Se ha propuesto que el Ca^{2+} une los grupos presentes en la superficie bacteriana cargados negativamente y las moléculas de polisacáridos extracelulares, actuando así como un puente para promover la agregación bacteriana. Los polisacáridos juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural de las biopelículas y los gránulos aerobios, y son conocidos por formar un fuerte, pegajoso e indeformable gel polimérico semejante a una matriz.

2.5.2.8 Estrategia de alimentación intermitente

McSwain *et al.* (2003) desarrollaron recientemente una estrategia de operación para acrecentar la granulación aerobia por alimentación intermitente; es decir, se aplicaron distintos tiempos de llenado para variar la duración de los periodos de abundancia y de carencia de sustrato (*feast-fast*). Una duración reducida del periodo de alimentación favoreció la formación de gránulos densos y compactos. Como se explicó en el apartado anterior, bajo condiciones de inanición las bacterias se vuelven más hidrofóbicas, lo cual facilita la adhesión y la agregación microbiana (Bossier y Verstraete, 1996).

2.5.2.9 Oxígeno disuelto, pH y temperatura

La concentración de oxígeno disuelto (OD) es una variable importante que influye en la operación de los sistemas de tratamiento aerobio de aguas residuales. Sin embargo, los gránulos aerobios han llegado a formarse a concentraciones muy bajas de OD, incluso menores a 2 mg/L (Peng *et al.*, 1999; Tay *et al.*, 2002c; Yang *et al.*, 2005). Por lo tanto, parece ser que la concentración de OD no es una variable decisiva en la formación de gránulos aerobios. Respecto al papel que juegan tanto el pH como la temperatura en la granulación aerobia, no existen estudios detallados. Aparentemente, estos factores son menos importantes que en el caso de la granulación anaerobia.

2.5.2.10 Inóculo

Por lo general, los reactores granulares aerobios se han inoculado con lodos activados convencionales. En la granulación anaerobia hay evidencia de que las características del inóculo influyen profundamente en la formación y en las propiedades de los gránulos. Los factores que determinan la calidad del inóculo para la granulación aerobia parecen incluir las características macroscópicas de sedimentación, las propiedades de superficie (son preferibles una elevada superficie hidrofóbica y una baja densidad de carga) y la actividad microbiana. No obstante, hay poca información disponible en lo concerniente al papel del inóculo en la granulación aerobia.

2.5.2.11 Configuración del reactor

Casi en todos los casos reportados, los gránulos aerobios fueron producidos en reactores de columna de flujo ascendente de aire. La configuración del reactor tiene un impacto sobre el patrón de flujo del líquido y de los agregados microbianos en el reactor (Beun *et al.*, 1999; Liu y Tay, 2002). El reactor de columna de flujo ascendente de aire y el reactor de tanque completamente mezclado (*Completely-stirred tank reactor*, CSTR) tienen diferentes funcionamientos hidrodinámicos, en términos de interacción entre el flujo del líquido y de los agregados microbianos. En los reactores de columna, se puede crear un flujo relativamente homogéneo y con un vórtice localizado a lo largo del eje principal del reactor, por lo que los agregados microbianos están sometidos constantemente a un *stress* hidráulico. El flujo circular aparentemente fuerza los agregados microbianos a adaptarse a una forma regular que tiene una superficie mínima de energía libre. En un reactor de columna de flujo ascendente con una razón altura / diámetro elevada (H/D) puede asegurarse una trayectoria de flujo circular, la cual provee un *stress* hidráulico más efectivo a los agregados microbianos. Sin embargo, en los CSTR, éstos se mueven en todas direcciones, por lo que son sometidos a variaciones localizadas en la fuerza hidrodinámica de desgarre, las trayectorias de flujo de aire y las colisiones al azar. Bajo tales circunstancias, ocasionalmente se forman flóculos con tamaño irregular (Liu y Tay, 2002).

Para aplicaciones prácticas, el SBR debería tener una elevada proporción H/D para mejorar la selección de gránulos por diferencias en la velocidad de sedimentación (Beun *et al.*, 1999). Además, debido a la elevada proporción H/D y a la ausencia de un sedimentador externo, el reactor ocupará un espacio pequeño.

2.5.2.12 Inhibición de la granulación aerobia

Yang *et al.* (2003, 2005) investigaron el efecto inhibitorio del amonio libre en la granulación aerobia en un SBR alimentado con acetato como única fuente de carbono. Los gránulos aerobios se formaron sólo cuando la concentración de amonio libre fue menor a 23.5 mg/L, mientras que la nitrificación fue completamente inhibida a concentraciones de amonio libre mayores a 10 mg/L. Las velocidades específicas de consumo de oxígeno

específico (SOUR) de las bacterias heterotróficas y nitrificantes se redujeron por un factor 2.5 y 5.0, respectivamente, cuando la concentración de amonio libre se incrementó de 2.5 a 39.6 mg N/L. La elevada concentración de amonio libre resultó en un notable decremento de células hidrofóbicas y reprimió la producción de polisacáridos extracelulares. Estos cambios probablemente fueron responsables del fracaso de la granulación aerobia a una alta concentración de amonio libre. Yang *et al.* (2004b) demostraron que el amonio libre puede impedir la formación de gránulos aerobios por la inhibición del metabolismo microbiano.

2.5.3 Estructura y diversidad microbiana

El estudio de la estructura y diversidad microbiana en los sistemas de tratamiento de aguas residuales es esencial para un mayor entendimiento de los procesos que ahí ocurren. Sin embargo, tal estudio no es del todo sencillo, sobre todo en lo concerniente a la ecología de los gránulos aerobios.

2.5.3.1 Estructura microbiana

Para el estudio de la microestructura de los gránulos aerobios, se han utilizado principalmente microscopios confocales láser de barrido (CLSM), con diferentes sondas de oligonucleótidos, fluorocromos específicos y microesferas fluorescentes (Tay *et al.*, 2002d; Jang *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2003; Toh *et al.*, 2003). Las bacterias nitrificantes, como *Nitrosomonas* spp., que son organismos aerobios obligados, se encontraron principalmente a una profundidad de 70 a 100 μm de la superficie del gránulo. Se observó que los gránulos aerobios contenían canales y poros que penetraban a una profundidad de 900 μm bajo la superficie del gránulo; la porosidad máxima se encontró a profundidades de 300 a 500 μm (Tay *et al.*, 2002d, 2003). Estos canales y poros podrían facilitar el transporte de nutrientes y oxígeno al interior y de metabolitos al exterior de los gránulos. La formación máxima de polisacáridos se da a una profundidad de 400 μm (Tay *et al.*, 2002e), mientras que una capa de células muertas se localiza a una profundidad de 800 a 1000 μm (Toh *et al.*, 2003). En términos de actividad de los microorganismos aerobios, el diámetro óptimo de los gránulos debería ser menor a 1600 μm , lo cual es dos veces la distancia de la superficie del gránulo a la capa anaerobia (Tay *et al.*, 2002d).

Consecuentemente, los gránulos pequeños serán más efectivos para el tratamiento de aguas residuales, ya que tienen más células vivas en un volumen determinado.

Las investigaciones han mostrado que las biopelículas de comunidades bacterianas mixtas pueden formar densas capas con diversas estructuras de hongos (Costerton *et al.*, 1981), que son similares a las estructuras observadas en gránulos aerobios. Se ha demostrado que las biopelículas pueden desarrollar estructuras fúngicas por un simple cambio en la velocidad de difusión; esto es, la estructura de la biopelícula es enormemente determinada por la concentración de nutrientes (Wimpenny y Colasanti, 1997). Recientemente, Liu y Tay (2004) observaron la estructura de ciertos hongos en gránulos aerobios desarrollados a altas relaciones N/DQO. La población nitrificante se localizó principalmente a una profundidad de 70 a 100 μm de la superficie del gránulo (Tay *et al.*, 2002d). Como Watnick y Kolter (2000) notaron en biopelículas, las bacterias se distribuyen de acuerdo a su supervivencia en un determinado microambiente y la alta complejidad de la comunidad microbiana parece ser benéfico para su estabilidad; en consecuencia, la distribución de las diferentes poblaciones microbianas en un gránulo puede tener un efecto sobre su estabilidad.

2.5.3.2 Diversidad microbiana

La diversidad microbiana de los gránulos aerobios se ha estudiado por diversas técnicas de biotecnología molecular (Tay *et al.*, 2002d; Jang *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2003; Tsuneda *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003). Se han identificado bacterias heterotróficas, nitrificantes, desnitrificantes, acumuladoras de fósforo y de glucógeno, en gránulos aerobios desarrollados bajo diferentes condiciones (Jang *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003d; Meyer *et al.*, 2003; Tsuneda *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003). La diversidad microbiana de los gránulos aerobios está íntimamente relacionada a la composición del medio (Liu y Tay, 2004).

La anaerobiosis y las células muertas se han documentado en el centro de los gránulos aerobios (Tay *et al.*, 2002e). La presencia de bacterias anaerobias en los gránulos aerobios es probablemente resultado de la producción de ácidos orgánicos y gases dentro de los gránulos. Los productos finales del metabolismo anaerobio pueden destruir los gránulos o reducir al mínimo su estabilidad a largo plazo.

2.5.4 Aplicaciones de la granulación aerobia

El funcionamiento de un sistema biológico para el tratamiento de aguas residuales depende significativamente de la concentración de biomasa activa, la velocidad de biodegradación total, la configuración del reactor y las velocidades de alimentación de los contaminantes y del oxígeno. La eficiencia de los procesos a gran escala de las plantas de tratamiento puede mejorarse usando lodos granulares en métodos que necesiten elevadas velocidades de conversión y la separación eficiente de la biomasa para minimizar el volumen del reactor. Las capacidades de tratamiento pueden ser fácilmente modificadas para alojar velocidades de carga distintas y aguas residuales de composición variable.

2.5.4.1 Tratamiento de aguas residuales con alta carga orgánica

La granulación puede llevar a una alta retención de la biomasa en el reactor debido a la densa y compacta estructura de los gránulos. Se han obtenido concentraciones de biomasa tan altas como 6-12 g/L en SBR operados con una razón de intercambio volumétrico del 50% (Tay *et al.*, 2002 a, c). Moy *et al.* (2002) investigaron la resistencia de los gránulos aerobios hacia altas velocidades de carga orgánica introduciendo etapas adicionales en la carga orgánica sólo después de una remoción eficiente de la DQO, la cual mostró valores estables alrededor del 89%. Los gránulos aerobios cultivados con glucosa por este método se expusieron a altas velocidades de carga orgánica, la cual se incrementó gradualmente de 6.0 a 15.0 Kg DQO/m³d. Los gránulos aerobios fueron capaces de resistir la máxima velocidad de carga orgánica y removieron más del 90% de la DQO. Inicialmente, los gránulos exhibieron una morfología esponjosa dominada por bacterias filamentosas, la cual se fue transformando hasta caracterizarse por pliegues, rendijas y depresiones a altas cargas orgánicas. Estas irregularidades conllevaron a una mejor difusión y penetración de los nutrientes hacia el interior del gránulo.

2.5.4.2 Remoción simultánea de materia orgánica y nitrógeno

La remoción total de nitrógeno involucra nitrificación y desnitrificación. Los nitritos y los nitratos producidos por la nitrificación son reducidos a nitrógeno gaseoso por los desnitrificantes. Yang *et al.* (2004a, 2005) investigaron la remoción simultánea de materia orgánica y nitrógeno por gránulos aerobios. Las poblaciones heterotróficas aerobias, nitrificantes y desnitrificantes mostraron coexistir prósperamente en los gránulos microbianos. Al incrementarse la relación N/DQO, se produjeron cambios significativos en las tres poblaciones dentro de los gránulos. La coexistencia de las poblaciones heterotróficas y nitrificantes en los gránulos aerobios también fueron observadas por Jang *et al.* (2003), quienes incrementaron las actividades de las poblaciones nitrificantes y desnitrificantes en gránulos desarrollados a altas relaciones N/DQO. Sin embargo, las poblaciones heterotróficas tienden a disminuir con el incremento de esta relación. La concentración de OD tiene un notable efecto sobre la eficiencia de la desnitrificación; así mismo, se necesita un cierto nivel de mezcla para asegurar la suficiencia de la transferencia de masa entre el líquido y los gránulos durante la desnitrificación (Yang *et al.*, 2003).

2.5.4.3 Remoción de fósforo

Las regulaciones ambientales en muchas jurisdicciones requieren una reducción de fósforo en la concentración de las aguas residuales a niveles de 0.5-2.0 mg/L antes de la descarga. La remoción biológica de fósforo (EBPR) es un proceso que no requiere precipitación química y es una opción económica y segura para la remoción de fósforo de aguas residuales. El proceso EPBR opera según condiciones aerobias y anaerobias alternadas, con alimentación de sustrato limitante en la etapa anaerobia. Muchos procesos EPBR se basan en cultivos de biomasa suspendida y requieren reactores con volúmenes muy grandes. Aunque las experiencias a escala muestran un fuerte potencial del EPBR, se reconocen las dificultades para asegurar su estabilidad y operación. Las razones del fracaso de la remoción biológica del fósforo no son del todo claras (Barnard *et al.*, 1985; Bitton, 1999).

Lin *et al.* (2003) desarrollaron exitosamente gránulos microbianos acumuladores de fósforo en SBRs operados a relaciones P/DQO en el rango de 1/100 a 10/100 en peso.

Los perfiles de DQO soluble y P-PO₄ muestran que los gránulos aerobios tienen características típicas de acumulación de fósforo, con la degradación concomitante de carbono orgánico soluble y la liberación de fosfato en la etapa anaerobia, seguido por el consumo rápido de fosfato en la etapa anaerobia. El tamaño de los gránulos acumuladores de fósforo exhibió una tendencia a disminuir con el incremento en la razón P/DQO. La remoción de fósforo estuvo en el rango de 1.9 a 9.3% en peso, lo que es comparable al proceso EBPR. Estos resultados dieron un gran paso en el desarrollo de una tecnología EBPR novedosa basada en gránulos aerobios.

