

# **TRABAJO DE GRADO DE MAESTRÍA**

## **BIODEGRADACIÓN DE FENOL EMPLEANDO MICROORGANISMOS INMOVILIZADOS**

Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de  
Venezuela para optar al Título  
de Magíster en Ingeniería Sanitaria  
Opción Calidad del Agua  
Por la Ingeniero Acuña Dutra, Silvia Yudith

Caracas, Agosto 2005

# **TRABAJO DE GRADO DE MAESTRÍA**

## **BIODEGRADACIÓN DE FENOL EMPLEANDO MICROORGANISMOS INMOVILIZADOS**

TUTORES: Dr. Livio Revel-Chion  
Prof. Rebeca Sánchez

Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de  
Venezuela para optar al Título  
de Magíster en Ingeniería Sanitaria  
Opción Calidad del Agua  
Por la Ingeniero Acuña Dutra, Silvia Yudith

Caracas, Agosto 2005

## *Agradecimientos*

*Todo el fruto de este arduo trabajo no hubiera sido posible si no contara con la colaboración del Dr. Livio Revel-Chion, la prof. Laura Varela, la prof. Rebeca Sánchez y la Universidad Metropolitana; quienes me apoyaron en todo momento y les agradezco muchísimo su voto de confianza en mi persona.*

*A mi familia quienes en todo momento estuvieron allí para celebrar conmigo mis triunfos y ayudarme a sobrellevar mis fracasos...*

*A José Manuel, quien más que una pareja es el mejor amigo que tengo y el perfecto compañero de tesis... Sabes que sin ti esto no hubiera podido salir a delante...*

*Gracias a todos por estar siempre allí ....*

*Silvia*

## BIODEGRADACIÓN DE FENOL EMPLEANDO MICROORGANISMOS INMOVILIZADOS

**Resumen.** La biotecnología es una herramienta muy útil y ampliamente utilizada en el sector industrial. En el ambiente dinámico y cambiante de hoy en día es necesario limitar las emisiones de contaminantes, en especial aquellos, que como el fenol, representan un altísimo riesgo para todos los seres vivos. Esta investigación estudió la oportunidad de emplear microorganismos específicos para la biodegradación de fenol. Para este estudio se utilizó una solución en la cual además de una serie de sales minerales, se incluyó el fenol como única fuente de carbono, a diferentes concentraciones a nivel de frascos de 250 mL. Se evaluaron dos cepas bacterianas autóctonas *Acinetobacter sp.* y *Stenotrophomonas maltophilia.*; se encontró que a este nivel la segunda de ellas podía degradar con mayor velocidad el fenol y en consecuencia se utilizó en el resto de la experimentación.

Se caracterizó su cultivo por carga, obteniéndose como constantes cinéticas los siguientes valores:  $\mu_m = 0,2318 \text{ h}^{-1}$  y  $K_i = 829,54 \text{ mg/L}$  en un medio con concentraciones de fenol entre 324 mg/L y 733 mg/L. Se determinó la presencia de un efecto inhibitorio por parte del sustrato a partir de 733 mg/L. Posteriormente, y utilizando nylon 6 como soporte, se inmovilizó sobre partículas cilíndricas de 2,68 mm de diámetro y 2,76 mm de altura. El biocatalizador obtenido demostró que podía degradar el fenol con mayor eficiencia que el cultivo suspendido del mismo microorganismo.

Para llevar a cabo esta etapa se trataron las partículas de nylon con HCl 3M durante 12 h a 30 °C y 200 rpm de agitación orbital, una vez lavado con agua destilada se trató con una solución de glutaraldehído al 12% v/v diluido en buffer de borato pH = 9 y a lo largo de un tiempo de contacto de 1 hora a 54 °C. Posteriormente, se adicionó la suspensión del cultivo microbiano suspendido en un

buffer de fosfato, pH = 7,0 y midieron la concentración celular antes y después del proceso con el fin de identificar la biomasa adherida.

La actividad catalítica de la preparación inmovilizada fue evaluada a lo largo de 11 días en un reactor de lecho fluidizado de tres fases, el cual constó de una sección cilíndrica constante de 1,48 m de altura por 10,16 cm de diámetro interno. Se obtuvo una remoción máxima del 21,70 %, empleando 2.000 gramos de biocatalizador con un flujo del líquido de 3,48 mL/s, una concentración inicial de fenol de 624,50 ppm y un flujo de aire de 86,29 mL/s (40 psig; 23,7 °C), Los análisis efectuados indican que el reactor presentaba un régimen de flujo tipo pistón.

**Palabras Clave:** Biodegradación, Fenol, Bioingeniería.

## **INTRODUCCIÓN**

En el mundo de hoy, la contaminación ambiental es uno de los problemas más preocupantes, en especial la relacionada con la contaminación del agua, y peor aún cuando las proyecciones de su disponibilidad futura se consideran muy precarias a nivel mundial. Considerando ese aspecto, desde hace algún tiempo, diferentes países han implementado procesos que permiten el tratamiento de las aguas residuales, según el tipo de contaminantes a ser tratado tanto a nivel doméstico e industrial, para permitir su re-utilización. Con ese objetivo, se han empleado procesos convencionales, ampliamente conocidos y desarrollos novedosos. De acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), uno de esos contaminantes, que es de prioritario control, es el fenol; ya que esta es una sustancia tóxica tanto para el hombre como para el resto de los seres vivos, cuando su concentración en el medio líquido alcanza 1 mg/L. En la actualidad existen diversas industrias que generan efluentes con un elevado contenido de fenol y entre ellas pueden mencionarse a las de: plástico, pintura, coquización, refinadoras de petróleo, desinfectantes, explosivos y resinas sintéticas.

Ahora bien, el uso de microorganismos especializados para la biodegradación de contaminantes es uno de los aspectos más estudiados y utilizado para el tratamiento de efluentes industriales de este tipo; ya que eventualmente podría constituir una alternativa con una alta eficiencia de remoción al compararse con otros tipos de tratamiento.

Las investigaciones apuntan a la generación de técnicas que permitan utilizar este tipo de tratamiento a nivel de operación unitaria para la disposición final de los contaminantes. Se busca llevar a cabo un proceso para la remoción del contaminante empleando equipos que ocupen menos espacio, requieran menos mantenimiento y sean de fácil operación, en comparación con los sistemas hasta ahora utilizados.

Considerando lo antes expuesto; esta investigación tiene como objetivo general evaluar la remoción de fenol en un reactor de tres fases utilizando un cultivo microbiano específico inmovilizado sobre nylon. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la cinética del crecimiento celular del microorganismo seleccionado.
- Obtener un biocatalizador con células inmovilizadas sobre partículas cilíndricas de nylon para tratar un efluente sintético con fenol como única fuente de carbono.
- Establecer las condiciones hidráulicas de operación a ser utilizados a nivel del reactor de tres fases para el estudio de la remoción del fenol
- Determinar la eficiencia del proceso de remoción de fenol en el efluente sintético.

Este estudio se llevó a cabo empleando un medio de cultivo sintético en el cual el fenol constituye la única fuente de carbono presente. Se determinaron las constantes cinéticas de la cepa microbiana a utilizar:  $\mu_{\text{máx}}$  (velocidad máxima de crecimiento) y  $K_i$  (constante de inhibición) a nivel de frascos en medio suspendido y en medio adherido para distintas concentraciones de sustrato. Una vez determinadas las constantes cinéticas de la cepa, se realizaron las pruebas hidráulicas del reactor de tres fases, estudiando la expansión del lecho sólido para diferentes combinaciones de flujos de líquido y gas (aire) y varios pesos de soporte; para seleccionar aquella que permitiera el mayor tiempo de residencia hidráulico del líquido en el reactor. Una vez finalizada esa etapa, se evaluó la eficiencia de remoción de fenol a las condiciones bajo operación previamente establecidas (caudal de líquido y gas, peso de soporte empleado, temperatura de operación, pH y concentración de fenol). Se determinó la concentración de fenol tanto en la entrada y salida del reactor como a diferentes puntos a lo largo de su altura, la presencia de biomasa en la salida; con el fin de establecer la eficiencia del proceso. Las limitaciones de recursos de tiempo y económicos no permitieron prolongar las experiencias a fin de verificar el tiempo necesario que requiere el biocatalizador para desactivarse.

Los resultados de esta experimentación muestran una vez más la aplicabilidad de la biotecnología al tratamiento de aguas residuales sintéticas con fenol como única fuente de carbono.