2.5.4.4 Bioadsorción de metales pesados por gránulos aerobios

Los metales pesados se encuentran frecuentemente en una amplia variedad de aguas residuales industriales. Se han probado diversos biomateriales como adsorbentes para la remoción de metales pesados. Estos incluyen algas marinas, hongos, lodos activados y lodos digeridos (Lodi *et al.*, 1998; Taniguchi *et al.*, 2000; Valdman y Leite 2000). En vista de las características físicas de los gránulos aerobios ya discutidas, éstos son bioadsorbentes ideales de metales pesados, ya que son físicamente fuertes, tienen una gran área superficial y una gran porosidad para la bioadsorción. Además, los gránulos pueden separarse fácilmente de la fase líquida después de que su capacidad de bioadsorción se ha agotado. Se ha reportado la bioadsorción de Zn²⁺ y Cd²⁺ por gránulos aerobios (Liu *et al.*, 2002, 2003b, c). La bioadsorción de Zn²⁺ ha mostrado estar relacionada a las concentraciones iniciales tanto de Zn²⁺ como de gránulos (Liu *et al.*, 2002). El gradiente de concentración del Zn²⁺, fue la fuerza principal que dirigió la bioadsorción de Zn²⁺ por los gránulos. La capacidad máxima de bioadsorción de Zn²⁺ fue de 270 mg/g de gránulos. Para Cd²⁺ esta capacidad fue de 566 mg/g (Liu *et al.*, 2003c).

2.5.4.5 Bioadsorción de colorantes por gránulos aerobios

Los colorantes tienen una estructura química compleja y son estables a la luz, el calor y agentes oxidantes. Algunas tecnologías de tratamiento existentes, como la coagulación/floculación química, la ozonación y la adsorción, que podrían ser eficientes para la remoción de estos colorantes, son sin embargo bastante caras. Para este propósito, algunos biomateriales (*i.e.*, algas marinas, biomasa, lodos activados de aguas residuales y lodos digeridos) han sido probados como adsorbentes, por lo general en

forma de suspensiones. Los principales problemas asociados a este tipo de bioadsorbentes son la separación de la biomasa suspendida del efluente tratado, la estabilidad de los bioadsorbentes y la regeneración de los mismos.

Zheng *et al.* (2005) realizaron experimentos *batch* que condujeron al estudio de las características de adsorción de un colorante catiónico, la rodamina B, en gránulos aerobios. Fue evaluado el efecto de pH, sólidos suspendidos (SS), la fuerza iónica y la temperatura de la solución en colorantes adsorbidos por gránulos aerobios y también se llevó a cabo el análisis termodinámico. Los resultados demostraron que el pH fue un factor importante que gobierna la adsorción siendo el pH óptimo de 7.0. Un incremento en la fuerza iónica y la temperatura de la solución disminuye la densidad de adsorción del colorante. El análisis del modelo isotérmico indicó que la adsorción del colorante por los gránulos aerobios puede describirse muy bien por la ecuación de Langmuir. Con la isoterma de Langmuir, se estimó el área específica de los gránulos. La cantidad máxima adsorbida por parte de los gránulos fue tres veces mayor que la presentada por flóculos de lodos activados, pero los primeros requirieron más tiempo para alcanzar el equilibrio.

2.6 TRATAMIENTO DE FENOL EN REACTORES GRANULARES AEROBIOS

Los lodos granulares aerobios son menos susceptibles a la toxicidad del fenol, ya que la mayor parte de la biomasa que los constituye no está expuesta a altas concentraciones de este compuesto. Jiang *et al.* (2002, 2004) investigaron la posibilidad de tratar aguas residuales fenólicas con lodos granulares aerobios, los cuales mostraron una excelente capacidad para degradarlo hasta una concentración de 500 mg/L (Jiang *et al.*, 2002, 2004).

Tay *et al.* (2005) cultivaron gránulos aerobios en cuatro reactores de alimentación secuenciada con acetato como principal fuente de carbono, con una carga másica de 3.8 kg/m³·d. Posteriormente, los reactores fueron alimentados con distintas cargas de fenol (0, 0.6, 1.2 y 2.4 kg/m³·d). Los gránulos se aclimataron rápidamente al fenol, y se estabilizaron una semana después de que el fenol fue introducido. Los gránulos mostraron una buena capacidad de sedimentación, concentraciones estables de biomasa y buenas remociones de acetato y fenol. El reactor que trató una carga de 0.6 kg/m³·d

degradó completamente el fenol a los 60 min, mientras que el reactor con la carga de 1.2 kg/m³·d removi6 por completo esta mol6cula al cabo de 90 min. Por 6ltimo, el reactor con 2.4 kg/m³·d present6 dificultades para remover el fenol durante los primeros ciclos; sin embargo, a partir del ciclo 43 pudo degradarlo completamente. Estos gr6nulos tenían un di6metro comprendido entre 1 y 1.5 mm.

Estos resultados muestran que los gr6nulos cultivados a partir de acetato sirvieron como un excelente in6culo para el desarrollo de gr6nulos degradadores de fenol. La estructura compacta de los gr6nulos protegi6 los microorganismos contra la toxicidad del fenol y produjo buenas velocidades de degradaci6n. Este es el primer estudio que demuestra los beneficios del uso de gr6nulos cultivados sobre un substrato f6cilmente asimilable para producir gr6nulos que degraden compuestos t6xicos.

Liu *et al.* (2002) realizaron experimentos similares a los mencionados anteriormente, en los que estudiaron la influencia del fenol en cultivos de lodos granulares aerobios alimentados con acetato. Para este prop6sito, estudiaron la cin6tica de biodegradaci6n de acetato en presencia de diferentes concentraciones de fenol (0-50 mg/L), mientras que los rangos de concentraciones iniciales de biomasa y acetato fueron 109-186 mgSS/L y 185-300 mgDQO/L, respectivamente. Los resultados mostraron que el consumo de acetato en presencia de fenol sigui6 una cin6tica de orden cero, y que la adici6n de fenol puede inhibir seriamente la actividad de los gr6nulos y consecuentemente el uso de acetato. Esta y previas investigaciones sugieren que la relaci6n entre las concentraciones iniciales de compuestos inhibitorios y de biomasa podría reflejar razonablemente la resistencia real de la comunidad microbiana a compuestos t6xicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los compuestos fenólicos son contaminantes frecuentes en aguas residuales de distintas industrias, tales como refinerías petroleras, plantas químicas, de fabricación de resinas, etc. Por muchos años estos compuestos han sido tratados en sistemas de lodos activados, mediante los cuales son degradados por consorcios microbianos de origen natural. Sin embargo, a causa de su carácter inhibidor de la actividad microbiana a altas concentraciones, los sistemas tradicionales presentan numerosas limitaciones, entre las que se encuentra su escasa estabilidad luego de cambios en la carga contaminante.

En este trabajo se pretende aumentar la eficacia de los sistemas biológicos de depuración de fenol en aguas residuales, aumentando su actividad por medio de la granulación de la biomasa. Para ello, se obtendrá un consorcio microbiano granular capaz de biodegradar fenol. Así mismo, se estudiará la cinética de la biodegradación, para la cual se planteará un modelo de degradación.

3.2 JUSTIFICACIÓN

La descontaminación de los efluentes fenólicos antes de su descarga al medio acuático natural es muy importante, principalmente debido a su elevada toxicidad. La mayoría de los compuestos fenólicos son tóxicos para los ecosistemas receptores.

En virtud de las crecientes demandas de reúso del agua, y de las cada vez más estrictas reglamentaciones ecológicas, es necesario disponer de sistemas eficientes de tratamiento de aguas residuales. Tales sistemas deben garantizar la remoción total de compuestos xenobióticos como el fenol, cuya concentración no debe ser superior a 0.1 mg/L para protección de la vida acuática en cuerpos de agua dulce, según lo establecen los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua. El presente proyecto plantea el uso de la granulación aerobia como una alternativa para el tratamiento de este compuesto.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener un consorcio microbiano granular capaz de degradar fenol presente en aguas residuales utilizando un reactor discontinuo de alimentación secuenciada.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Instrumentar y automatizar un reactor discontinuo de alimentación secuenciada para la biodegradación del fenol.
- Obtener un consorcio microbiano granular a partir de lodos activados de una planta de tratamiento de agua residual.
- Estudiar la cinética de degradación de la materia orgánica en el reactor de granulación.
- Aclimatar el consorcio microbiano a una concentración de 100 mg/L y estudiar la cinética de degradación del fenol en el reactor de granulación.
- Estudiar cinéticas de degradación del fenol a diferentes concentraciones en matraces agitados.
- Proponer un modelo que describa mejor la relación que existe entre la velocidad específica de degradación y la concentración de fenol.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 INÓCULOS MICROBIANOS

Para el arranque del reactor de granulación, se utilizó como inóculo el sobrenadante de lodos activados muestreados en el tanque de aireación de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas ubicada en el Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), Campus Pachuca, Hgo.

La relación volumétrica de inoculación fue de 200 mL por 1.1 L de medio. El diagrama de flujo de la planta de tratamiento se muestra en la figura 5.1, en el que destacan las siguientes etapas:

- Desbaste (rejillas)
- Etapa de aireación (tratamiento biológico)
- Etapa de separación (clarificación)
- Recirculación de lodos
- Desinfección (cloración)
- Tratamiento de lodos (deshidratación)

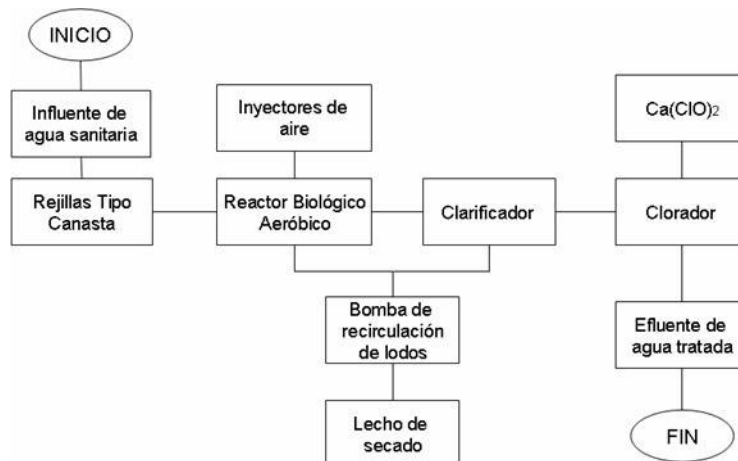


Figura 5.1. Diagrama de bloques del proceso de tratamiento de aguas residuales del ITESM Campus Pachuca.

La planta fue diseñada para tratar 2.5 L/s, de acuerdo a los siguientes parámetros:

Tabla 5.1. Parámetros de diseño de la planta de tratamiento de aguas residuales del ITESM

PARÁMETRO	UNIDADES	INFLUENTE	EFLUENTE
pH	Unidad de pH	7 – 8	7 – 8
DBO ₅	mg/L	220	30
SST	mg/L	220	30
Coliformes totales	NMP/100mL	6 X 10 ⁷	1000
Aceites y grasas	mg/L	40	10
Temperatura	°C	20	20

Otros parámetros útiles en el diseño del control del proceso se muestran en las tablas 5.2 y 5.3.

Tabla 5.2. Parámetros de diseño del tanque de aireación

PARÁMETRO	VALOR
Θ_c	Edad de lodos 20 a 30 días
F/M	Relación alimento/microorganismos 0.05 – 0.15 kg DBO ₅ /kg de SSV·d
CV	Carga volumétrica 0.1 – 0.4 kg DBO ₅ /m ³ ·d
TRH	Tiempo de retención hidráulico 18 a 36 h
Q _{med}	Flujo medio por unidad 2.5 L/s
Capacidad	136 m ³
Diámetro	Diámetro exterior 8 m
Altura	3.5 m
Sistema de aireación	Difusores de burbuja mediana

Tabla 5.3. Parámetros de diseño del clarificador

PARÁMETRO	VALOR
Q _{med}	Flujo medio por unidad 2.5 L/s
Diámetro	Diámetro exterior 6 m
Tipo de paredes	Cónico

5.2 MEDIOS DE CULTIVO

5.2.1 Agua residual sintética

El medio de cultivo que se utilizó se basó en el propuesto por Beun *et al.* (1999), el cual consiste en agua residual sintética con la composición mostrada en la tabla 5.4, y que a su vez se encuentra enriquecida con una solución de elementos traza (tabla 5.5). Durante la aclimatación de los gránulos, al medio de cultivo se le adicionó fenol en concentraciones variables (100 y 200 mg/L), además de la fuente de carbono original (etanol).

Tabla 5.4. Composición del agua residual sintética

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

Tabla 5.5. Composición de la solución de elementos traza

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

Para el estudio de la cinética de degradación de la materia orgánica se utilizó el medio concentrado (el doble al recomendado por Beun *et al.*, 1999) que se muestra en la tabla 5.6.

Tabla 5.6. Composición del agua residual sintética para el estudio cinético de la degradación de la materia orgánica

Compuesto	Concentración
Etanol	0.80 g/L
NH ₄ Cl	0.32 g/L
K ₂ HPO ₄	1.16 g/L
KH ₂ PO ₄	0.46 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.18 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.14 g/L
EDTA	0.04 g/L
Solución de elementos traza	2 mL/L

Para estudiar la cinética de degradación de fenol por parte de gránulos aclimatados a 300 y 400 mg/L de dicha molécula, se modificó el medio de cultivo anteriormente descrito. Con la finalidad de evitar limitaciones nutricionales, se aumentó la concentración de los componentes del medio y no se incluyó al etanol como fuente de carbono. En la Tabla 5.7 se muestra la composición de los medios para el estudio de las cinéticas de degradación del fenol a 300 y 400 mg/L.