# INDICE GENERAL

Contenido	Página
Introducción .....	1
<b>CAPITULO 1: Marco Teórico</b>	
1.1.- Fenol .....	4
1.1.1.- Toxicidad del Fenol .....	5
1.1.2.- Efluentes Fenólicos .....	6
1.1.3.- Tratamientos Para Remover Fenol .....	8
1.1.3.1.- Tratamientos Físicos .....	9
1.1.3.2.- Tratamientos Químicos .....	11
1.1.3.3.- Tratamientos Biológicos .....	14
1.2.- Crecimiento Microbiano .....	18
1.3.- Biodegradación de Fenol .....	22
1.4.- Inmovilización de Microorganismos.....	24
1.4.1.- Inmovilización de Microorganismos Utilizando Nylon como Soporte.....	29
1.5.- Fluidización en un Reactor de Tres Fases.....	32
<b>CAPITULO 2: Materiales, Equipos y Métodos Utilizados</b>	
2.1.- Reactivos Utilizados .....	37
2.2.- Equipos Utilizados .....	38
2.3.- Selección, Cultivo y Caracterización del Microorganismo Empleado..	39
2.3.1.- Mantenimiento de la Cepa .....	39
2.3.2.- Selección del Medio Mineral a utilizar en Experimentos a Nivel de Frascos .....	40
2.3.3.- Constantes Cinéticas de la Cepa Microbiana Empleada Cultivo Suspendidos a Nivel de Frascos .....	41
2.3.4.- Degradación de Fenol con Microorganismos Inmovilizados en Nylon a Nivel de Frascos.....	42
2.3.5.- Determinación de pH.....	44
2.3.6.- Determinación de la Concentración Celular .....	44
2.3.7.- Determinación de la Concentración de Fenol .....	45
2.3.7.1.- Estandarización de una Solución de Fenol .....	45
2.3.7.2.- Determinación de Fenol por el Método de 4-aminoantipirina	45
2.3.7.3.- Determinación de Curva de Calibración de Fenol .....	46
2.4.- Preparación del Soporte .....	46
2.4.1.- Hidrólisis y Activación del Nylon 6 .....	46
2.5.- Inmovilización de la Biomasa .....	47
2.5.1.- Cultivo de la Biomasa a inmovilizar .....	47

2.5.2.- Inmovilización de la Biomasa en el Soporte .....	47
2.6.- Biodegradación de Fenol a través de Microorganismos Inmovilizados en un Reactor de Lecho Fluidizado de Tres Fases .....	48
2.6.1.- Estudio Hidrodinámico del Reactor .....	48
2.6.2.- Evaluación de la Remoción de Fenol en el Reactor de Tres Fases.....	50
 CAPITULO 3: Resultados Obtenidos y Discusiones	
3.1.- Selección del Microorganismo Empleado.....	53
3.2.- Selección del Medio Mineral a Utilizar en Experimentos a Nivel de Fascos .....	54
3.3.- Constantes Cinéticas de la Cepa Microbiana Empleada Cultivo Suspendido a Nivel de Fascos.....	55
3.4.- Degradación de Fenol con Microorganismos Inmovilizados en Nylon a Nivel de Fascos .....	61
3.5.- Estudio Hidrodinámico del Reactor .....	64
3.6.- Evaluación de la Remoción de Fenol en el Reactor de Tres Fases.....	65
 CAPITULO 4: Conclusiones y Recomendaciones.....	68
 BIBLIOGRAFÍA .....	71
 ANEXO 1: Identificación de la Cepa Cultivada en el Laboratorio.....	79
ANEXO 2: Fiola para Experimento con Biomasa Inmovilizada.....	80
ANEXO 3: Curva de Peso Seco para Determinar la Biomasa.....	81
ANEXO 4: Curva de Calibración para la Medición de Fenol.....	82
ANEXO 5: Reactor Utilizado para Inmovilizar la Biomasa Celular.....	83
ANEXO 6: Esquema de los Distribuidores de Flujo Estudiados .....	84
ANEXO 7: Curva de Calibración de Rotámetro de Aire.....	85
ANEXO 8: Curva de Calibración Rotámetro de Líquido .....	86
ANEXO 9: Curva de Calibración de DBO <sub>5,20</sub> .....	87
ANEXO 10: Curva de Calibración de DQO .....	88
ANEXO 11: Degradación de Fenol de las Cepas Estudiadas .....	89
ANEXO 12: Comparación del Comportamiento de la Cepa en los Medios SW y MSM.....	90
ANEXO 13: Estudio de la Degradación de Fenol a Nivel de Fascos de la Cepa en Cultivos Sumergidos.....	91
ANEXO 14: Estudio de la Degradación de Fenol a Nivel de Fascos para La Cepa Inmovilizada.....	93
ANEXO 15: Datos Físicos del Nylon .....	94
ANEXO 16: Resultados del Estudio Hidrodinámico del Reactor de Tres Fases.....	95
ANEXO 17: Datos de Remoción de Fenol en el Reactor de Tres Fases .....	97

## INDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1: Degradación Anaeróbica del Fenol .....	16
Figura 2: Representación Gráfica de un Sustrato Inhibitorio.....	20
Figura 3: Degradación Aeróbica del Fenol .....	21
Figura 4: Hidrólisis del Nylon.....	30
Figura 5: Activación del Nylon.....	32
Figura 6: Reactor de 3 Fases .....	32
Figura 7: Esquema General de las Etapas de Experimentación .....	36
Figura 8: Esquema de Tratamiento del Cultivo Suspendido.....	41
Figura 9: Esquema de Tratamiento de la Biomasa Inmovilizada.....	43
Figura 10: Curva de Peso Seco para Determinar Biomasa .....	81
Figura 11: Curva de Calibración para la Medición de Fenol .....	82
Figura 12: Esquema de los Distribuidores de Flujo Estudiados .....	84
Figura 13: Curva de calibración de Rotámetro de Aire .....	85
Figura 14: Curva de calibración del Rotámetro de Líquido.....	86
Figura 15: Curva de Calibración de DBO <sub>5,20</sub> .....	87
Figura 16: Curva de Calibración de DQO .....	88
Figura 17: Relación DBO <sub>5,20</sub> y DQO de Muestra Sintética.....	51
Figura 18: Esquema del Sistema de Tres Fases empleado para la Biodegradación .....	52
Figura 19: Degradación de Fenol para Cepas Estudiadas .....	53
Figura 20: Degradación de Fenol en función del tiempo SW vs MSM .....	54
Figura 21: Degradación de Fenol en función del tiempo para Biomasa Suspendida .....	56
Figura 22: Crecimiento de la Biomasa Suspendida en función del tiempo.....	57
Figura 23: Velocidad Específica de Crecimiento de el Cultivo Suspendido...	58
Figura 24: Gráfica para Determinar las Constantes Cinéticas de Crecimiento de la Biomasa Suspendida.....	59
Figura 25: Degradación de Fenol en función del tiempo para Biomasa Inmovilizada.....	62
Figura 26: Variación de la Apariencia Física del Soporte .....	63
Figura 27: Porcentaje de Remoción de Fenol en el Reactor de Tres Fases ....	66
Figura 28: Perfil del Reactor a las 48 horas .....	67
Figura 29: Perfil del Reactor a las 216 horas .....	67

## INDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1: Parámetros Físico-Químicos del Fenol .....	4
Tabla 2: Toxicidad del Fenol en Función de su Concentración .....	5
Tabla 3: Componentes del Medio Mineral MSM.....	28
Tabla 4: Componentes del Medio Mineral SW.....	29
Tabla 5: Lista de Reactivos Utilizados .....	37
Tabla 6: Lista de Equipos Utilizados .....	38
Tabla 7: Datos de la Calibración del Rotámetro de Aire .....	85
Tabla 8: Datos de Calibración del Rotámetro de Líquido .....	86
Tabla 9: Datos de DBO <sub>5,20</sub> en Función de la Concentración de Fenol .....	87
Tabla 10: Datos de DQO en Función de la Concentración de Fenol .....	88
Tabla 11: Remoción de Fenol por <i>Acinetobacter</i> sp .....	89
Tabla 12: Remoción de Fenol por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	89
Tabla 13: Degradación de Fenol en Función del Tiempo para el Medio SW.....	90
Tabla 14: Degradación de Fenol en Función del Tiempo para el Medio MSM.....	90
Tabla 15: Degradación de Fenol en Función del tiempo para 323 ppm.....	91
Tabla 16: Degradación de Fenol en Función del tiempo para 514 ppm.....	91
Tabla 17: Degradación de Fenol en Función del tiempo para 733 ppm.....	91
Tabla 18: Degradación de Fenol en Función del tiempo para 1046 ppm.....	92
Tabla 19: Degradación de Fenol en Función del tiempo para 1263 ppm.....	92
Tabla 20: Degradación de Fenol en Función del tiempo para 1407 ppm.....	92
Tabla 21: Velocidad Específica de Crecimiento Cultivo Suspendido.....	58
Tabla 22: Constantes Cinéticas de Estudios de Biodegradación de Fenol.....	60
Tabla 23: Degradación de Fenol en Función del tiempo para 264 ppm.....	93
Tabla 24: Degradación de Fenol en Función del tiempo para 522 ppm.....	93
Tabla 25: Degradación de Fenol en Función del tiempo para 746 ppm.....	93
Tabla 26: Datos Hidrodinámicos del reactor con el Distribuidor Cónico.....	95
Tabla 27: Datos Hidrodinámicos del reactor con el Distribuidor Cilíndrico..	96
Tabla 28: Datos de Remoción de Fenol en el Reactor .....	97

## CAPITULO 1: MARCO TEORICO

El fenol es un contaminante cuyas características lo definen como una sustancia altamente tóxica para los seres vivos, con fuerte poder corrosivo y representa una potencial amenaza para los ecosistemas que sirven como sumideros de las industrias que generan efluentes fenólicos.