Tabla 5.7. Composición del agua residual sintética para los estudios cinéticos a 300 y 400 mg/L de fenol

Compuesto	Concentración en (mL/L) para 300 mg/L de fenol	Concentración en (mL/L) para 400 mg/L de fenol
NH ₄ Cl	11.04	14.8
K ₂ HPO ₄	28.2	37.6
KH ₂ PO ₄	20.2	26.95
MgSO ₄ ·7H ₂ O	11.1	14.8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11.1	14.8
EDTA	11.1	14.8
Solución de elementos traza	1.1	1.48

5.3 CULTIVOS MICROBIANOS

5.3.1 Cultivo de biomasa granular

La granulación de la biomasa se realizó siguiendo el método propuesto por Beun *et al.* (1999). Este método implica el cultivo discontinuo alimentado de muestras de sobrenadante de lodos activados en una columna de vidrio con una elevada relación altura/diámetro y a elevadas velocidades de alimentación y decantación.

El reactor consiste en una columna de burbujeo, en la que el agua residual se trata en ciclos de 3 ó 4 h. El reactor es de vidrio, tiene una altura de 147 cm y un diámetro interno de 5.4 cm. Sus volúmenes nominal y de trabajo son 3.37 y 2.1 L, respectivamente. Las etapas del ciclo de 3 h tienen la siguiente duración: llenado (2 min), aireación (171 min), sedimentación (4 min) y extracción (2 min). Para el de 4 h, llenado (2 min), aireación (231 min), sedimentación (5 min) y extracción (2 min). En la figura 5.2 se muestra el esquema del reactor de granulación.

Al inicio del ciclo se adiciona el agua residual e inicia la aireación. Posteriormente, la aireación se apaga y los gránulos sedimentan; después, el efluente clarificado es extraído por la parte media del reactor. La operación es automática y dirigida por una interfaz gráfica que también controla el suministro de aire (§ 5.4). El aire se adiciona desde la base del reactor, a velocidades comprendidas entre 2.8 y 5 L/min. El tiempo de retención hidráulica es de 7.78 h. El proceso se desarrolla a temperatura ambiente.

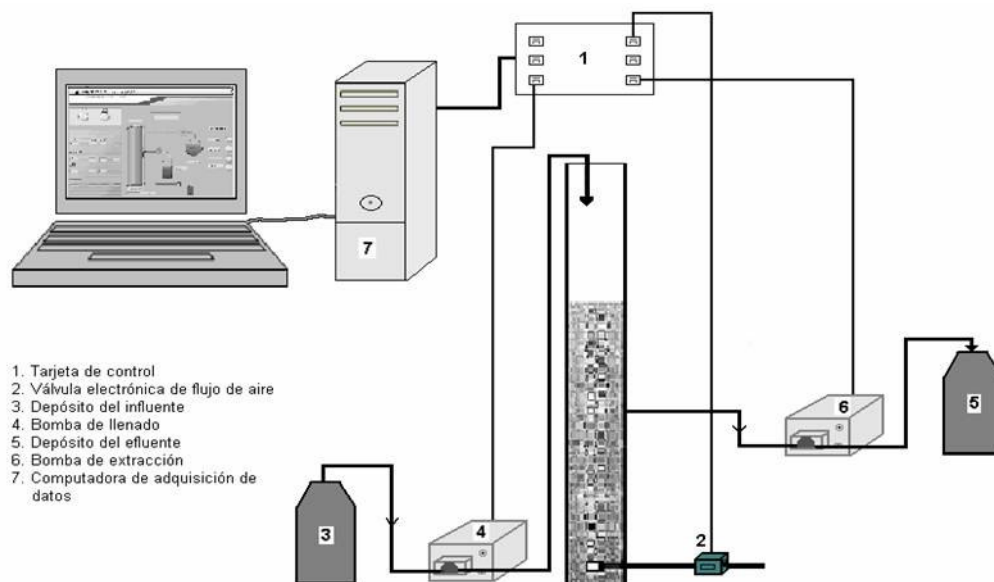


Figura 5.2. Esquema del reactor de granulación

5.3.2 Cultivos en matraces agitados

La cinética de biodegradación de fenol por parte de gránulos aclimatados se estudió en matraces agitados en un baño de agua a 120 rpm y a una temperatura de 25°C. Cada uno de los matraces contenía 400 mL de agua residual sintética desprovista de etanol y éstos fueron inoculados con cantidades iguales de biomasa (2 g). Las concentraciones de fenol estudiadas variaron entre 40 y 1013 mg/L.

5.4 INSTRUMENTACIÓN DEL REACTOR DE BIOMASA GRANULAR

La alimentación y el retiro de agua se llevan a cabo de manera automática mediante bombas peristálticas Masterflex, operadas desde una computadora provista de una interfaz gráfica elaborada por alumnos e investigadores del CITIS-UAEH. El accionamiento de las bombas y la adquisición de datos se llevaron a cabo mediante una tarjeta *National Instruments* NI6024-E. Esta tarjeta cuenta con salidas analógicas y digitales, y fue programada con el software *Lab View 7.1 (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench; National Instruments)*. La interfaz gráfica o panel de control (Figura 5.3) permite programar el inicio y la duración de las diferentes etapas de los ciclos de SBR, simplemente colocando los minutos de funcionamiento de encendido y de apagado de cada dispositivo (*i.e.*, bombas, válvula de aire). Así mismo, cuenta con un

control manual, para que la acción de los dispositivos no dependa del programado de horas y se pueda llevar a cabo fuera del ciclo programado.

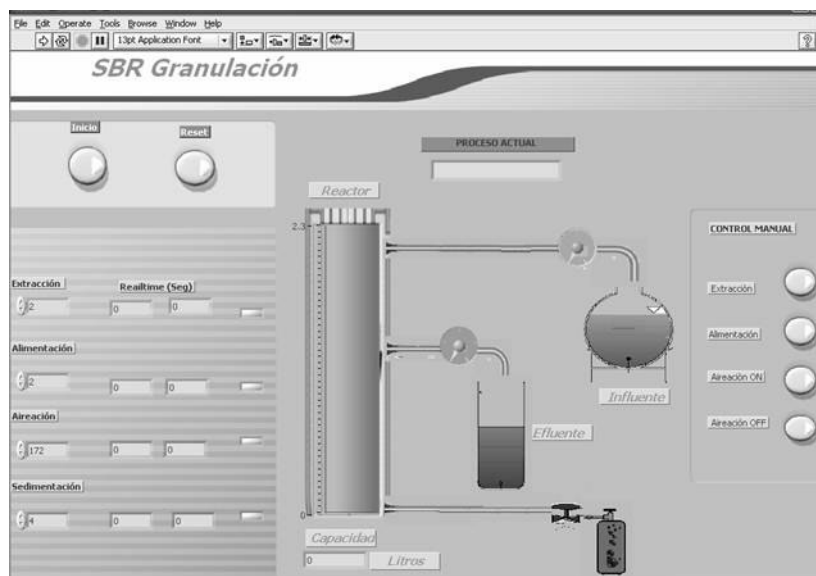


Figura 5.3. Panel de control de un reactor SBR granular

Tanto la tarjeta como el software están instalados en una computadora personal, como se muestra en la figura 5.2. La tarjeta de adquisición está provista de una salida digital, con la que es posible controlar las bombas de llenado y extracción, así como la válvula de aireación.

5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.5.1 Determinación de la concentración de la biomasa

La concentración de biomasa se determinó gravimétricamente como sólidos suspendidos totales (SST) en cápsulas de porcelana mantenidas a peso constante (Método 2540 D, APHA, 1989). Para la determinación, se evapora un volumen conocido de muestra (por lo general 10 mL) a 105 °C por 12 horas, tras las cuales se deja enfriar la cápsula en un desecador y se pesa. El método tiene un límite de detección de 0.284 g SST/L, y un coeficiente de variación de 2.676 % (Ramírez-Cerón, 2005).

5.5.2 Microscopía electrónica de barrido

La finalidad de este análisis es observar y medir a diferentes aumentos el tamaño de partícula del gránulo para lo cual se montaron las muestras en adhesivo y se metalizaron con oro en una evaporadora marca DENTUM BACUUM, en un tiempo de recubrimiento de 2 minutos, a una presión de 20 millitorr. El equipo usado fue un microscopio JEOL 6300, modelo JSM, con un alcance de 300 000 ampliaciones spot size de 10^{-2} a 10^{-5} amp y una resolución de 20 kv. Este equipo cuenta con un microanalizador EDS, una cámara fotográfica (para obtener fotomicrografías) y una videoimpresora, así como el software estudio 9 con el cual se digitalizaron las fotografías directamente del microscopio.

5.5.3 Determinación de la concentración de fenol

5.5.3.1 Método colorimétrico de la 4-aminoantipirina

El método descrito por Woolard e Irvine (1995) permitió cuantificar la concentración de fenol en medio acuoso. A 2 mL de muestra centrifugada, se adicionan 0.2 mL de solución de $K_3Fe(CN)_6$ al 5% (m/v) en glicina 0.1M. Se agita y se deja reaccionar por 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se agregan 2 mL de solución de 4-aminoantipirina al 0.25% (m/v) disuelta en solución tampón de glicina (preparada por disolución de 5.58 g de hidrocloreto de glicina y de 3.75 g de glicina en 0.91 L de agua destilada, ajustando el pH a 9.7 con una solución de NaOH 6N para un volumen final de 1 L). La mezcla se agita y se deja reaccionar por 20 minutos. La absorbancia a 506 nm se mide en espectrofotómetro Genesys 10vis, Termo Electron Co., E. U. A., en un lapso máximo de 30 minutos, ya que una lectura posterior a este tiempo provoca una disminución en la respuesta del análisis. La concentración de fenol de la muestra se obtiene por comparación con una curva de calibración (0-25 mg/L) como se muestra en la figura 5.4. El método tiene un límite de detección de 0.0726 mg/L, y un coeficiente de variación promedio de 1.06% (Ramírez-Cerón, 2005).

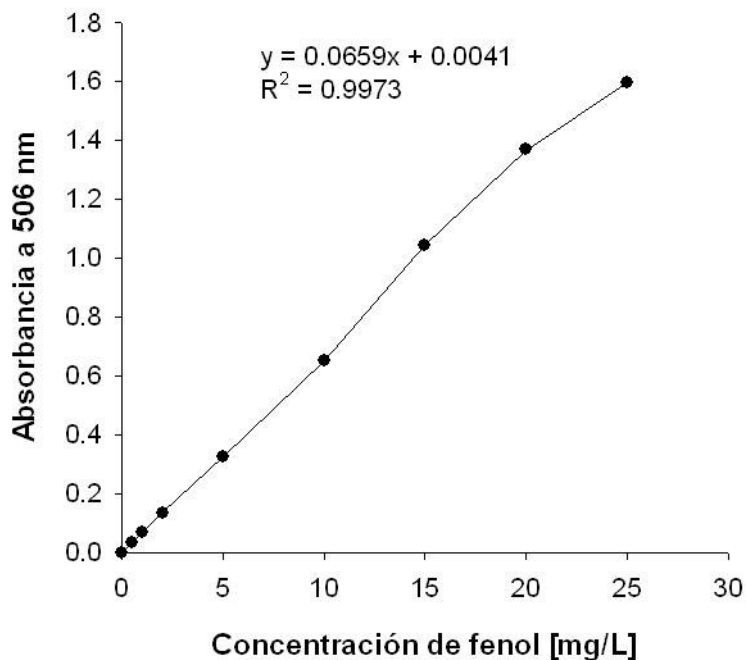


Figura 5.4. Curva de calibración para la determinación de fenol por el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina

5.5.3.2 Método espectrofotométrico UV

Este método se utilizó como un ensayo rápido para la cuantificación de fenol durante el estudio de la cinética de biodegradación. Se basa en la medición de la absorbancia de muestras centrifugadas a una longitud de onda de 269 nm. Este método permite medir concentraciones de fenol comprendidas entre 0 y 25 mg/L de fenol.

5.5.4 Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Para la determinación de la DQO se utilizó el micrométodo 5220 D de la EPA (APHA, 1989). A 2.5 mL de muestra, se agregan 1.5 mL de solución digestora (10.216 g de $K_2Cr_2O_7$, 33.3 g de $HgSO_4$ y 167 mL de H_2SO_4 por litro) y 3.5 mL de solución de ácido sulfúrico (10.142 g de Ag_2SO_4 por litro de H_2SO_4). Las muestras se llevan a digestión dentro de un bloque de calentamiento (COD Reactor 45600, Hach Co., E.U.A.) a 105°C durante 2 horas. Una vez finalizada la digestión de las muestras, éstas se dejan enfriar hasta temperatura ambiente y se lee su absorbancia a 600 nm. Los valores de DQO se

obtienen a partir de una curva de calibración realizada con biftalato de potasio (0-600 mg/L, equivalentes a 0-705 mg DQO/L), como se observa en la figura 5.5.

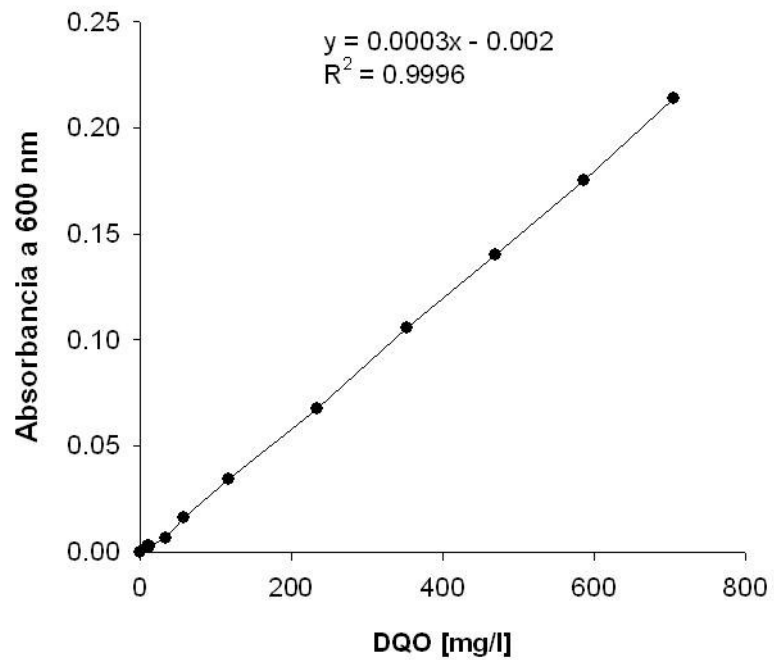


Figura 5.5. Curva de calibración para la determinación de la DQO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 GRANULACIÓN DE LA BIOMASA A PARTIR DE UN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA

6.1.1 Obtención de los gránulos

Los componentes del agua residual sintética que se utilizó para la obtención de los gránulos se describen en las tablas 5.4 y 5.5 (§ 5.2.1). Esta agua residual se empleó para alimentar el reactor con ciclos de trabajo de 3 h durante 82 días; posteriormente, para economizar los insumos, se decidió cambiar el tiempo de los ciclos de trabajo a 4 h.