### 1.1.- FENOL

El fenol es un compuesto aromático de la rama de los alcoholes, de color blanquecino y apariencia cristalina en estado sólido. Es un compuesto altamente higroscópico lo que dificulta su manipulación a temperatura ambiente. Entre sus características físico-químicas se destacan:

**Tabla 1: Parámetros Físico-Químicos del Fenol**

Parámetro Físico-Químico	Valor
Fórmula Química	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH
Constante de Acidez	10 <sup>11</sup>
Masa Molecular	94,11 g/mol
Gravedad Específica	1,071 <sup>25/4</sup>
Solubilidad	Agua = 8,2 <sup>15</sup> Alcohol = ∞ Éter = ∞
Punto de Congelación	42 °C
Punto de Ebullición	181,4 °C
Coefficiente de Partición orgánico	2,7 Kg/L

Fuente: Perry, 1999

El fenol es altamente corrosivo y puede ocasionar severas quemaduras en la piel. La familia de los fenoles es muy amplia, y en ella se incluyen los cresoles, catecol, hidroquinona, pentaclorofenol, etc. (Solomons, 1979)

### 1.1.1.- TOXICIDAD DEL FENOL

Uno de los usos más frecuentes del fenol es como antiséptico, debido a su capacidad para la destrucción de los tejidos vivos como consecuencia de su toxicidad. Estudios realizados por Sikkema y col. (1995) demostraron que existe interacción entre las partes hidrofóbicas de las células y el carácter lipofílico de los compuestos aromáticos que debilitan la actividad enzimática de las mismas y producen un efecto inhibitorio a nivel de la membrana celular. Se ha demostrado que un contacto prolongado de la piel con esta sustancia puede ocasionar gangrena, ya que muestra un carácter ácido. En la Tabla 2 se muestran algunos niveles de tolerancia de este contaminante en los seres vivos y el ambiente.

**Tabla 2: Toxicidad del Fenol en Función de su Concentración**

Concentración	Toxicidad
1.5 g	Dosis oral letal para un adulto
> 200 ppm	Inhibe la actividad biológica del suelo y se torna bactericida
5 – 25 ppm	Dosis letal para la vida acuática
2 – 2.5 ppm	Le da al agua de beber un sabor y olor característico cuando se combina con cloro

Fuente: <http://www.fim.utp.ac.pa/Revista/vol4/Tejedor.html>

Por sus características, este contaminante es fácilmente bioacumulable en la capa lípida de los seres vivos lo que trae como consecuencia su acumulación, lo cual significa que la concentración del contaminante en el individuo aumenta a medida que se prolongue su contacto con el mismo; que a largo plazo puede ocasionar el alcance de su nivel letal.

La tolerancia a los efectos tóxicos del fenol se incrementa por la adaptación progresiva de los microorganismos a diferentes concentraciones de esta sustancia. La inmovilización sobre soportes sólidos, la inclusión en geles y el crecimiento de microcolonias (Korol y col., 1989; Heipieper y col., 1990). El fenol puede actuar destruyendo la estructura de la membrana y/o interfiriendo con las reacciones celulares, pudiendo afectar las reacciones comunes de fosforilación oxidativa e incluso inhibir directamente a las fenol permeasas o hidrolasas vinculadas directamente con su metabolismo (Allsop y col. 1993).

### **1.1.2.- EFLUENTES FENÓLICOS**

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA en sus iniciales en inglés) ha determinado que la concentración de fenol en el agua potable no debe superar a una parte por billón (Yang y col., 1975), pero por otro lado los efluentes industriales no deben superar 14,4 partes por millón (Freeman, 1988). En nuestro país, la legislación ambiental establece a través del decreto 883 de fecha 18 de Diciembre de 1995, publicado en la Gaceta Oficial N° 5.021, la concentración límite de los contaminantes presentes en los efluentes industriales para permitir su descarga a los distintos cuerpos de agua. Para el caso específico del fenol, este decreto establece como un máximo para la descarga, una concentración de 0,5 mg/L.

En la actualidad hay varios tipos de industrias que generan efluentes con elevado contenido de fenol. Entre ellas pueden mencionarse a las industrias de:

plástico, coquización, desinfectantes, explosivos, papelera, pinturas, pesticidas, herbicidas y fungicidas, petróleo, resinas sintéticas y maderera.

Algunas concentraciones típicas de efluentes fenólicos industriales importantes son: en hornos de coque de 28 a 3.900 mg/L, en procesos de conversión de carbón de 9 a 6.800 mg/L, en la industria petroquímica de 2,8 a 1.250 mg/L y en la industria papelera, en particular la operación de blanqueo de las pastas químicas, en la que las astillas de madera se lavan para obtener fibras puras de celulosa. (García, 1989)

En efecto, la industria del petróleo en sus procesos de producción, refinación, transporte y almacenamiento de hidrocarburos genera gran cantidad de corrientes fenólicas, las cuales poseen concentraciones de fenol que oscilan entre 0,7 y 500 mg/L. La composición química de estas aguas es variable ya que depende de la naturaleza del hidrocarburo, método de tratamiento de emulsiones del yacimiento y del funcionamiento de las diferentes operaciones del proceso (Gómez, 1998). Esta actividad industrial genera aguas agrias residuales con una concentración de fenol de 80 a 185 ppm. Además, los caudales pueden ser muy altos, Grosso y col., (1995) indican que pueden alcanzarse descargas de 16.000 a 32.000 m<sup>3</sup>d<sup>-1</sup>, con cargas mayores a 200 ppm.

La actividad maderera en particular genera a escala mundial aproximadamente 200 metros cúbicos de efluentes por tonelada métrica de material procesado por día, donde la cantidad de fenol en estos efluentes alcanza aproximadamente 0,22 toneladas por año (Leuenberger y col., 1985). Por otro lado, la industria del plástico produce efluentes fenólicos con concentraciones comprendidas entre 600-2.000 ppm y en la producción de resinas fenólicas se han registrado hasta 1.600 ppm (Watson-Craik y col., 1989; Patterson, 1980).

En la manufactura de aceites lubricantes, el fenol se utiliza en los procesos de extracción con solventes en la etapa de recuperación de compuestos aromáticos policíclicos. En estos procesos, se generan corrientes de desecho con fenol que contiene hasta 25,5 libras de este contaminante por cada 1000 barriles de combustible procesado (Beychok, 1967).

### **1.1.3.- TRATAMIENTOS PARA REMOVER FENOL**

Para controlar las descargas de fenol al ambiente, se han desarrollado varias técnicas de tratamiento con el objeto de remover este compuesto presente en los efluentes industriales; pero su utilización está asociado a la concentración presente, las cuales según Fuller y col., (1988) se pueden clasificar de acuerdo a las siguientes escalas:

- Efluentes con altos niveles: La concentración de fenol varía entre 50 y 150 mg/l. Los tratamientos biológicos son los más utilizados bajo estas condiciones.
- Efluentes con niveles intermedios: cuando la concentración de fenol se encuentra entre 5 – 50 mg/L. En este caso para su tratamiento se emplean tanto procesos biológicos como químicos, aun cuando estos últimos presentan ventajas económicas. Usualmente las corrientes de salida de los tratamientos biológicos son tratadas químicamente para completar la degradación del fenol.
- Efluentes de bajo nivel: se definen como aquellos cuya concentración de fenol es menor a 5 mg/L y para este tipo de corrientes se emplean tratamientos químicos.

A nivel industrial, los tratamientos para degradar el fenol se pueden agrupar en tres grandes grupos:

### **1.1.3.1.- TRATAMIENTOS FISICOS**

Estos tipos de tratamientos buscan recuperar el fenol para su reutilización (a excepción de la incineración) y entre las principales técnicas se encuentran la adsorción mediante carbón activado, absorción con vapor y extracción con solventes, entre otras. La eficiencia de estos tipos de tratamientos depende de la concentración de fenol presente en el efluente a tratar.

#### **\* ABSORCIÓN CON VAPOR**

La absorción con vapor se usa comúnmente en efluentes que contienen compuestos poco volátiles que no pueden ser tratados por absorción con aire. Este tipo de proceso particularmente se emplea con contaminantes orgánicos, cuando deben recuperarse o concentrarse para obtener una destrucción más eficiente.

Este sistema se ha empleado satisfactoriamente en la industria productora de pulpa, en la absorción de metanol, compuestos fenólicos y organosulfurados (Cance y col., 1980).

El proceso de absorción por vapor utiliza un fraccionamiento sin rectificación y en él, la corriente a tratar se alimenta por el tope, mientras que el vapor se inyecta directamente por el fondo de la torre. El vapor saliente está constituido por una mezcla de vapores orgánicos y agua, que se condensan y recogen en un tanque de acumulación (Freeman, 1988).

## **\* EXTRACCIÓN CON SOLVENTES**

En este proceso se utiliza un solvente y en el proceso se favorece el contacto entre dos fases insolubles (fase acuosa y solvente), lográndose la transferencia de masa del contaminante desde la fase acuosa hacia el solvente, por el cual el fenol tiene gran afinidad. La extracción de fenoles con solventes es económicamente justificable cuando su concentración es superior a 1.000 mg/l (Gil, 1998).

Las pérdidas de solvente y la corriente fenol-solvente crean problemas adicionales de contaminación. Después de la extracción con solventes y la etapa de agotamiento, los fenoles están todavía presentes en niveles de cientos de mg/l. (Hoyos, 2003).

## **\* ADSORCIÓN MEDIANTE CARBÓN ACTIVADO.**

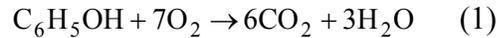
La adsorción es la transferencia de masa del contaminante desde la fase acuosa hacia una superficie sólida (adsorbente). El nivel de adsorción depende en general del tipo de adsorbente, del contaminante y de la temperatura. Los compuestos fenólicos se pueden adsorber sobre una serie de materiales como carbón activado, resinas poliméricas sintéticas y biopolímeros (Alzarate y col., 2000)

Una vez adsorbido el contaminante es necesario llevar a cabo algún tipo de tratamiento si se desea reutilizar el adsorbente (Hoyos, 2003).