Inicialmente el flujo de aire al sistema era de 2.8 L/min; durante esta etapa, no se logró la obtención de gránulos. Una vez que el flujo se incrementó (5 L/min), se obtuvieron los primeros gránulos. Si el flujo de aire se expresa en términos de velocidad superficial (V_s), los valores empleados durante los experimentos equivalen a 0.020 y 0.036 m/s, respectivamente. Cabe mencionar que ambas V_s son superiores al umbral de 0.012 m/s señalado por Liu y Tay (2004), por debajo del cual no se observa formación de gránulos. Así mismo, Liu y Tay (2002) señalan la formación de gránulos sólidos y regulares sólo a V_s superiores a 0.025 m/s, mientras que si esta velocidad se mantiene a 0.0003 m/s sólo se observan flóculos convencionales de lodos activados.

De tal manera, la ausencia de granulación en la primera etapa de la experimentación podría deberse a una V_s insuficiente, cuya principal consecuencia es una escasa fuerza de desgarre, que limita la producción de polisacáridos extracelulares y en consecuencia la cohesión microbiana. El flujo de aire (*i.e.*, la V_s) es quizás la variable que más afecta al proceso de granulación, ya que su fluctuación inmediatamente afecta la obtención de estructuras granulares densas y estables.

Después de siete días de aumentar la velocidad de aireación se observó la formación de los primeros gránulos. Estos tenían un diámetro aproximado de 1 mm, una coloración amarillenta y se desintegraban fácilmente al tacto. Después de 40 días de cultivo a las mismas condiciones, estos gránulos se presentaban con el aspecto mostrado en la figura 6.1.



Figura 6.1. Macroestructura de un gránulo aerobio después de 40 días de operación

Después de 40 días de operación, los gránulos tenían en promedio un diámetro mayor (3 mm) al obtenido al inicio del cultivo; así mismo, se observó que su resistencia y su densidad se incrementaron. En la figura 6.2 se observa de manera más detallada las bacterias que componen el gránulo. En el primer plano destacan algunas bacterias con forma bacilar. Estas fotografías fueron obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

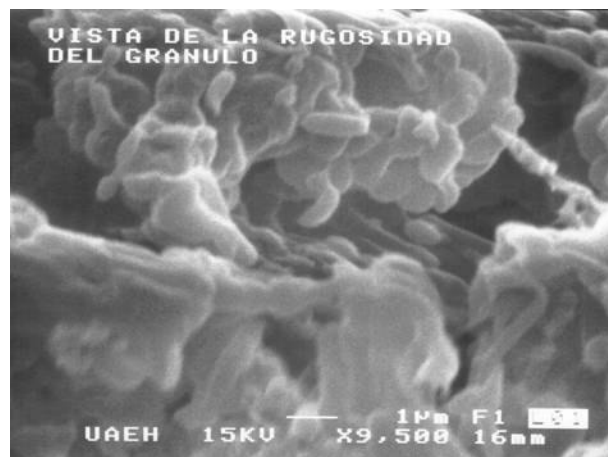


Figura 6.2. Vista de las bacterias que componen el gránulo

Se realizaron análisis de distribución de tamaño de los gránulos para determinar el tamaño promedio de los mismos por difracción de rayo láser (Analizador Beckman Coulter, LS13 320). El primer análisis fue a los 74 días de operación del reactor y se observó que el 65% de los gránulos tenía un tamaño comprendido entre 716 y 1250 μm , con el mayor porcentaje (16%) situándose entre 716 y 787 μm (figura 6.3).

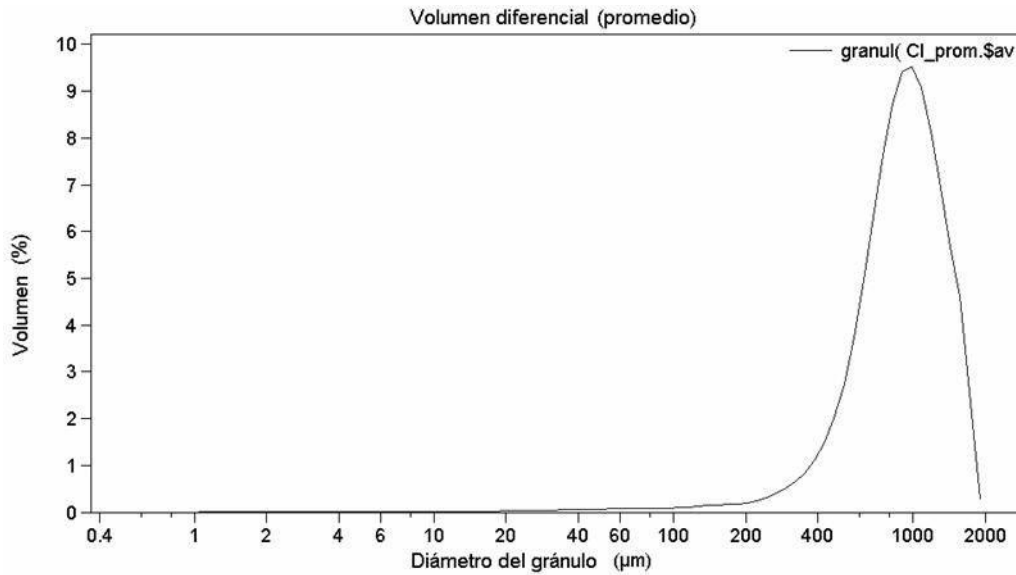


Figura 6.3. Distribución del tamaño de los gránulos después de 74 días de operación

En la figura 6.4 se muestran los datos obtenidos en el segundo análisis, después de 124 días de operación. Se observa que el tamaño de los gránulos se ha incrementado en relación al análisis anterior, ya que el 65% de los gránulos presentó un tamaño comprendido entre 862 y 1513 μm . En esta fracción, el mayor porcentaje (10.9%) tiene un tamaño de partícula comprendido entre 1254 y 1256 μm .

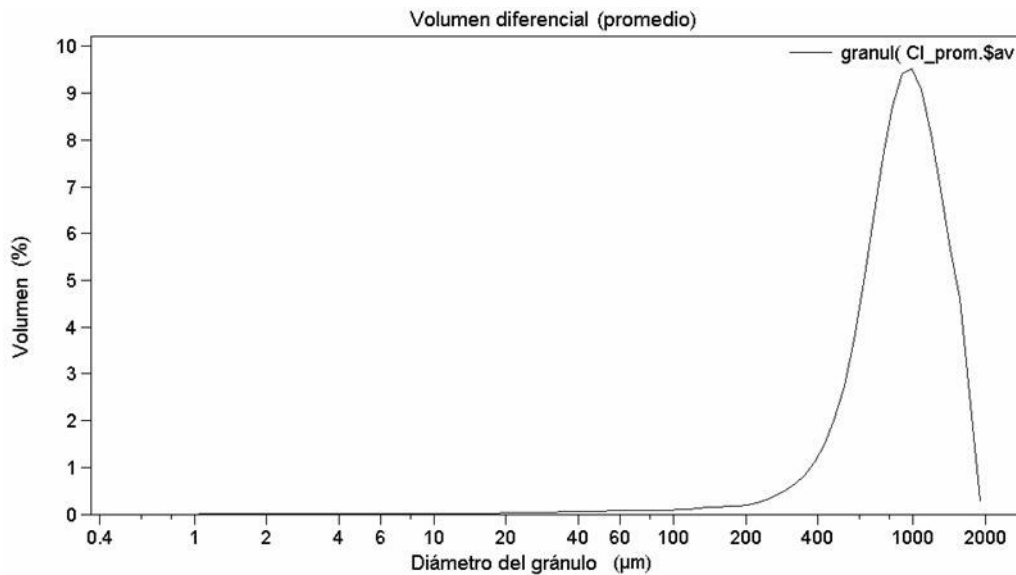


Figura 6.4. Distribución del tamaño de los gránulos después de 124 días de operación

Como se muestra en ambas gráficas, el tamaño de los gránulos cambia continuamente. Esta variable del proceso incide en su estabilidad, la cual ha sido señalada como el “cuello de botella” que impide la aplicación a mayor escala de esta nueva tecnología (Liu *et al.*, 2005). De esta manera, un mayor tamaño de los gránulos no favorece la remoción de materia orgánica debido a mayores limitaciones de transferencia de masa, que impiden que los microorganismos situados más al interior del gránulo dispongan del sustrato en cantidades adecuadas.

Si el sustrato no puede penetrar al centro del gránulo, los exopolisacáridos pueden ser utilizados como fuente de energía, lo cual conlleva a estructuras granulares más porosas e incluso a la desagregación de la biomasa. Así mismo, el núcleo del gránulo se enriquece paulatinamente en biomasa muerta. Tay *et al.* (2003) determinaron que los gránulos pequeños, con un tamaño de aproximadamente 600 μm , estaban constituidos principalmente por biomasa viva. Por otra parte, Tay *et al.* (2002e) detectaron una capa de células muertas a una profundidad de 800-900 μm de la superficie de los gránulos. Para Liu *et al.* (2005), no es posible determinar un tamaño óptimo de los gránulos, y sólo insisten en la importancia de mantener un tamaño reducido de los gránulos, lo cual se ve favorecido con altas fuerzas de desgarre dentro del reactor (*i.e.*, elevadas V_s). No obstante, Tay *et al.* (2003) sugieren que los gránulos deben tener diámetros menores a 0.5 mm.

6.1.2 Eficiencia de la depuración

Para determinar la eficiencia de depuración del sistema, se tomaron muestras del efluente, influente y del medio de granulación, en las cuales se determinó la demanda química de oxígeno (DQO) como se describió anteriormente (§ 5.5.3). Los porcentajes de remoción obtenidos se muestran en las figuras 6.5 y 6.6.

En la figura 6.5 se muestra el porcentaje de remoción de DQO de las muestras tomadas del reactor de granulación, en las que el medio de granulación tiene la composición recomendada inicialmente por Beun *et al.* (1999) (Tabla 5.4). El porcentaje de remoción

promedio fue de 53.97%, con una concentración inicial promedio de DQO de 168.42 mg/L en el reactor.

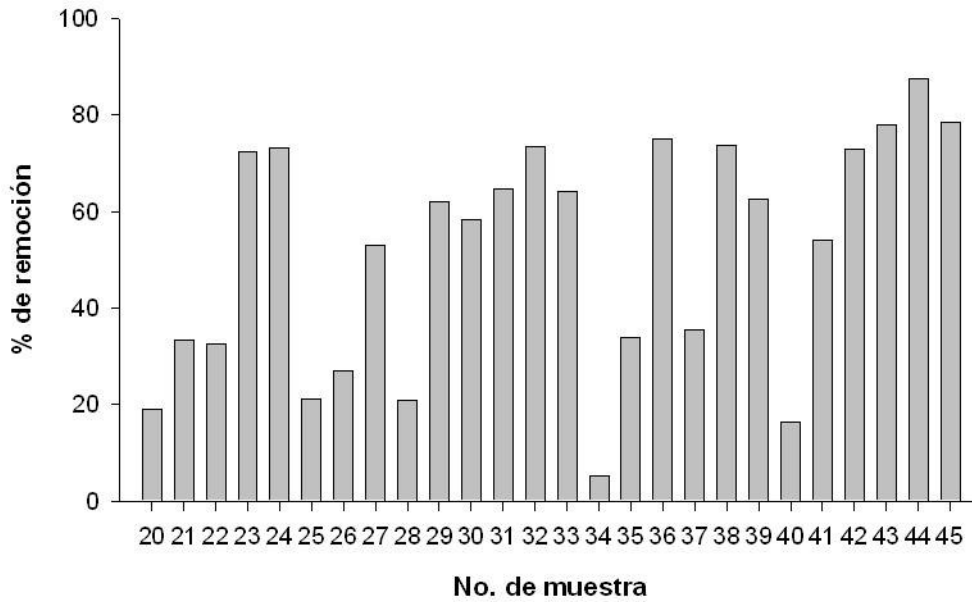


Figura 6.5. Porcentajes de remoción de DQO utilizando medio simple

En la figura 6.6 se observa el porcentaje de remoción de DQO de las muestras tomadas del reactor de granulación con el medio concentrado descrito previamente (Tabla 5.6). Se observó un porcentaje de remoción promedio de 68.65% con una concentración inicial de DQO promedio de 299.02 mg/L en el reactor.

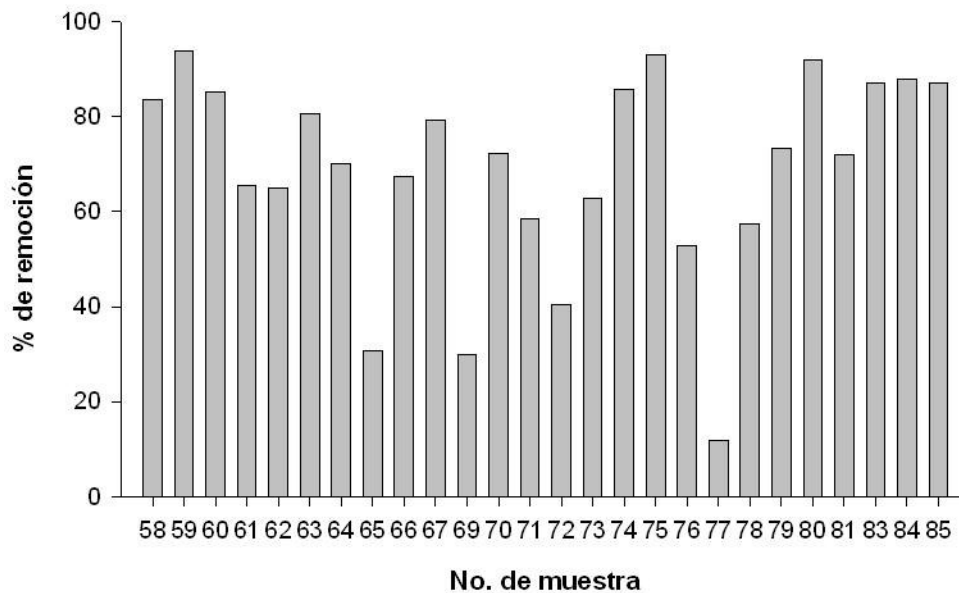


Figura 6.6. Gráfica de porcentaje de remoción de DQO con medio concentrado

Durante este periodo se monitoreó la concentración de biomasa en el reactor, y se calcularon valores promedio de 10.05 g SST/L ($s = 1.67$ g SST/L, $n = 6$).

Las composiciones en el medio de granulación se traducen en cargas volumétricas (C_v) de 1.28 y 3.35 kg DQO/m³·d. Este segundo valor de la C_v es superior al empleado por Dangcong *et al.* (1.5 kg DQO/m³·d; 1998), pero comparable al utilizado por Tay *et al.* (3.8 kg DQO/m³·d; 2005).

Para las cargas volumétricas aplicadas se obtuvieron remociones medias de DQO del 72 y 88%, con desviaciones estándar de 24% y 21%, respectivamente. La eficiencia de remoción de la DQO es semejante a la reportada por Morgenroth *et al.* (87%; 1997) y por Arrojo *et al.* (85-95%; 2004) para melazas y aguas residuales industriales, respectivamente. Sin embargo, en nuestros experimentos, no pudimos establecer la relación que existe entre el tamaño de los gránulos y la eficiencia del tratamiento (§ 6.1.1).

Al aumentar la carga másica se aumentó también la velocidad específica de consumo de materia orgánica (q_s) de 24.7 a 53.5 mgDQO/gSST·h. Dado que se observó una mayor eficiencia de la depuración con el efluente concentrado, éste se conservó como medio de cultivo de los gránulos. Al mismo tiempo se aumentó la capacidad del sistema, ya que se trató una C_v mayor.

6.1.3 Cinética de degradación de la materia orgánica

El primer estudio cinético de degradación de la materia orgánica en el reactor de granulación se realizó con el efluente simple (Figura 6.7). Se observó que en los primeros veinte minutos la concentración de DQO había disminuido en un 63%, pero que luego ese nivel no había podido reducirse durante el resto del ciclo. En esta cinética el porcentaje de remoción promedio fue de 44.5%.

La segunda cinética de degradación de la materia orgánica se realizó una vez que los gránulos se aclimataron al medio concentrado y como en el anterior estudio, también se llevó a cabo dentro del reactor. Como puede observarse en la figura 6.7, el comportamiento de la DQO en la gráfica mostró que la degradación se lleva a cabo a

velocidad constante, es decir, que sigue una cinética de orden cero, con un porcentaje de remoción promedio de 91.5% al cabo de 53 minutos. Como puede observarse, la mayor parte del ciclo se lleva a cabo en ausencia de sustrato carbonado, por lo que es factible aumentar aún más la Cv del sistema o reducir la duración del ciclo.

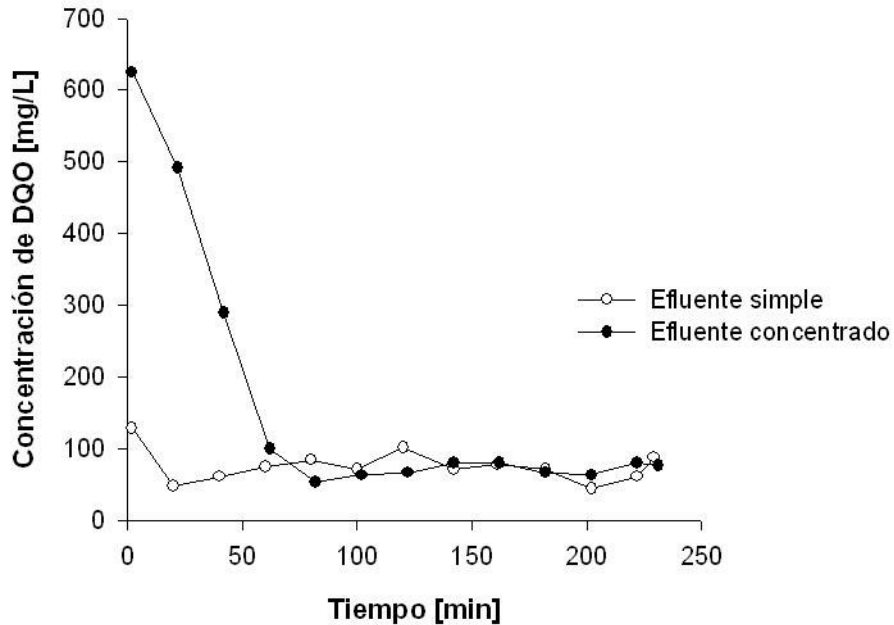


Figura 6.7. Degradación de la materia orgánica en el reactor de granulación en el efluente (○) simple y (●) concentrado.

6.2 ACLIMATACIÓN DE LOS GRÁNULOS AL FENOL

6.2.1 Aclimatación a 100 mg fenol/L

Para este estudio se siguió utilizando el efluente concentrado como medio de granulación, pero se le adicionó fenol a razón de 100 mg/L. Dado que el reactor tiene una razón de intercambio volumétrico del 47.6%, la concentración de fenol dentro del reactor es menor (aproximadamente 40 mg/L). Se registró el pH (7) dentro del reactor y en el medio y no se observó cambio alguno con la adición de esta solución; la temperatura se mantuvo constante (20°C).

Los gránulos aerobios se adaptaron perfectamente al fenol, ya que se observó un aumento de biomasa, además de que la q_s se mantuvo (53.7 mgDQO/gSST·h). Al mismo tiempo se realizaron pruebas para determinar la concentración de fenol al inicio y al final de los ciclos de operación, y se registraron remociones del 100%.

Durante este estudio se tuvieron problemas con la aireación y fallos de energía eléctrica, lo que ocasionaba que los gránulos se desequilibraran y presentaran una estructura menos compacta.

6.2.1.1 Cinética de degradación del fenol

Se realizó una cinética de degradación del fenol dentro del reactor, una vez que se consideró que los gránulos estaban adaptados a una concentración de 100 mg/L en el medio de cultivo. Se tomaron muestras y se analizaron para determinar la concentración de fenol y la demanda química de oxígeno.

En la figura 6.8 se observa la evolución de la concentración de fenol con respecto al tiempo, así como la eliminación completa de esta sustancia (36.5 mg/L) en el reactor de granulación al cabo de 27 min. Como lo evidencia la figura, la cinética de consumo de fenol es de orden cero, debido a la alta concentración de biomasa presente en el reactor. La constante k_0 , calculada mediante regresión lineal, equivale a 1.57 mg fenol/L·min (94.2 mg fenol/L·h).

En la figura 6.9 se muestra el comportamiento de esta cinética analizando la DQO de las muestras tomadas del reactor. En esta gráfica se puede ver cómo disminuye la demanda química de oxígeno durante 30 minutos, para luego mantenerse constante. Como para el fenol, la cinética de degradación es de orden cero ($k_0 = 12.40$ mg DQO /L·min o 744 mg DQO /L·h).

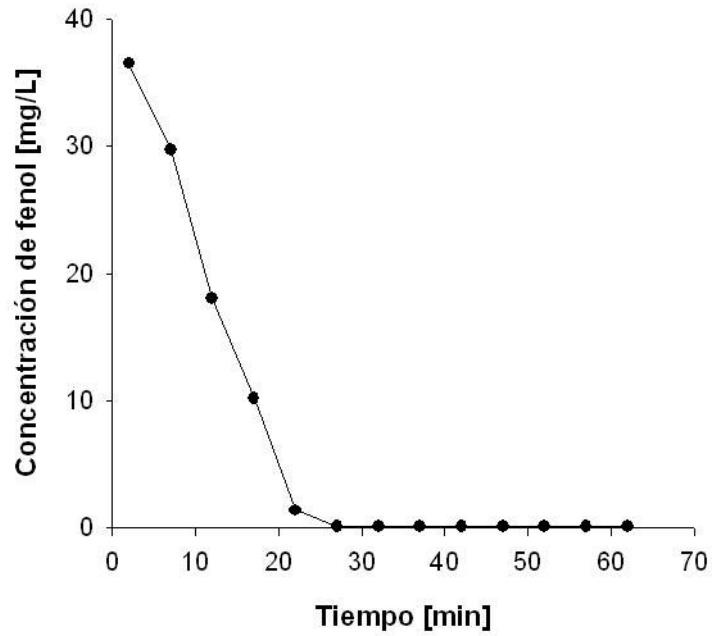


Figura 6.8. Degradación de fenol en el reactor de granulación alimentado con 100 mg/L de fenol en el medio de cultivo

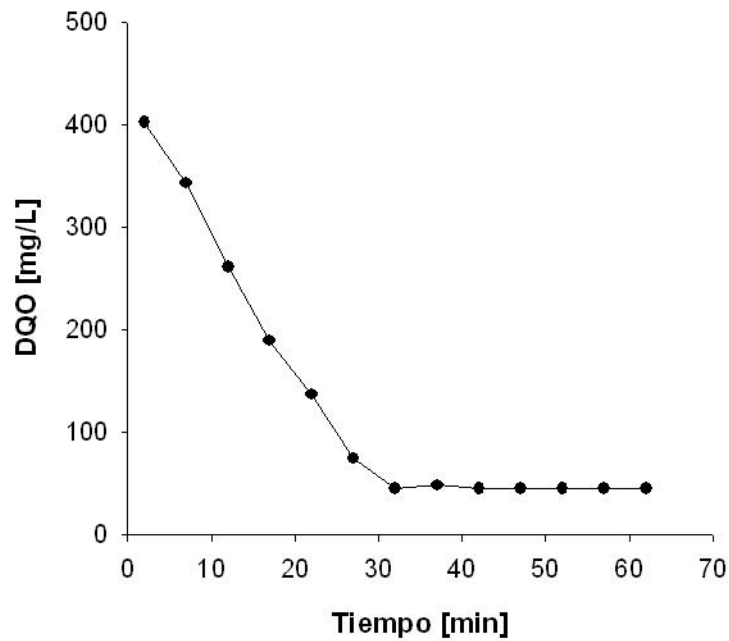


Figura 6.9. Degradación de la materia orgánica en el reactor de granulación alimentado con 100 mg/L de fenol en el medio de cultivo

Se realizó una cinética similar a la anterior, pero esta vez fuera del reactor de granulación. Estos estudios se llevaron a cabo en matraces agitados, como se describe en el apartado 5.3.2. En uno de ellos se trabajó con 0.5 g y con 1 g de biomasa en el segundo matraz. Ambos matraces se mantuvieron bajo agitación constante (120 rpm) y una temperatura de 25°C en un baño de agua. Cabe mencionar que al medio se le añadió etanol, por lo que éste fungió también como fuente de energía para los gránulos.

En la figura 6.10 puede observarse la cinética de degradación de fenol con 0.5 g de biomasa. Ahí se observa que al inicio la degradación es muy lenta, presumiblemente debido a que al mismo tiempo los gránulos consumen el etanol. De hecho, los microorganismos tienen una mayor afinidad por el etanol que por el fenol. Una vez consumido éste, la degradación de fenol se acelera hasta eliminarlo por completo del medio.

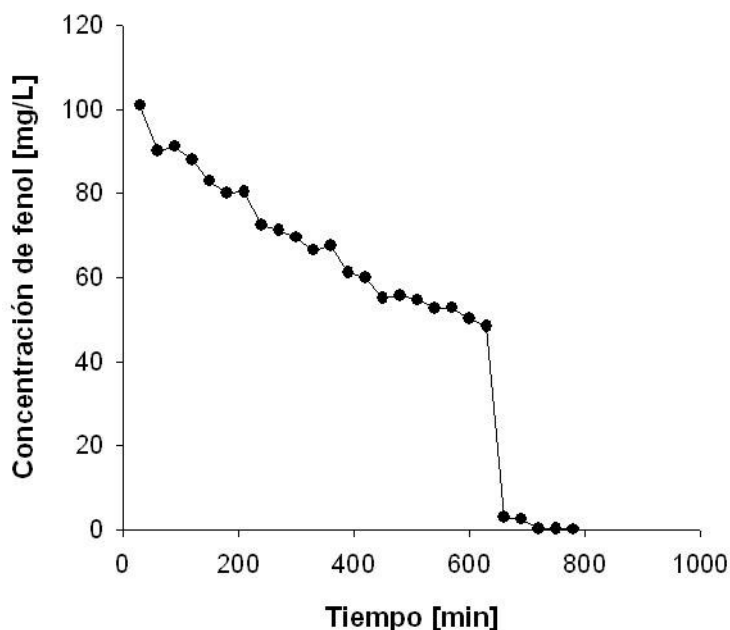


Figura 6.10. Degradación de fenol con 0.5 g de biomasa en matraz agitado y en presencia de etanol

La cinética de degradación del fenol con 1 g de biomasa y en presencia de etanol (Figura 6.11) fue similar a la anterior, ya que al principio es lenta y después se acelera hasta la eliminación total de la molécula de estudio. Contra lo que pudiera esperarse, en ambos

casos la degradación del fenol necesitó casi el mismo tiempo para llevarse a cabo (12 y 11 h para los cultivos inoculados con 0.5 y 1 g de biomasa, respectivamente).

El estudio de la cinética de degradación mostró que, en una primera etapa, los gránulos degradan simultáneamente el etanol y una fracción del fenol. Una vez que el primero se agota, el fenol es rápidamente degradado. Este comportamiento poliáuxico muy posiblemente tiene lugar también dentro del reactor de granulación, pero la mayor cantidad de biomasa que ahí se encuentra ocasiona que sean menos marcadas estas dos etapas cuando se sigue la concentración de DQO.