Así, en el caso de carbón activado este material puede emplearse para adsorber sustancias fenólicas. El proceso de adsorción es reversible, en vista de lo cual la remoción de contaminantes se realiza hasta que la capacidad del carbón esté agotada. Una vez regenerado se puede reutilizar el carbón, lo cual constituye una gran ventaja económica cuando se utilizan grandes caudales del líquido (Freeman, 1988).

## **\* INCINERACION**

La incineración es una técnica usada para la destrucción de fenoles y de compuestos aromáticos clorados. El fenol se destruye transformándose en dióxido de carbono y agua según la siguiente reacción:



La EPA exige 1.600°C como temperatura de operación para este proceso (Alzarate y col., 2000), lo que convierte a esta opción una costosa forma de tratamiento, en el cual además se producen diversos subproductos debido a la combustión incompleta.

### **1.1.3.2.- TRATAMIENTOS QUIMICOS**

Estos tratamientos tienen como objetivo remover el fenol utilizando técnicas como: oxidación térmica, oxidación húmeda, uso de peróxido de hidrógeno, uso de permanganato de potasio, tratamiento con ozono, tratamiento con dióxido de cloro, etc. Sus principales características se detallan a continuación:

## **\* INTERCAMBIO IÓNICO**

Se emplea para la remoción de fenoles en estado ionizado y se justifica la utilización de este proceso cuando la concentración de fenol es superior a 1.000mg/l (Alzarate y col., 2000). El fundamento de este tratamiento es el intercambio de un ión en la estructura del material de intercambio, por un ión en solución. Posteriormente se regenera el material de intercambio y el fenol se obtiene a mayor concentración. Su principal desventaja es el alto costo.

## **\* OXIDACIÓN TÉRMICA**

Este tipo de proceso se ha utilizado para tratar desechos sólidos o líquidos. Se han empleado satisfactoriamente incineradores de lecho fluidizado; y en el tratamiento es posible mantener estable el control de temperatura, hay un excelente contacto gas-sólido, del control del tiempo de residencia y además permiten tratar desechos sólidos o líquidos. Estos sistemas han sido utilizados para tratar soluciones de fenol-cresol, obteniéndose una eficiencia (Distillation and removal efficiencies DRES) mayor del 99.999% a temperaturas de reacción comprendidas entre 732°C y 900°C y un tiempo de residencia de 11 s (Freeman, 1988).

## **\* TRATAMIENTO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.**

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante fuerte que libera oxígeno y calor durante su descomposición y ha sido utilizado en la oxidación de efluentes fenólicos provenientes de las plantas procesadoras de pulpa de papel (Freeman, 1988).

Eisenhower (1964), indica que pueden oxidarse compuestos fenólicos empleando peróxido de hidrógeno y agregando como catalizador una sal ferrosa denominada Reactivo de Fenton. Este proceso es adecuado para concentraciones de fenol bajas; sin embargo, su aplicación a otros efluentes industriales que contienen fenol (refinerías, plantas de coquización) no ha sido tan satisfactoria debido a la presencia de materiales que son capaces de oxidar la sal ferrosa.

## **\* TRATAMIENTO CON PERMANGANATO DE POTASIO**

El permanganato de potasio es una sal sólida cristalina o en granos que tiene un aspecto violáceo oscuro con tonalidades metálicas y es un agente oxidante fuerte;

que ha sido utilizado en el control de fenol y de otros contaminantes industriales (Freeman, 1988). Empleando este reactivo, Chamberlin y col. (1952), lograron una remoción del 62% de una corriente fenólica cuya concentración inicial era de 125 mg/L.

### **\* TRATAMIENTO CON OZONO**

El ozono es un gas inestable con un olor penetrante característico que es fácilmente detectado a concentraciones tan bajas como 0,01 mg/L, y también es un agente moderadamente oxidante. Tiene la propiedad de ser más soluble que el oxígeno en el agua. Posee un tiempo de vida media de 20 a 30 min en agua destilada a 20°C.

El ozono es un oxidante relativamente caro, por lo que es importante que la transferencia de masa del ozono en el aire hacia el agua sea lo más eficiente posible. Los equipos empleados para provocar este contacto son generalmente torres aspersoras, lechos empacados y columnas de burbujeo con platos o rellenos (Freeman, 1988).

Gurol y col. (1987) observaron que la combinación de ozono y radiaciones ultravioleta era más eficiente para el tratamiento de compuestos orgánicos que el ozono solo. Ellos consideraron que esta respuesta se debía a la reacción en cadena que comienza con un fotón de los rayos ultravioleta y que descompone el ozono en una molécula de oxígeno y un radical. Este radical oxígeno puede reaccionar con una molécula de agua para formar dos radicales hidróxidos, los cuales a su vez continúan produciéndose y consumiéndose mediante un complejo mecanismo.

El ozono y el dióxido de cloro también han sido exitosamente usados como oxidantes para la remoción de fenol. Aún cuando el ozono es capaz de degradar por sí sólo el fenol, los costos de este tratamiento son por lo general muy elevados.

## **\* TRATAMIENTO CON DIÓXIDO DE CLORO**

El dióxido de cloro se ha constituido es un reactivo muy efectivo para la remoción del fenol. Las ventajas que ofrece su uso son: bajos costos, fácil manejo, no genera sólidos en la reacción que puedan ser difíciles de manejar y un bajo mantenimiento de los equipos involucrados en la oxidación.

En forma general, el dióxido de cloro reacciona con el fenol para producir benzoquinonas y ácidos orgánicos con el ácido maleico, oxálico y fumárico, los cuales se degradan hasta dióxido de carbono y agua. Es importante destacar que un efluente que contenga este tipo de ácidos orgánicos y quinonas no representa un peligro contaminante. En la reacción pueden llegar a formarse clorofenoles, Generalmente se requieren cerca de 0,908 Kg de este reactivo para destruir 0,454 Kg de fenol (Fuller y col., 1988).

### **1.1.3.3.- TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS**

Estos tratamientos están basados en la capacidad metabólica de los microorganismos de remover el fenol bien sea por la vía aeróbica o anaeróbica. En este tratamiento los microorganismos utilizan los compuestos presentes en el agua (en este caso el contaminante) como fuente de carbono y energía, transformándolos en biomasa, gas carbónico y otros intermediarios.

## **\* TRATAMIENTOS ANAEROBICOS**

En la digestión anaerobia los compuestos orgánicos, son metabolizados por los microorganismos en ausencia de oxígeno hasta convertirlos a dióxido de carbono, metano y material celular (Freeman, 1988). Estudiando la digestión anaerobia de

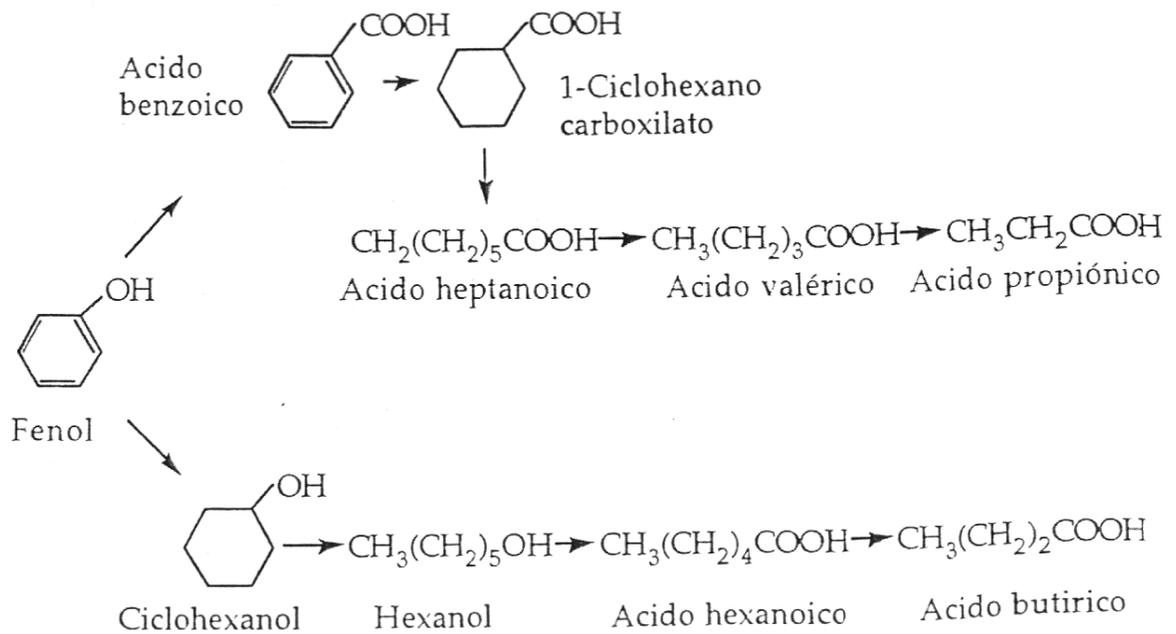
efluentes fenólicos, Keith (1973) observó una completa conversión de los benzoatos hasta llegar a  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ .

Chimielowski y col. (1966) desarrollaron un estudio cinético sobre la descomposición anaerobia del fenol, p-cresol y resorcinol. Para ello evaluaron fermentaciones por carga empleando un medio líquido con concentraciones iniciales de fenol de 100 mg/L. Los cultivos mixtos utilizados degradaron el fenol en un 100% produciendo  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Algunos productos intermedios formados con propiedades no-hidrobencénicas revelaron la producción de catecol como paso intermedio en la degradación anaeróbica. Cabe destacar que a veces se requieren prolongados períodos de tiempo para obtener una cantidad adecuada de masa microbiana para el tratamiento requerido (Olthof y col., 1982).