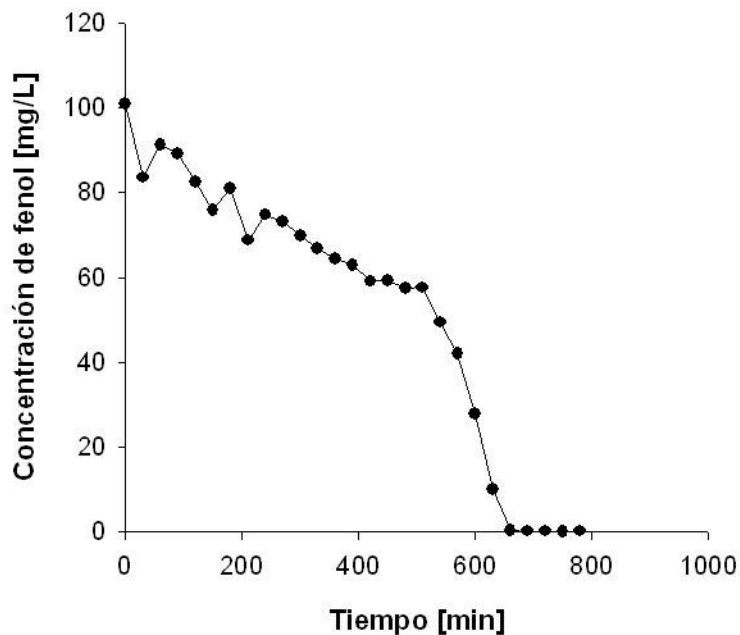


Figura 6.11. Degradación de fenol con 1 g de biomasa en matraz agitado y en presencia de etanol

Después de estos experimentos, se realizaron cinéticas de degradación a diferentes concentraciones iniciales de fenol en matraces agitados (§ 5.3.2), utilizando para ello cantidades equivalentes de gránulos aclimatados a 100 mg/L de fenol en el medio de cultivo. A diferencia de los experimentos presentados en el apartado anterior, no se añadió etanol al medio de cultivo, por lo que el fenol fue la única fuente de carbono disponible para los microorganismos. Esta cinética se realizó en matraces agitados en un baño de agua a 120 rpm y a una temperatura de 25°C. Cada uno de los matraces contenía 400 mL de agua residual sintética desprovista de etanol y éstos fueron

inoculados con cantidades iguales de biomasa (2 g). Las concentraciones iniciales empleadas fueron las siguientes: 40, 84, 209, 281, 375, 433, 723, 821, 1013 y 1112 mg/L de fenol. Para mayor claridad, las cinéticas obtenidas se presentan en tres figuras (6.12, 6.13 y 6.14).

En la figura 6.12 se muestran las cinéticas efectuadas a menores concentraciones iniciales de fenol. De modo análogo a lo que sucede en el reactor, en estos matraces la cantidad de biomasa es elevada en relación a la cantidad de sustrato, por lo que las cinéticas de degradación pueden considerarse de orden cero. Las constantes, calculadas por regresión lineal, equivalen a 39.81, 43.87, 51.11 y 49.55 mg fenol/L·h para las concentraciones iniciales de fenol de 40, 84, 209 y 281 mg/L, respectivamente.

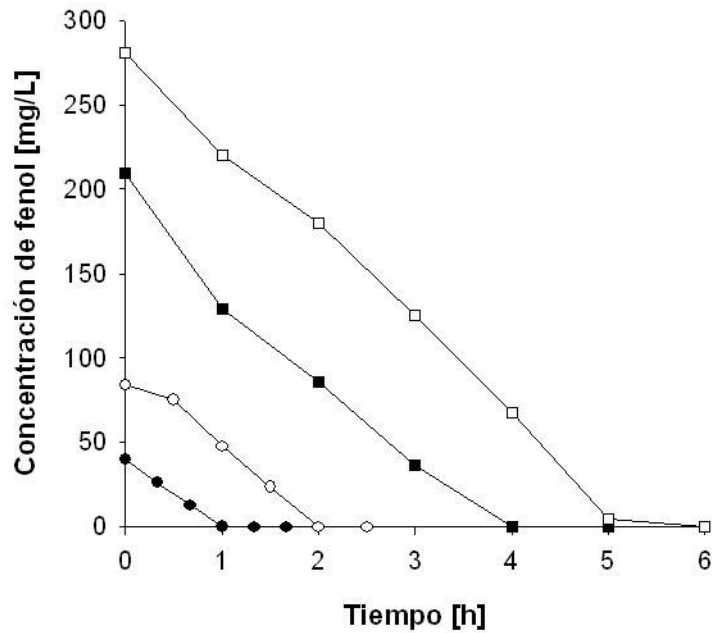


Figura 6.12. Degradación de fenol en matraces agitados con concentraciones iniciales de (●) 40, (○) 84, (■) 209 y (□) 281 mg/L de fenol

Las constantes de orden cero muestran que, para las concentraciones comprendidas entre 40 y 209 mg/L, las velocidades de biodegradación se incrementan directamente en función de la concentración de fenol, lo que pone en evidencia la ausencia de inhibición por esta molécula. Sin embargo, la biodegradación a una concentración inicial de fenol de 281 mg/L se lleva a cabo a una menor velocidad, lo que indica ya una cierta inhibición debida a dicha concentración.

Así mismo, al final del cultivo a una concentración inicial de 281 mg/L de fenol, se aprecia también una cierta inhibición de la biodegradación. Ésta es causada posiblemente por la acumulación de metabolitos intermediarios, en particular el semialdehído 2-hidroximucónico (2-hmas; § 2.3) cuya presencia se ha relacionado con la aparición de un color amarillento en el medio de cultivo. Wang y Loh (1999) mencionan que la producción de este metabolito intermediario está en función de la concentración inicial de fenol, y puede esperarse que su concentración alcance un máximo cuando el fenol se agote. Este metabolito ha sido considerado inhibitorio en el modelado de la biodegradación de fenol (Wang y Loh, 1999; Nuhoglu y Yalcin, 2005).

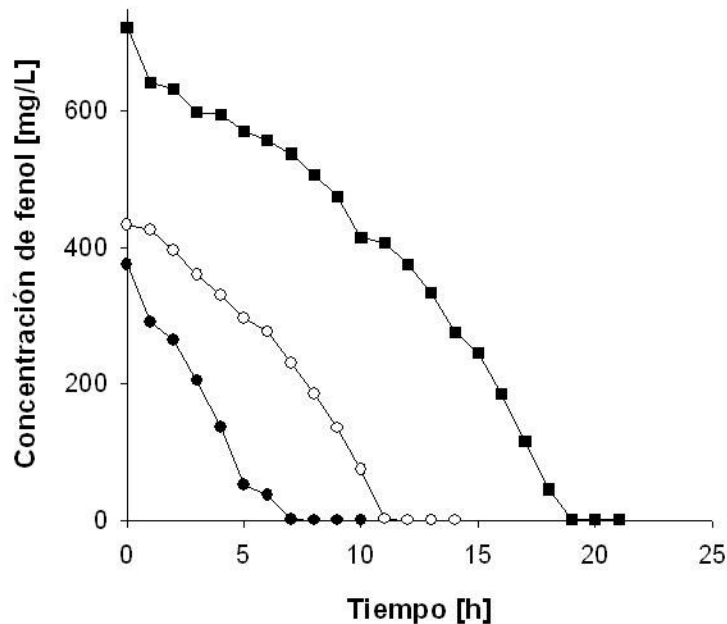


Figura 6.13. Degradación de fenol en matraces agitados con concentraciones iniciales de (●) 375, (○) 433 y (■) 723 mg/L de fenol

En la figura 6.13 y 6.14 se muestran las cinéticas correspondientes a las mayores concentraciones iniciales de fenol. Estas cinéticas ya no son de orden cero y muestran claramente el efecto de la inhibición debido al fenol. Por tal motivo, no se calcularon las constantes de orden cero. La inhibición por el fenol, sin embargo, no conllevó a la aparición de fases de latencia, ni impidió que la biodegradación tuviera lugar. Además, en todas las cinéticas se registraron remociones totales de fenol, aún cuando se emplearon concentraciones de fenol muy superiores a la utilizada durante el proceso de aclimatación.

Lo anterior es evidencia de la alta resistencia de los gránulos hacia moléculas tóxicas como el fenol.

Para estas concentraciones iniciales de fenol (375-1112 mg/L), también puede constatarse la inhibición de la biodegradación al final del cultivo, la cual, como ya se comentó anteriormente, puede deberse a la acumulación de metabolitos intermedarios.

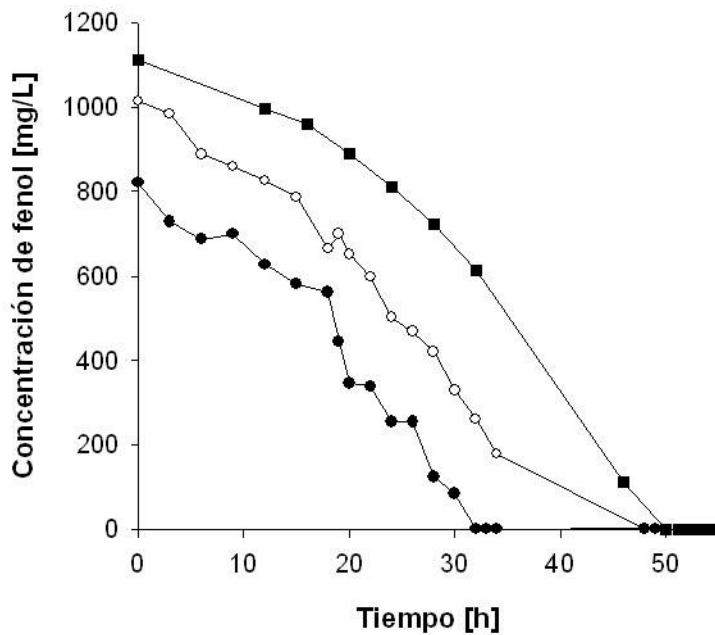


Figura 6.14. Degradación de fenol en matraces agitados con concentraciones iniciales de (●) 821, (○) 1013 y (■) 1112 mg/L de fenol

6.2.2 Aclimatación a 200 mg fenol/L

Los gránulos se aclimataron durante 13 días a una concentración de 200 mg/L en el medio de cultivo. En este periodo, se observó un aumento de biomasa considerable. Los gránulos se mantuvieron densos y compactos, lo cual se atribuyó a que el suministro de aire fue regular y suficiente. Además, se formaron nuevos gránulos en la superficie del reactor, más pequeños que los primeros que se obtuvieron y que presentaban una coloración amarillenta.

6.2.2.1 Cinética de degradación del fenol a 150 mg/L

Para estudiar la cinética de degradación de fenol se tuvo que modificar y enriquecer nuevamente el medio de cultivo, tal como se describe en el apartado 5.2.1. La cinética de degradación se estudió únicamente dentro del reactor de granulación, mediante la toma de muestras y la determinación de la concentración de fenol y de DQO durante el ciclo de trabajo. Para esta cinética, el medio de cultivo contenía 300 mg/L de fenol.

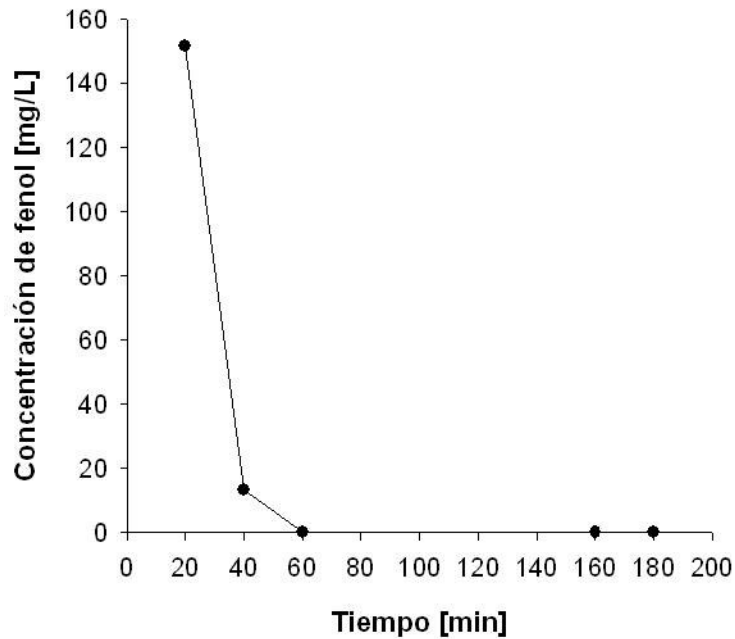


Figura 6.15. Degradación de fenol en el reactor de granulación alimentado con 300 mg/L de fenol en el medio de cultivo

La concentración de fenol inicialmente presente (151.7 mg/L) se agotó en el reactor luego de los primeros 60 minutos del ciclo. Debido a las concentraciones de biomasa y de fenol dentro del reactor, la degradación siguió una cinética de orden cero, que puede caracterizarse por una k_0 de 3.79 mg fenol/L·min o 227.28 mg fenol/L·h.

6.2.2.2 Cinética de degradación del fenol a 200 mg/L

El reactor de granulación, en este periodo, siguió trabajando con 200 mg/L de fenol en el medio de granulación y se observó crecimiento de biomasa que no alcanzó a sedimentar en el tiempo programado, lo que ocasionó que se perdiera biomasa en el periodo de extracción. El ciclo de trabajo del sistema es de 3 h. Se registraron problemas debido a la falta ocasional de energía eléctrica y a fallas en el sistema de aireación, la cual no fue del todo continua.

Una vez que se observó cierta estabilidad en el proceso, se decidió estudiar la cinética de degradación del fenol con una concentración de 400 mg/L en el agua residual sintética. Debido a la alta concentración de esta sustancia, nuevamente se modificó y enriqueció el medio de cultivo (§ 5.2.1).