Este tipo de tratamiento para contaminantes como el fenol, posee las siguientes ventajas:

- Ahorro de energía usada por aireación.
- El crecimiento biológico es alrededor de 20 veces menor en comparación con los tratamientos aeróbicos.
- El metano puede venderse o quemarse aprovechando su capacidad energética.
- Se puede realizar en reactores de bajo volumen.

En la Figura 1, se presenta el ciclo metabólico propuesto por Neufeld y col., (1980) para la degradación anaeróbica de fenol:



**Figura 1: Degradación Anaeróbica del Fenol**

Fuente: Neufeld, R.D; Mack, J. D. y J. P. Strakey, (1980)

## \* TRATAMIENTOS AEROBIOS

En la degradación aerobia de desechos orgánicos, el tratamiento en lodos activados tiene una especial importancia por su amplio uso. Estos sistemas operan empleando cultivos microbianos mixtos capaces de degradar los desechos orgánicos en presencia de oxígeno y constan en general de un tanque de reacción y un sedimentador de donde se recircula el lodo.

Luthy y col., (1980) utilizaron diferentes sistemas de lodos activados en el tratamiento de aguas residuales provenientes de plantas de coquización y sus resultados señalan una reducción total del fenol en corrientes industriales con una concentración inicial de este contaminante de 680 mg/L. Al comparar sistemas de lodos activados con reactores biológicos de lecho empacado y lecho fluidizado, se ha

encontrado que los segundos son los que presentan la mayor eficiencia en la remoción del fenol (Holladay y col, 1978).

Chudoba y col., (1991), compararon la degradación de compuestos fenólicos en sistemas de lodos activados en reactores de tipo flujo pistón y mezcla completa. A partir de los cultivos obtenidos, para los reactores de mezcla completa concluyeron que: la concentración del fenol es la misma en todo el tanque por lo que la tasa de oxígeno consumido es la misma, los microorganismos se encuentran bajo condiciones favorables con respecto a las concentraciones de fenol, todo el contenido del tanque es utilizado en la dilución del efluente; pero en los sistemas de este tipo pueden aparecer microorganismos filamentosos sedimentables que afectan la operación de los procesos de tratamiento, los cuales no pueden desarrollarse en un sistema flujo pistón. Además que la disposición flujo pistón es más eficiente en cuanto a la tasa específica de remoción de fenol, aun cuando este tipo de reactores es más vulnerable a cambios en la concentración de la alimentación.

Kennes y col. (1994), también empleando cultivos puros, estudiaron la degradación de hidrocarburos aromáticos polinucleado y compuestos fenólicos utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, indicando que esta selección tiene como ventaja la posibilidad de lograr una total remoción de los contaminantes, debido a la presencia de enzimas extracelulares que son capaces de degradar moléculas de alto peso molecular y baja solubilidad.

Dikshitulu y col. (1993), estudiaron la competencia entre dos poblaciones de *Pseudomona putida* y *P. resinovorans*, en la degradación de fenol en un sistema de reactores por carga en serie, concluyendo que ambos microorganismos actúan conjuntamente en la degradación de fenol debido, en parte al efecto inhibitorio que este compuesto tiene sobre ellos.

## 1.2.- CRECIMIENTO MICROBIANO

Varios estudios realizados han demostrado que los cultivos puros de microorganismos poseen mayores ventajas que los cultivos mixtos en la degradación de ciertos contaminantes. Investigaciones como las de Bayly y col., (1973), Busweil, (1975), Cabrera y col. (1981), Hinteregger y col., (1992), González y col., (1992), Concha y col., (2005), se han avocado al empleo de cepas puras de microorganismos para la degradación del fenol a diferentes concentraciones. Actualmente entre las cepas puras identificadas que son capaces de degradar fenol se encuentran: *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Trichosporon cutaneum*, *Micrococcus sp.*; siendo la más estudiada el género *Pseudomonas*.

En 1967, Dixon y col., desarrollaron un modelo matemático que describe de una manera sencilla el crecimiento microbiano de las cepas que degradan la materia orgánica, partiendo de Michaelis-Menten. Fundamentaron su teoría en la formación de un complejo enzima-sustrato (XS), indicando que posiblemente a partir de cierta concentración de sustrato se forma un complejo inactivo (XS<sub>2</sub>) para generar un producto cuando moléculas de sustratos atacan el punto activo de la enzima; siendo la secuencia y constantes de reacción las indicadas a continuación:



Donde X representa la biomasa, S el sustrato, K<sub>s</sub> es la constante de reacción que rige la formación del complejo sustrato-biomasa (XS), y K<sub>i</sub> es la constante de inhibición que ocurre a causa del sustrato y supusieron que ocurre en la segunda

reacción debido al ataque de una segunda molécula de sustrato al complejo biomasa-sustrato.

La tercera reacción propuesta, permite explicar la obtención de un producto de características distintas al sustrato, generado luego del proceso de degradación y lo que permitirá obtener la tasa de utilización del sustrato; la cual se supone que esta limitada por la tasa de reacción del sustrato y la biomasa.

Jones y col., (1973) desarrollaron a partir de la ecuación de Haldane (8) una expresión matemática que facilitara el cálculo de las constantes de crecimiento microbiano  $\mu_m$ ,  $K_s$  y  $K_i$  que se muestra a continuación:

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_s / S + S / K_i} \quad (5)$$

Si la concentración del contaminante es alta, el factor  $K_s/S$  es despreciable y por tanto la ecuación (5) se simplifica y la relación genera una línea recta la cual puede ser utilizada para calcular  $\mu_m$  y  $K_i$  como se muestra a continuación:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{S}{\mu_m * K_i} \quad (6)$$

Si la concentración del contaminante es baja, entonces el factor  $S/K_i$  es despreciable y la ecuación (5) toma la forma de la expresión de Monod donde no se considera el efecto inhibitorio y se puede determinar  $K_s$  según la siguiente ecuación:

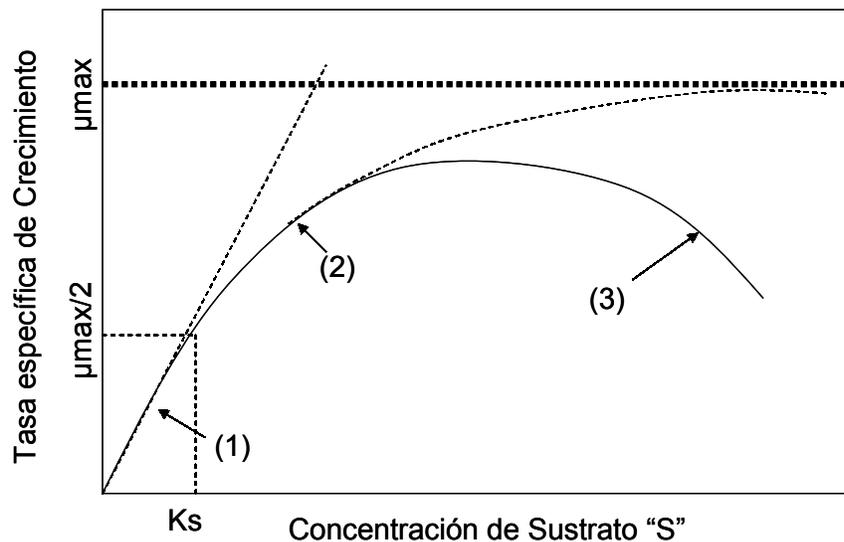
$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_s / S} \quad (7)$$

En 1930 Haldane, citado por Hill y col., 1975, desarrolló una ecuación que relaciona la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) con la concentración de sustrato, con

base en una tasa máxima de crecimiento ( $\mu_m$ ), una constante de inhibición ( $K_i$ ) y una constante de saturación ( $K_s$ ); siendo la ecuación obtenida la siguiente:

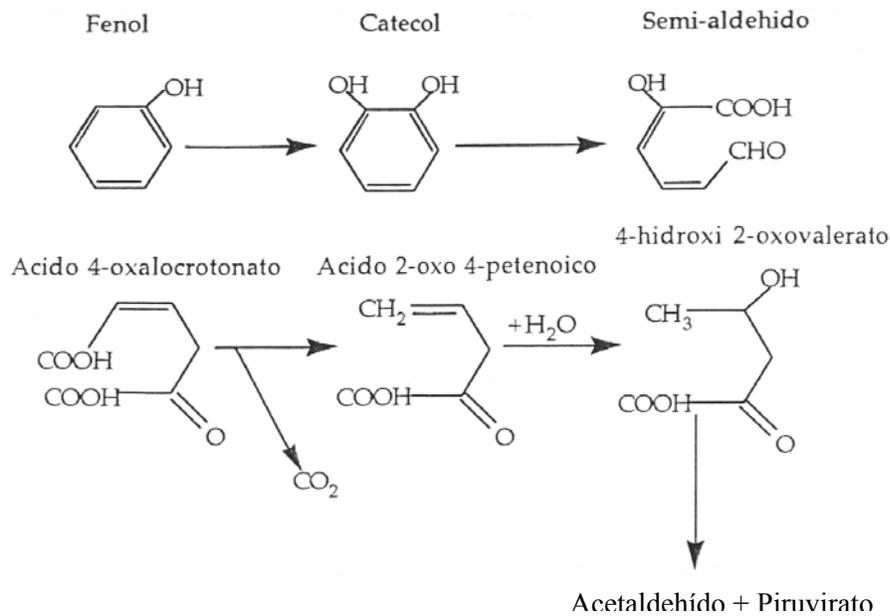
$$\mu = \frac{\mu_m * S * K_i}{S * K_i + K_s * K_i + S^2} \quad (8)$$

la cual señala que la tasa de crecimiento se incrementará con la concentración del sustrato hasta un valor crítico, después del cual el efecto inhibitorio empezará a dominar; lo que hace de este modelo matemático una herramienta útil al momento de estudiar el comportamiento de la biomasa que degrada la materia orgánica. En la Figura 2 pueden observarse las etapas de un cultivo por carga, de microorganismos bajo ese tipo de condiciones. En la etapa (1) el crecimiento es de tipo exponencial; una segunda etapa (2) de la curva responde a la ecuación desarrollada por Monod y la etapa (3) corresponde al efecto inhibitorio del aumento en la concentración del sustrato “S”.