El seguimiento de la biodegradación dentro del reactor mostró que la concentración inicial de fenol presente (194.8 mg/L) se agotó en el reactor luego de los primeros 25 minutos del ciclo.

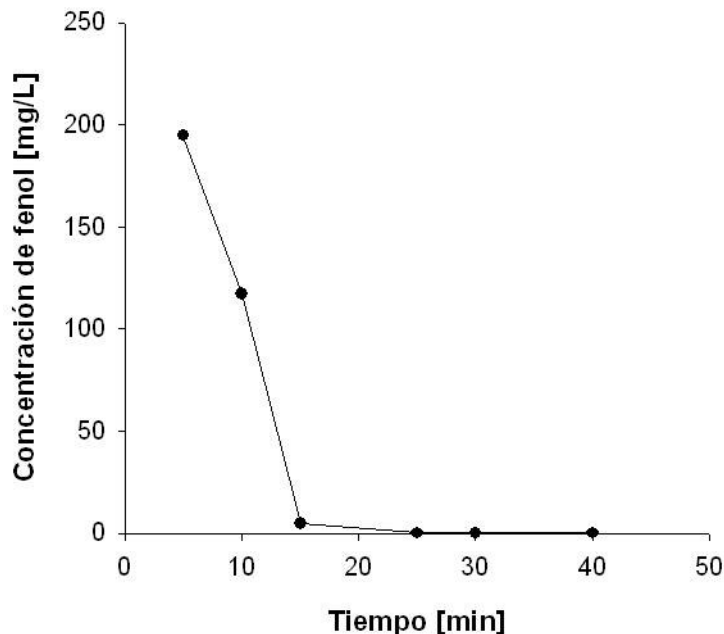


Figura 6.16. Degradación de fenol en el reactor de granulación alimentado con 400 mg/L de fenol en el medio de cultivo

Como se observó previamente, el consumo de fenol siguió una cinética de orden cero ($k_0 = 18.99 \text{ mg fenol/L}\cdot\text{min}$ o $1139.7 \text{ mg fenol/L}\cdot\text{h}$). También en este caso, esto se debe a la reducida concentración de fenol, por una parte, y a la elevada concentración de biomasa, por otra. En estas condiciones se reproducen las tendencias representadas en la figura 6.12, caracterizadas cada una de ellas por velocidades de degradación constantes. Estas velocidades aumentaron (de 94.2 a $1139.7 \text{ mg fenol/L}\cdot\text{h}$) cuando la concentración inicial de fenol se incrementó de 36.5 a 194.8 mg/L dentro del reactor. Para Shishido y Toda (1996) este tipo de cinética representa adecuadamente lo que sucede a bajas concentraciones de fenol, en particular con respecto a cinéticas caracterizadas por fenómenos de inhibición. La inhibición de la biodegradación de fenol se presentará sólo a concentraciones elevadas de esta molécula, que, en principio, podemos estimar superiores a 209 mg/L .

6.3 MODELADO DE LA INHIBICIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE FENOL

El modelado es una poderosa herramienta que permite describir los procesos biológicos, predecir cómo los afectan las variables consideradas, así como optimizar su eficiencia. La ecuación de Haldane, la cual representa la relación entre la tasa de crecimiento y la concentración de un sustrato inhibitorio, ha sido usada frecuentemente para describir la biodegradación de este tipo de sustratos.

En el caso del fenol, que es un sustrato inhibitorio, su cinética de degradación ha sido modelada principalmente mediante la expresión de Haldane, aunque existen algunas aplicaciones de la ecuación de Monod (Reardon *et al.*, 2000). La expresión de Haldane ha sido utilizada para modelar la velocidad de degradación de fenol en cultivos de *Pseudomonas putida* (Kumar *et al.*, 2004), *Ralstonia eutropha* (Léonard *et al.*, 1999) y lodos activados (Nuhoglu y Yalcin, 2005).

Como mostraron los resultados en la sección precedente, la inhibición de la biodegradación ocurrirá a altas concentraciones de fenol. Para el presente trabajo, es interesante considerar el modelo de Haldane, más que el de orden cero evidenciado por los experimentos dentro del reactor de granulación.

Por tal motivo, se emplearon los experimentos en matraces agitados para el modelado de la biodegradación a concentraciones inhibitorias de fenol. Estos resultados se obtuvieron con los gránulos aclimatados a una concentración de 100 mg/L en el medio de cultivo, y se presentaron en la sección 6.2.1.1.

Para cada concentración se calculó la velocidad inicial de degradación, r_s . Considerando la cantidad de biomasa empleada, se obtuvieron los valores de las velocidades específicas de biodegradación, q_s . Se observó que la relación entre q_s y la concentración de fenol, S , sigue una cinética de tipo Haldane-Andrews, por lo que los datos se ajustaron a un modelo con la forma siguiente (Melin *et al.*, 1998):

$$q_s = q_s \max \frac{S}{S + K_s + \frac{S^n}{K_i}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde $q_s \max$ es la velocidad específica máxima de degradación; K_s es la constante de Monod; K_i y n son constantes de Haldane. Los valores encontrados mediante un método de búsqueda directa son: $q_s \max = 29.7 \text{ mg/gSST}\cdot\text{h}$, $K_s = 77.55 \text{ mg/L}$, $K_i = 738.61 \text{ mg/L}$ y $n = 2.276$. Tanto K_s como K_i se encuentran en el rango de valores comúnmente reportados en la bibliografía para cultivos de lodos activados (Vázquez-Rodríguez *et al.*, 2006). Se obtuvo un buen ajuste de los datos al modelo propuesto, como se observa en la figura 6.17. El coeficiente de correlación (r^2) de Pearson es 0.982.

Tay *et al.* (2004) ajustaron el siguiente modelo cinético de inhibición a la degradación de fenol por gránulos aerobios, para el cual se obtuvieron los siguientes parámetros: $V_{\max} = 5.6 \text{ g}\cdot\text{fenol/gSSV}\cdot\text{d}$, $K_s = 481 \text{ mg/L}$ y $K_i = 212 \text{ mg/L}$.

$$V = V_{\max} \frac{S}{S + K_s + \frac{S^2}{K_i}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

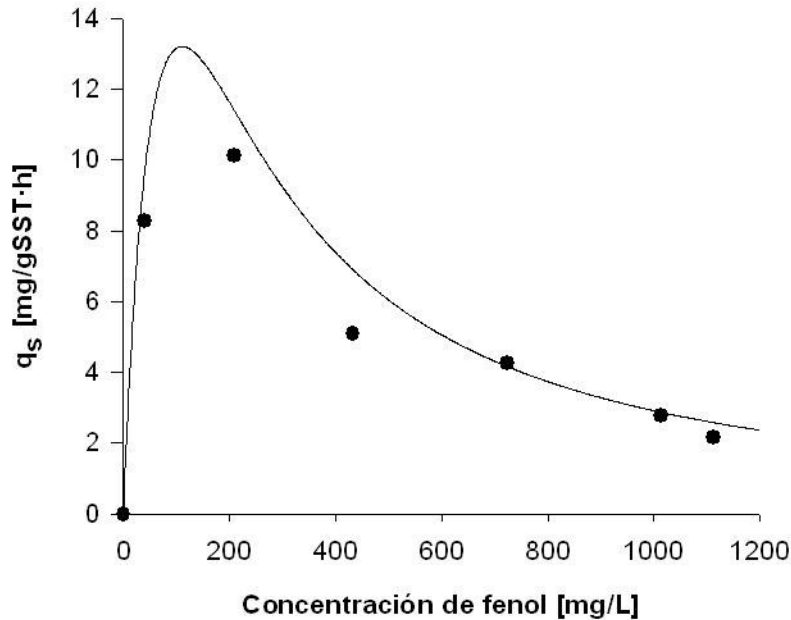


Figura 6.17. Ajuste de un modelo de Haldane a la cinética de degradación de fenol por gránulos aerobios

Puede observarse que, en lo que respecta a los gránulos cultivados durante el presente estudio, éstos pudieron contrarrestar los efectos adversos de la inhibición ejercida por el fenol. Así, la velocidad específica de degradación, q_s , se incrementó cuando la concentración de fenol pasó de 40 a 205 mg fenol/L, con un máximo calculado por el modelo de 29.7 mg fenol/g SST·h (equivalente a 0.71 g fenol/g·d).

A concentraciones mayores de fenol se constató una disminución en esta velocidad, según establece el modelo de Haldane. Sin embargo, se observa que la velocidad específica máxima de degradación es inferior a la obtenida por Tay *et al.* (2004), efecto que puede deberse a una acumulación de materia inerte en los gránulos.

El modelo propuesto describe adecuadamente la relación que existe entre la velocidad específica de degradación y la concentración de fenol. En consecuencia, se utilizó para simular la evolución de la concentración de fenol durante los cultivos discontinuos que sirvieron para calcular los parámetros cinéticos del modelo.

6.4 SIMULACIÓN DEL MODELO DE BIODEGRADACIÓN DE FENOL

El modelo propuesto en la sección precedente se simuló con ayuda de un programa elaborado por el Dr. Julio Weissman en la plataforma MATLAB. Para ello, se utilizaron los parámetros cinéticos calculados mediante un método de búsqueda directa. La simulación permitió describir la evolución de la concentración de fenol, en particular para concentraciones iniciales superiores a los 209 mg/L. Como ya se mencionó, a concentraciones inferiores a este valor los microorganismos no se encuentran inhibidos. Así, a bajas concentraciones, el modelo de Haldane es inadecuado, ya que la degradación sigue una cinética de orden cero. Las curvas de biodegradación obtenidas por simulación del modelo se muestran en la figura 6.18, así como los datos experimentales correspondientes.

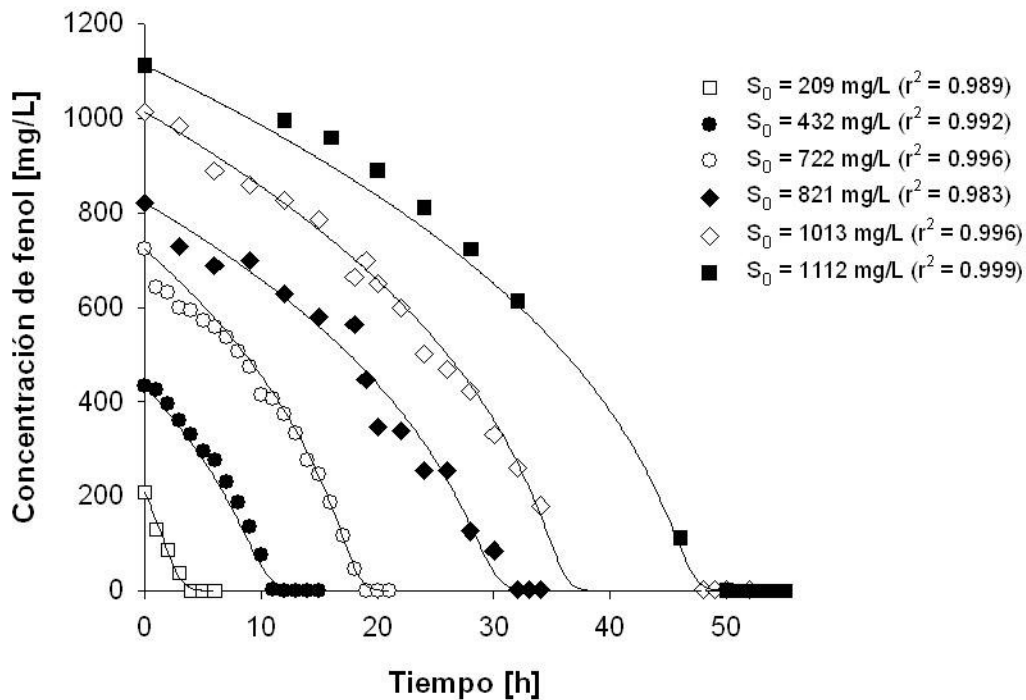


Figura 6.18. Simulación del modelo de Haldane para las concentraciones iniciales de fenol estudiadas experimentalmente

El modelo propuesto permite describir adecuadamente la cinética de biodegradación de fenol a concentraciones elevadas de esta molécula. Este modelo podría ser utilizado como herramienta de predicción y control del proceso, y en la optimización del tratamiento biológico de aguas residuales fenólicas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conforme a los objetivos planteados al inicio de esta investigación, se instrumentó y automatizó un reactor discontinuo de alimentación secuenciada para la biodegradación del fenol utilizando gránulos aerobios aclimatados. El sistema del reactor de granulación permitió controlar el funcionamiento de las distintas etapas de los ciclos de trabajo.

Se lograron formar gránulos aerobios degradadores de fenol en un SBR, para lo cual fue necesario mantener una elevada carga másica. El corto tiempo de sedimentación permitió utilizar la mayor parte del ciclo en la degradación de la materia orgánica, al tiempo que los ciclos de operación se mantenían cortos. Inicialmente no fue posible la formación de los gránulos debido a que el flujo de aire no era suficiente afectando al proceso. Se obtuvo una buena aclimatación de los gránulos al fenol, observándose una remoción total del mismo.

Respecto a la biodegradación del fenol, se estudió la cinética de degradación de esta molécula a diferentes concentraciones iniciales, para así obtener un modelo de la inhibición ejercida por el fenol. Los resultados mostraron que los gránulos aerobios pudieron contrarrestar los efectos adversos de la inhibición ejercida por el fenol, ya que pudieron biodegradarlo a concentraciones muy superiores a la utilizada durante la aclimatación.

Se observó que el modelo de tipo Haldane-Andrews representa adecuadamente la cinética de biodegradación de fenol, ya que describe la relación que existe entre la velocidad específica de degradación y la concentración de fenol. Dicho modelo podría en consecuencia ser utilizado como herramienta de predicción y control automático del proceso, y en la optimización del tratamiento biológico de aguas residuales fenólicas.

Una de las perspectivas que se desprende del presente trabajo es el estudio de la inhibición que también produce en los microorganismos la acumulación de metabolitos intermediarios (*i.e.*, el semialdehído 2-hidroximucónico). Así mismo, parece de gran interés aclimatar los gránulos a concentraciones mayores de fenol, para así aumentar la capacidad de tratamiento de sistema. Por otra parte, deberán conducirse estudios posteriores que validen el modelo cinético propuesto en esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allsop PJ, Christi Y, Moo-Young M y Sullivan GR (1993) Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 572-580.
- APHA (1989) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17^a Edición. American Public Health Association, Washington D.C.
- Arrojo B, Mosquera-Corral A, Garrido JM y Méndez R (2004) Aerobic granulation with industrial wastewater in sequencing batch reactors. *Water Res.* 38: 3389-99.
- Barnard JL, Stevens GM y Grady PL (1985) Design strategies for nutrient removal plants. *Water Sci Technol.* 17: 233-242.
- Beun JJ, Hendricks A, van Loosdrecht MCM, Morgenroth E, Wilderer PA y Heijnen JJ (1999) Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research* 33(10): 2283-2290.
- Bitton G (1999) Wastewater microbiology, Wiley-Liss, Nueva York.
- Bossier P y Verstraete W (1996) Triggers for microbial aggregation in activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 1-6.
- Bryers JD (2000) Biofilms: an introduction. En: Biofilms II Process Analysis and Applications (Bryers JD, ed.). Wiley-Liss, Nueva York.
- Bugg DHT y Winfield JC (1998) Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports.* p. 513.
- Characklis WG (1990) Biofilm processes. En: Biofilms (Characklis WG, Marshall KC. eds.). Wiley, Nueva York.
- Chudoba J (1985) Control and activated sludge filamentous bulking. *Water Res.* 19: 1017.

- Costerton JW, Irvin RT y Cheng KJ (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev. Microbiol.* 35: 299-324.
- Dangcong P, Bernet N, Delgenes JP y Moletta R (1998) Aerobic granular sludge. *Water Res.* 33(3): 890-93.
- Debus O, Baumgärtl H y Sekulov I (1994) Influence of fluid velocities on the degradation of volatile aromatic compounds in membrane-bound biofilms. *Water Sci. Technol.* 29(10-11): 253-262.
- Fava F, Armenante PM, Kafkewitz D y Marchetti L (1995) Influence of organic and inorganic growth supplements on the aerobic biodegradation of chlorobenzoic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 171-177.
- Fritsche W y Hofrichter M (1999) Aerobic degradation by microorganisms. En: Biotechnology – Vol. 11b: Environmental Processes (Rehm H-J y Reed G, eds). Wiley-VCH, Weinheim, Nueva York, pp. 145-156.
- Harremoës P y Henze M (1995) Biofilters. En: Wastewater Treatment (Henze M, Harremoës P, Jansen JC y Arvin E, eds.). Springer, Berlín, pp. 143-192.
- Harrison RM (1996) Pollution. Causes, Effects and Control, 3a. Edición. The Royal Society of Chemistry, Londres, p. 66.
- Heesche-Wagner K, Schwarz T y Kaufmann M (1999) Phenol degradation by an enterobacterium: a *Klebsiella* strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase. *Can. J. Microbiol.* 45(2): 162–171.
- Heijnen JJ, Mulder A, Enger W y Hoeks F (1989) Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in wastewater treatment. *Chem. Eng. J.* 41: B37-B50.
- Hill GA y Robinson CW (1975) Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 1599–1615.

- Jang A, Yoon Y, Kim I, Kim KS y Bishop PL (2003) Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor. *J. Biotechnol.* 105: 71-82.
- Jiang HL, Tay JH y Tay STL (2002) Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 439-445.
- Jiang HL, Tay JH, Liu Y y Tay STL (2003) Ca²⁺ augmentation for enhancement of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors. *Biotechnol. Lett.* 63: 95-99.
- Jiang HL, Tay JH y Tay STL (2004) Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 602-608.
- Jiménez BE (2002) Procesos biológicos. En: La contaminación ambiental en México. Causas, efectos y Tecnología Apropriada. Editorial Limusa, México, pp. 256-282.
- Komarkova E, Paca J, Klapkova E, Stiborova M, Soccol CR y Sobotka M (2003) Physiological changes of *Candida tropicalis* population degrading phenol in fed batch reactor. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46(4): 537-543.
- Kumar A, Kumar s y Kumar S (2005) Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biocehm. Eng.* 22: 151-159.
- Léonard D, Ben Youssef C, Destruhaut C, Lindley ND y Queinnec I (1999) Phenol degradation by *Ralstonia eutropha*: colorimetric determination of 2-hydroxymuconate semialdehyde accumulation to control feed strategy in fed-batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 65(4): 407-415.
- Lettinga G, van Velsen AFM, Homba SW, de Zeeuw W y Klapwijk A (1980) Use of the upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 699-734.

- Lin YM, Liu Y y Tay JH (2003) Development and characteristics of phosphorus-accumulating granules in sequencing batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 430-435.
- Liu Y y Tay JH (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* 36: 1653-1665.
- Liu Y, Yang SF, Tan SF, Lin YM y Tay JH (2002) Aerobic granules: a novel zinc biosorbent. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 548-551.
- Liu QS, Tay JH y Liu Y (2003a) Substrate concentration-independent aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *Environ. Technol.* 24: 1235-1243.
- Liu Y, Lin YM, Yang SF y Tay JH (2003b) A balanced model for biofilms developed at different growth and detachment forces. *Process Biochem.* 38: 1762-1765.
- Liu Y, Yang SF, Xu H, Woon KH, Lin YM y Tay JH (2003c) Biosorption kinetics of cadmium (II) on aerobic granular sludge. *Process Biochem.* 38: 995-999.
- Liu Y, Yang SF y Tay JH (2003d) Elemental compositions and characteristics of aerobic granules cultivated at different substrate N/C ratios. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:556-61.
- Liu Y y Tay JH (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* 22: 533-563.
- Liu YQ, Liu Y y Tay JH (2005) Relationship between size and mass transfer resistance in aerobic granules. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 312-315.
- Lodi A, Solisoio C, Converti A y Del Borghi M (1998) Cadmium, zinc, copper, silver and chromium (III) removal from wastewaters by *Sphaerotilus natans*. *Bioprocess Eng.* 19: 197-203.

- McSwain BS, Irvine RI y Wilderer PA (2003) The effect of intermittent feeding on aerobic granule structure. *5th International Conference on biofilm Systems by International Water Association*. Ciudad del Cabo, África del Sur.
- Melin ES, Puhakka JA y Ferguson JF (1998) Enrichment and operation strategies for polychlorophenol degrading microbial cultures in an aerobic fluidized-bed reactor. *Water Environ. Res.* 70(2): 171-180.
- Meyer RL, Saunders AM, Zeng RJ, Keller J y Blackall LL (2003) Microscale structure and function of anaerobic-aerobic granules containing glycogen accumulating organisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 253-61.
- Morgenroth E, Sherden T, Van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ y Wilderer PA (1997) Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Res.* 31(12): 3191-94.
- Mörsen A y Rehm H-J (1990) Degradation of phenol by a defined mixed culture immobilized by adsorption on activated carbon and sintered glass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 206–212.
- Morvai L, Mihaltz P y Czako L (1992) The kinetics basis of a new start-up method to ensure the rapid granulation of anaerobic sludge. *Water Sci. Technol.* 25: 113-22.
- Moy BYP, Tay JH, Toh SK, Liu Y y Tay STL (2002) High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 407-12.
- Nicolella C, van Loosdrecht MCM y Heijnen. JJ (2000) Wastewater treatment with particulate biofilms reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 80: 1-33.
- Nuhoglu A y Yalcin B (2005) Modelling of phenol removal in a batch reactor. *Process Biochem.* 40: 1233–1239.
- Paller G, Hommel RK y Kleber H-P (1995) Phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250. *J. Basic Microbiol.* 35: 325-335.

Peng D, Bernet N, Delgenes JP y Moletta R (1999) Aerobic granular sludge-a case report. *Water Res.* 33:890-3.

Qin L, Tay JH y Liu Y (2004) Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Process Biochem.* 39: 579-84.

Quarmby J y Forster CF (1995) An examination of the structure of UASB granules. *Water Res.* 29: 2449-54.

Ramírez-Cerón IL (2005) Biodegradación de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo de alimentación secuenciada. *Tesis de Maestría*, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Reardon KF, Mosteller DC y Bull Rogers JD (2000) Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 385-400.

Sawyer CN, McCarty PL y Parkin GF (2001) Química para ingeniería ambiental, 4ª edición. Mc Graw Hill, México, p. 248.

Schwarzenbach RP, Gschwend PM e Imboden DM (2003) Environmental organic chemistry, 2ª edición. Wiley-Interscience, p. 1204.

Schwarzenbeck N, Erley R y Wilderer PA (2003) Growth of aerobic granular sludge in a SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. *5th International conference on biofilm systems*, 14-19 September, Cape Town, South Africa.

Semple KT y Cain RB (1996) Biodegradation of phenols by the algae *Ochromonas danica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4): 1265–1273.

Shalaby M (2003) Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4. Tesis doctoral, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Alemania. Disponible en:

<http://opus.tu-bs.de/opus/volltexte/2003/431/pdf/Dissertation.pdf>

- Shin HS, Lim KH y Park HS (1992) Effect of shear stress on granulation in oxygen aerobic upflow sludge reactors. *Water Sci. Technol.* 26: 601-5.
- Shishido M y Toda M (1996) Apparent zero-order kinetics of phenol biodegradation by substrate-inhibited microbes at low substrate concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 50: 709-717.
- Solomons TW y Graham (2000) Química orgánica, 2ª edición. Editorial Limusa, México, pp. 1121-1129.
- Straube G (1987) Phenol hydroxylase from *Rhodococcus* sp. P1. *J. Basic Microbiol.* 27: 229-232.
- Taniguchi J, Hemmi H, Tanahashi K, Amano N, Nakayama T y Nishim T (2000) Zinc biosorption by a zinc-resistant bacterium, *Brevibacterium* sp. Strain, HZM-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 581-8.
- Tay JH, Liu QS y Liu Y (2001a) Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic aerobic sludge blanket reactor. *J. Appl. Microbiol.* 91:168-75.
- Tay JH, Liu QS y Liu Y (2001b) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Appl. Microbiol.* 33: 222-6.
- Tay JH, Liu QS y Liu Y (2002a) Aerobic granulation in sequential sludge blanket reactor. *Water Sci. Technol.* 36: 13-8.
- Tay JH, Yang SF y Liu Y (2002b) Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 332-7.
- Tay JH, Liu QS y Liu Y (2002c) Characteristics of aerobic granules grown on glucosa and acetate in sequential aerobic sludge blanket reactors. *Environ. Technol.* 23: 931-6.

- Tay JH, Ivanov V, Pan S y Tay STL (2002d) Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 254-7.
- Tay STL, Ivanov V, Yi S, Zhuang WQ y Tay JH (2002e) Presence of anaerobic *Bacteroides* in aerobically grown microbial granules. *Microbiol. Ecol.* 44: 278-85.
- Tay JH, Tay STL, Ivanov V, Pan S y Liu QS (2003) Biomass and porosity profiles in microbial granules used for aerobic wastewater treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 297-301.
- Tay JH, Pan S, He YX y Tay STL (2004) Effect of organic loading rate on aerobic granulation: Part II. Characteristics of aerobic granules. *J. Environ. Eng.* 130(10):1102-1109.
- Tay STL, Moy BYP, Jiang HL y Tay JH (2005) Rapid cultivation of stable aerobic phenol-degrading granules using acetate-fed granules as microbial seed. *J. Biotechnol.* 115: 387-395.
- Toh SK, Tay JH, Moy BYP, Ivanov V y Tay STL (2003) Size-effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 687-95.
- Tsuneda S, Nagano T, Hoshino T, Ejiri Y, Noda N e Hirata A (2003) Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor. *Water Res.* 37: 4965-73.
- Turk J, Turk A y Wittes JT (1973). Contaminación del agua. En: Ecología, contaminación, medio ambiente. Editorial Interamericana, México, pp. 115-133.
- Valdman E y Leite SGF (2000) Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Saragssum sp.* waste biomass. *Process Eng.* 22:171-173.

- Vázquez-Rodríguez G, Ben Youssef C y Weissman-Vilanova J (2006) Two-step modeling of the biodegradation of phenol by an acclimated activated sludge. *Chem. Eng. J.* 117: 245-252.
- Wang SJ y Loh KC (1999) Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 177-184.
- Watanabe K, Hino S y Takahashi N (1996) Responses of activated sludge to an increase in phenol loading. *J. Fermentation Bioeng.* 82(5): 522-524.
- Watnick P y Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182: 2675-2579.
- Wimpenny JWT y Colasanti R (1997) A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 1-16.
- Wobus A, Ulrich S y Röske I (1996) Degradation of chlorophenols by biofilms on semipermeable membranes in two types of fixed bed reactors. *Water Sci. Technol.* 32(8): 205-212.
- Woolard CR e Irvine RL (1995) Treatment of hypersaline wastewater in the SBR. *Water Res.* 29(4): 1159-68.
- Wright PC y Raper JA (1996) A review of some parameters involved in fluidized bed bioreactors. *Chem. Eng. Technol.* 19: 50-64.
- Yang SF, Liu Y, y Tay JH (2003) A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater. *J. Biotechnol.* 106: 77-86.
- Yang SF, Liu QS, Tay JH y Liu Y (2004a) Growth kinetics of aerobic granules developed in sequencing batch reactors. *Let.t Appl. Microbiol.* 38: 106-112.
- Yang SF, Tay JH y Liu Y (2004b) Inhibition of free ammonia to the formation of aerobic granules. *Biochem. Eng. J.* 17: 41-48.

Yang SF, Tay JH y Liu Y (2005) Effect of substrate N/COD ratio on the formation of aerobic granules. *J Environ. Eng.* 131(1): 86-92.

Yi S, Tay JH, Maszenan AM y Tay STL (2003) A culture independent approach for studying microbial diversity in aerobic granules. *Water Sci. Technol.* 47: 283-290.

Zheng YM, Zhao QB y Yu HQ (2005) Adsorption of a cationic dye onto aerobic granules. *Process Biochem.* 40: 3777–3782.