**Figura 2: Representación Gráfica de un Sustrato Inhibitorio.**

Yang y col. (1975), estudiaron el comportamiento de las *Pseudomonas putida* en fermentadores por carga donde la única fuente de carbono era fenol con condiciones de temperatura de 30 °C y pH = 6. Pudieron comprobar que el crecimiento microbiano seguía el modelo matemático propuesto por Haldane. Obtuvieron los siguientes valores para las constantes cinéticas  $\mu_m = 0,567 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_s = 2,38 \text{ mg/L}$  y  $K_i = 106 \text{ mg/L}$ . Indicaron además, que a partir de una concentración de sustrato de 75 mg/L se comenzó a percibir el efecto inhibitor del contaminante sobre los microorganismos. Estos investigadores propusieron el siguiente camino metabólico para la cepa microbiana en la degradación aerobia del fenol :



**Figura 3: Degradación Aeróbica del Fenol**

Fuente: Neufeld, R.D; Mack, J. D. y J. P. Strakey, (1980)

Lallai y col. (1989), estudiando la biodegradación de fenol, encontraron que se había realizado un gran número de investigaciones teóricas y prácticas empleando tanto cultivos puros como mixtos, pero a pesar de ello no se había logrado un acuerdo definitivo sobre el modelo cinético que describe mejor el crecimiento microbiano utilizando fenol. Las experiencias hasta ahora llevadas a cabo, indican que en cultivos

puros el mejor modelo cinético debe tomar en consideración el efecto de inhibición, sin embargo en cultivos mixtos no existe un acuerdo general y para poblaciones microbianas adaptadas al fenol, algunos investigadores consideran que este compuesto no es inhibitorio aún a altas concentraciones.

### 1.3.- BIODEGRADACIÓN DE FENOL

La cantidad de microorganismos aumentará a medida que se incrementa la concentración del sustrato, tal como lo indica Bollag (1979), quien encuentra una relación entre el crecimiento de los microorganismos y la biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos. Según sus investigaciones los microorganismos que utilizan este tipo de sustratos como el fenol, sintetizan a partir de ellos intermediarios celulares. Este proceso de biosíntesis se traduce en un incremento del tamaño de la población y en consecuencia de la biomasa.

Tang y col. (1987), estudiaron la biodegradación de fenol en un reactor de tres fases con un soporte de carbón activado; utilizando un cultivo mixto. En un afluente con  $0,12 \text{ Kg/m}^3$  de fenol y utilizando el modelo de Haldane obtuvieron las siguientes constantes cinéticas  $\mu_m = 0,365 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_s = 10,948 \times 10^{-3} \text{ Kg/m}^3$  y  $K_i = 113 \times 10^{-3} \text{ Kg/m}^3$ .

Kotturi y col., (1991), analizaron el efecto de la temperatura sobre la degradación del fenol empleando una cepa de *Pseudomonas putida*; siendo los parámetros de operación temperatura de  $-10 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , concentraciones de sustrato empleadas:  $14 - 1.000 \text{ mg/l}$ . Aplicaron el modelo de crecimiento de Haldane y obtuvieron las siguientes constantes cinéticas  $\mu_m = 0,119 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_s = 5,27 \text{ mg/l}$  y  $K_i = 377 \text{ mg/l}$ . Concluyeron que la degradación del fenol disminuye con la temperatura y que las diferencias obtenidas con otras investigaciones similares resultan de la

variación en los parámetros experimentales como: tipo de medio de cultivo, microorganismo, concentración de sustrato, etc.

En 1992 González y col. estudiaron el comportamiento de una cepa autóctona de *Pseudomonas putida*. Aplicaron el modelo de comportamiento de Haldane y obtuvieron las siguientes constantes cinéticas:  $\mu_m = 0,688 \text{ h}^{-1}$  y  $K_i = 581 \text{ mg/L}$ . Okaygun y col., (1992) estudiaron el crecimiento de las *Pseudomonas sp.* en un fermentador por carga donde los pulsos de alimentación se realizaban de manera consecutivas cada vez que se agotaba el sustrato; y obtuvieron las siguientes constantes cinéticas aplicando el modelo de Haldane  $\mu_m = 0,326 \text{ h}^{-1}$ ,  $K_s = 8,0 \text{ mg/L}$ . Observaron que  $K_i$  disminuyó a medida que se incrementaba el número de cargas suministradas del sustrato; demostrando de esta manera que el cultivo podía adaptarse.

En 1993, Dikshitulu y col., estudiaron la competencia entre dos poblaciones microbiana: *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas resinovorans*, para la degradación de fenol en un sistema de reactores por carga conectados en serie; llegando a la conclusión de que ambas cepas de microorganismos actúan conjuntamente en el proceso de degradación en parte debido al efecto inhibitorio que ejerce el sustrato sobre ellos. Allsop y col., (1993), estudiaron el efecto inhibitorio del fenol sobre una cepa de *Pseudomonas putida*, encontrando que este efecto se hacia presente en soluciones con concentraciones a partir de 90 mg/L.

Kennes y col. (1994), estudiaron la degradación de hidrocarburos aromáticos polinucleados y compuestos fenólicos utilizando una cepa del hongo *Phanerochaete chrysosporium*; llegando a la conclusión que esta selección presenta una amplia ventaja en la remoción de contaminantes debido a la presencia de enzimas extracelulares que son capaces de degradar moléculas de alto peso molecular y baja solubilidad.

Nakamura y col. (2000), estudiaron como se modifica la biodegradación de fenol en presencia de metales pesados; la cepa utilizada fue *Acinetobacter calcoaceticus* y el afluente contenía 0,2 g/L de fenol y 0,01 g/L de zinc y cobre. Como resultados obtuvieron una tasa de dilución del 0,5 h<sup>-1</sup> y un  $\mu_m$  de 0,86 h<sup>-1</sup>, desarrollando adicionalmente un modelo matemático empírico para determinar los parámetros cinéticos de la cepa.

#### **1.4.- INMOVILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS**

En diversas investigaciones se ha determinado que la biomasa inmovilizada presenta un comportamiento más adecuado que la biomasa suspendida cuando se trata de la degradación de contaminantes.

En cuanto al proceso de inmovilización de microorganismos se han desarrollado cuatro técnicas para llevarlas a cabo; las cuales depende del tipo soporte. Estas técnicas son:

- Inmovilización por adsorción: se obtiene por la adhesión espontánea de los microorganismos al soporte. Esta técnica a nivel industrial es empleada en los lechos biopercoladores, los biodiscos, etc. Según Kennedy y col., (1990) las ventajas del uso de esta técnica se basa en su simplicidad, la amplia variedad de materiales adsorbentes y el reciclaje del mismo para otros procesos. Adicionalmente es de bajo costo y evita la producción de subproductos tóxicos; ya que se inmovilizan células vivas que se multiplican durante el desarrollo del tratamiento y el exceso se elimina fácilmente.
- Inmovilización por Inclusión en un Gel: a través del cual es posible, retener tanto células vivas como muertas en un gel que presente unas propiedades mecánicas, químicas y físicas específicas que permitan la entrada de sustrato y la salida de productos. Dentro de las propiedades mecánicas del gel se

encuentran la compresión y la fuerza de cizalladura; mientras que por la parte química se considera la toxicidad, su estabilidad en función del pH y la composición iónica.

- Inmovilización por Unión Covalente: en este caso las células se inmovilizan mediante uniones covalentes entre la célula y el soporte; para ello se utilizan reactivos bifuncionales (que reaccionan con dos ó más de sus grupos). La naturaleza de este enlace covalente no permite que el biocatalizador (la célula junto con el soporte) se separe en la solución que contiene el sustrato.
- Inmovilización por entrecruzamiento: puede realizarse por unión química (a través de reactivos bifuncionales) o por unión física (donde actúan la carga de partículas y los agentes floculantes empleados en el proceso). Una limitante de esta técnica es la toxicidad presente en los agentes. En este tipo de inmovilización deben evitarse los cambios estructurales en la célula para prevenir la desactivación parcial del sitio activo y esto implica el uso de condiciones moderadas de temperatura, pH, concentración durante el proceso de inmovilización (Kennedy y col., 1990).

Holladay y col. (1978), realizaron un trabajo comparativo sobre la eficiencia del proceso de remoción entre un sistema de lodos activados, reactores biológicos de lecho empacado y lecho fluidizado; llegando a la conclusión que para la remoción de fenol los últimos presentan una mayor eficiencia en el proceso. Este aspecto, permitió abrir más el campo de investigación para el proceso de remoción de fenol; ya que se demostró que la remoción no sólo depende de la cepa microbiana utilizada sino también del tipo de reactor y el soporte seleccionado para la inmovilización.

Bettman y col. (1984), utilizaron *Pseudomonas sp.* inmovilizadas en gel con alginato como soporte para la degradación de fenol, obteniendo la degradación total

en soluciones de 2.000 mg/L y llegando a la conclusión que el soporte utilizado actuaba como una especie de capa protectora contra el fenol.

Anselmo y col. (1985), investigaron la degradación de fenol inmovilizando una cepa de *Fusarium flocciferum* utilizando como soporte agar, alginato, carragenina, poliuretano y espuma de poliuretano; con una concentración inicial de fenol de hasta 4.000 mg/L. Los experimentos se realizaron durante 154 horas teniendo como resultado que el soporte de poliuretano mostró buena resistencia mecánica al crecimiento microbiano; mientras que las células libres presentaron el efecto inhibitorio a los 1.300 mg/L.

Tang y col. (1987), trabajaron en un reactor de tres fases con lecho fluidizado cuyo soporte fue carbón activado; utilizando un cultivo mixto y un afluente con 0,12 Kg/m<sup>3</sup> de fenol. Determinaron que la tasa de difusión de oxígeno y fenol en este tipo de reactor estuvo entre 8,6 y 24,5%.

Kennedy y col. (1990), estudiaron las ventajas de utilizar los microorganismos inmovilizados en el proceso de remoción de fenol; y llegaron a la siguiente conclusión: el sistema permite reducir la biomasa obtenida, mejora la actividad metabólica de las células en algunos casos y cuenta un incremento en la resistencia de la célula hacia los efectos tóxicos que poseen algunas sustancias como el fenol. Por estas razones en la actualidad existen diversas tecnologías como los biopercoladores, los biodiscos rotatorios, entre otras que utilizan la biomasa adherida a un soporte con una alta eficiencia en la remoción de materia orgánica.

Wu y col. (1990), utilizaron cultivos inmovilizados de *Pseudomonas sp.* en poli-vinil alcohol y alginato de sodio, en un reactor de lecho fluidizado para la degradación de fenol; obteniendo una remoción casi completa en una alimentación de 1.300 mg/L con un caudal de 2,5 L/h. Adicionalmente, concluyen que los reactores de tres fases presentan ventajas operativas sobre aquellos que trabajan con dos fases. En

cambio, Quail y col. (1991) inmovilizaron *Pseudomonas sp.* en esferas de vidrio para estudiar la degradación de fenol en un reactor de lecho empacado, obteniendo una remoción del 100 % con una alimentación que contiene 500 mg/L de fenol que corresponde a una tasa de degradación de 4320 mg/L\*h; pero los investigadores detectaron células libres en el efluente del reactor.

González y col. (1992) inmovilizaron *Pseudomonas sp.* en partículas cilíndricas de nylon para remover fenol, obteniendo una tasa de degradación 51,5 mg/L\*h empleando una alimentación de 224 mg/L. En 1995, Durán y col. investigaron la remoción de fenol en un reactor de dos fases, una vez inmovilizado un cultivo de *Pseudomonas sp.* sobre cilindros de nylon, logrando una remoción del 20% para una corriente de 250 mg/L.

Nakhla y col. (2002), trabajaron en un reactor de lecho fluidizado donde determinaron la concentración de biomasa adherida al soporte a lo largo de la experimentación bajo condiciones anaerobias. Observaron que la generación de biomasa es proporcional al tiempo de contacto del afluente con el soporte y la concentración de sustratos. Ellos obtuvieron una concentración de biomasa de 4,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en 8 días de experimentación y 18,8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en 60 días; donde el soporte tenía dimensiones entre 0,7 y 1,4 mm.

Amsden y col. (2003), realizaron estudios con *Pseudomonas putida* adheridas a un polímero de etilen co-vinil acetato y determinaron que el biocatalizador obtenido permitió degradar 14 mg de fenol por cada gramo del polímero a partir de una solución inicial con 2.000 mg/L de fenol, obteniendo una concentración final de 750 mg/L.

Abd-El-Haleem y col. (2003) evaluaron la biodegradación de fenol a través de un *Acinetobacter sp.* tanto en un cultivo suspendido como uno inmovilizado en alginato de calcio. Utilizaron un medio de cultivo llamado LB a base de extracto de

levadura, sal común y peptona para favorecer el crecimiento microbiano de la cepa en óptimas condiciones; en cambio estudiaron la remoción de fenol con dos tipos de medio sintéticos: uno llamado MSM (cuya composición se detalla en la Tabla 3) y otro llamado SW (que se describe en la Tabla 4), donde el fenol era la única fuente de carbono. Como resultado obtuvieron que la cepa suspendida en el medio MSM tardó 120 horas en degradar el 100% del fenol presente partiendo de una concentración de 500 mg/L; mientras que inmovilizado al soporte de alginato de calcio sólo tardó 24 horas para degradar el mismo porcentaje, lo que demostró en este caso la eficiencia de esta técnica de inmovilización. Adicionalmente, este estudio determinó que la tasa de biodegradación de fenol disminuye con el aumento en la concentración de amonio y nitratos presentes en la solución.

**Tabla 3: Componentes del Medio Mineral MSM**

Sustancia	Masa Adicionada
$K_2HPO_4$	2,75 g
$KH_2PO_4$	2,25 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,2 g
$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$	0,02 g
$CaCl_2$	0,01 g
NaCl	0,1 g
Fenol	( *)

( \*) Se adicionará la cantidad de fenol que sea requerida para la experiencia.

Fuente: Abd-El Hallem y colaboradores (2003)

**Tabla 4: Componentes del Medio Mineral SW**

Sustancia	Masa Adicionada
$K_2HPO_4$	40 mg
$KH_2PO_4$	10 mg
$(NH_4)_2SO_4$	50 mg
$KNO_3$	25 mg
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	25 mg
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	2 mg
$CaSO_4$	0,01 g
Fenol	( * )

( \* ) Se adicionará la cantidad de fenol que sea requerida para la experiencia.

Fuente: Abd-El Hallem y colaboradores (2003)

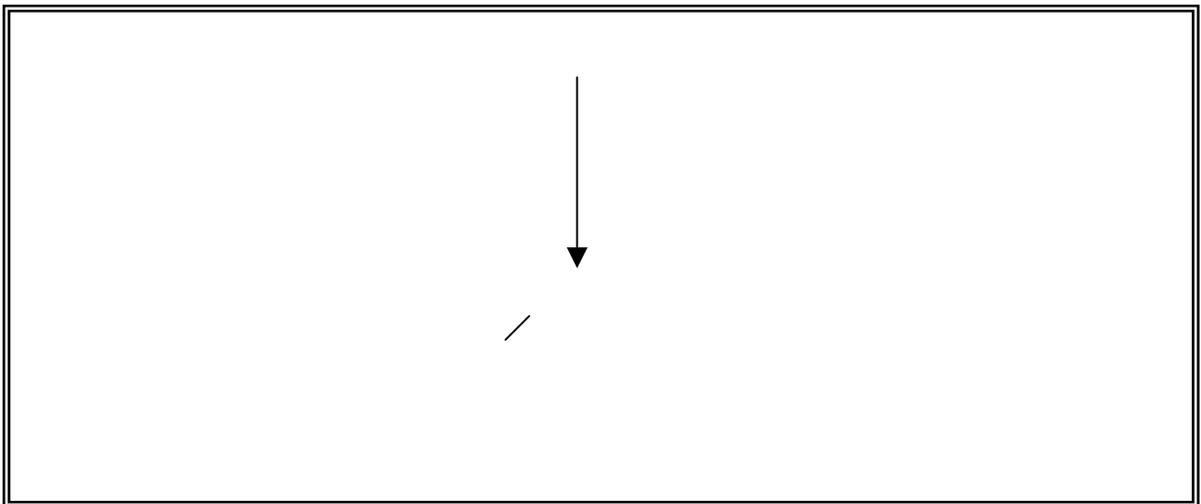
En 2005, Concha y col. obtuvieron una remoción del 21,67 % en un reactor de dos fases con una alimentación de 234 mg/L utilizando *Pseudomonas sp.* inmovilizadas sobre partículas de nylon.

#### **1.4.1.- INMOVILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS UTILIZANDO NYLON COMO SOPORTE.**

Las técnicas de inmovilización de microorganismos por enlace covalente en nylon activado han sido ampliamente estudiadas debido a la naturaleza no tóxica del soporte, su bajo costo, buena resistencia mecánica, las diferentes formas de presentación en mercado (mallas, pastillas, tubos y polvo) y al hecho de ser inertes bajo las condiciones utilizadas en los procesos de biotratamiento (Spagna y col. 1994). El tratamiento de nylon para su posterior uso en la inmovilización de células, generalmente involucra dos pasos; el primero de ellos consiste en una alquilación o

una hidrólisis del esqueleto poliamídico del nylon con el fin de liberar en él grupos capaces de enlazar con reactivos bifuncionales (aldehídos mayoritariamente) que se emplearán durante el segundo paso de la preparación de este soporte.

Para la activación del nylon como un paso previo en la inmovilización de deferentes enzimas (tripsina, pepsina y papaina), Goldstein y col. (1974), realizaron la hidrólisis de nylon 6 en polvo para lo cual emplearon ácido clorhídrico 3 M que hicieron reaccionar con 0,5 g de nylon suspendido en una fiola. Sus resultados permitieron evaluar la influencia del tiempo de reacción sobre el grado de carboxilación del nylon (eficiencia de la reacción). En efecto, al cabo de 5 h el contenido carboxilo era de 65  $\mu\text{mol/g}$  nylon, mientras que para 20 h era de 100  $\mu\text{mol/g}$  nylon. Estos investigadores indicaron que el tiempo óptimo de hidrólisis era de 14 h, lapso que se obtiene cuando se ha alcanzado el extremo de la porción lineal de la curva de saturación, correspondiendo este valor a 70  $\mu\text{mol/g}$  nylon. Ellos describieron la reacción del nylon con el ácido de la siguiente forma:



**Figura 4: Hidrólisis del Nylon**

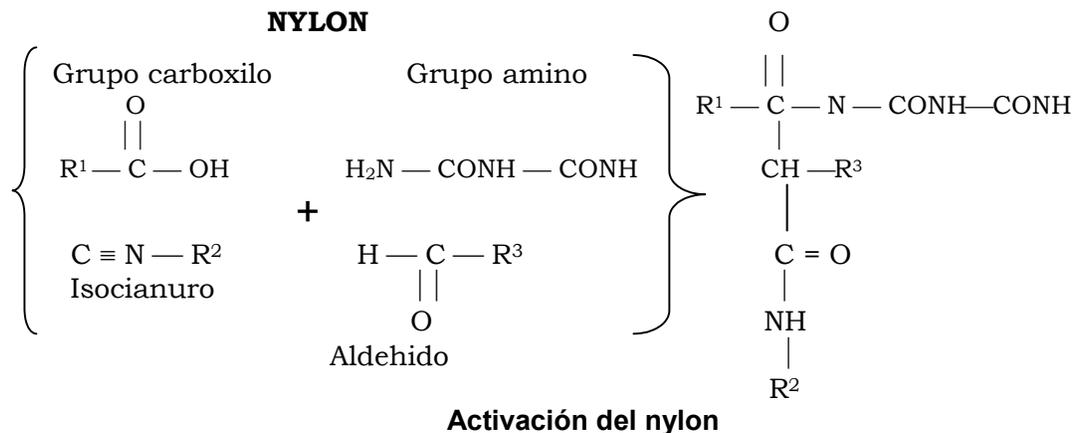
Fuente: Goldstein y col. (1974)

Un comportamiento en la hidrólisis similar al descrito en el trabajo anterior también sugieren Andrews y col., (1991) como resultado de sus investigaciones en la

inmovilización de  $\beta$ -glucosidasa sobre nylon. En este trabajo se llevó a cabo la hidrólisis de piezas de nylon en ácido clorhídrico 3 M y la eficiencia de la reacción se determinó en función de la cantidad de enzimas enlazadas en el nylon. Los resultados mostraron que después de 30 min la generación de “sitios activos” (grupos carboxilos) en el nylon era mínima para el esfuerzo realizado, lo que implicaba una disminución en la tasa de reacción del nylon con el ácido.

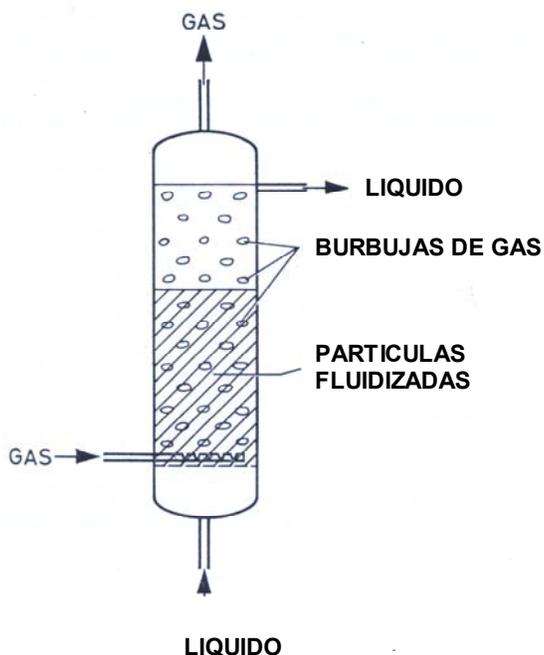
Wipple y col., (1974) encontraron que las condiciones óptimas para la activación del nylon eran someterlo a tratamiento con 18,5% p/v de glutaraldehído diluído en buffer pH: 9,00 durante 15 min a 90°C. Para alcanzar estos resultados, estudiaron el efecto de la concentración del glutaraldehído, el período de incubación, la temperatura y el pH de la solución en la etapa de activación del nylon. La eficiencia de la experimentación se obtuvo a partir de la cuantificación de la actividad de la enzima inmovilizada. En su trabajo señalan que a bajos valores de pH no se favorece una reacción controlada sobre la superficie del nylon. En cuanto a la temperatura indican que la concentración de glutaraldehído en una solución acuosa es dependiente de la temperatura, y señalan que el porcentaje de glutaraldehído libre en una solución se eleva de 4% a una temperatura de 23°C hasta 70% para 70°C.

Este compuesto, el glutaraldehído, ha sido utilizado por diversos investigadores en la activación del nylon (Andrews y col., 1991, Inman y col., 1972) debido a su naturaleza bifuncional capaz de reaccionar con poliamidas y subsecuentemente con enzimas o células. Puede también usarse como espaciador reduciendo la interacción de la superficie del soporte con la célula y con el sustrato (Spagna y col. 1994). Salleh (1982) activó tubos de nylon con este reactivo para la inmovilización de glucosa oxidasa, encontrando que la reacción del soporte con el glutaraldehído depende mayoritariamente de la temperatura. El segundo paso puede representarse en la Figura 5



**Figura 5: Activación del Nylon**  
Fuente: Goldstein y col. (1974)

### 1.5.- FLUIDIZACIÓN EN UN REACTOR DE TRES FASES.



**Figura 6: Reactor de 3 fases**  
Fuente: Østergaard, (1971)

Østergaard, (1971) indicó que la expresión de fluidización de tres fases es usada para describir el proceso a través del cual unas partículas sólidas son fluidizadas con dos corrientes de otros fluidos. La principal aplicación de este tipo de fluidización es en reacciones catalíticas, donde las burbujas del gas y las gotas del líquido envuelven la partícula sólida que conforma el catalizador. A nivel industrial esta técnica es usada en muchos procesos; entre los más significativos se pueden nombrar: la hidrogenación de fracciones petroleras, la hidrogenación de grasas no saturadas, el hidrocrackeo y la desulfuración, entre otras.

El líquido es una fase continua, mientras que el gas se presenta de manera discontinua (burbujas). El comportamiento hidrodinámico de un reactor de tres fases posee varios parámetros clave que pueden distorsionar su comportamiento como por ejemplo el peso de las partículas sólidas a fluidizar, el caudal del líquido, el caudal del gas, la expansión del lecho (volumen), la porosidad del lecho y el tamaño de las burbujas del gas, por nombrar las más importantes. Las características de la burbuja del gas están muy influenciadas por el diámetro del orificio del distribuidor de este fluido, el número de Reynolds presente en el movimiento del fluido y el caudal con que es inyectado.

Cuando la velocidad con que es inyectado el gas es muy baja suele ocurrir la coalescencia de las burbujas, lo que ocasiona que estas se unan formando burbujas más grande y en el lecho particulado se formen canales preferenciales de paso por desigual distribución del gas. Stewart y col., (1964) demostraron que la columna de burbujas de gas en un lecho fluidizado por gas-líquido tienden a coalescer muy cerca de su distribuidor comenzando el lecho, por lo que esta alta tasa de burbujas coalescentes en un lecho de partículas sólidas pequeñas de baja densidad puede ser interpretado como el mismo efecto ejercido por un fluido de alta viscosidad. Østergaard, (1966) en Østergaard, (1971) estudió la frecuencia de las burbujas en un reactor y como el tamaño de las mismas afecta la porosidad del lecho, usando 48 kilos de arena con una densidad de  $2,62 \text{ g/cm}^3$  y un diámetro promedio de grano de 0,64 mm. La expansión del lecho es un punto de vital importancia en el fenómeno de fluidización; ya que de este va a depender el volumen del mismo y el tiempo de residencia o contacto que exista entre las partículas sólidas de los fluidos inyectados.

La expansión del lecho se logra simplemente con un aumento de la velocidad del fluido; pero la fluidización incipiente de un lecho se puede definir como el movimiento de las partículas sólidas del lecho que generan su máxima porosidad y donde la caída de presión a lo largo del lecho es equivalente a la fuerza neta ejercida

por el efecto de la gravedad sobre las partículas que conforman el lecho. Pero Østergaard, (1966) en Østergaard, (1971) estudiando la expansión de un lecho observó un fenómeno de compresión del mismo basado en el incremento de la velocidad del gas que causaba una reducción considerable del volumen ocupado por el lecho por efecto de presión.

Bruce y col. (1974), evaluaron un reactor de tres fases, estudiando la influencia de la relación del flujo de gas (aire), el del líquido (agua) sobre el diámetro de la burbuja de gas producida. Como lecho sólido utilizaron esferas de vidrio y evaluaron la influencia de diferentes tipos de diámetros de partículas (2, 4, 6 y 8 mm). A lo largo de la experimentación, el lecho fue primero fluidizado con el líquido y posteriormente se permitió el paso del gas a través de la zona de distribución. Ellos concluyeron que:

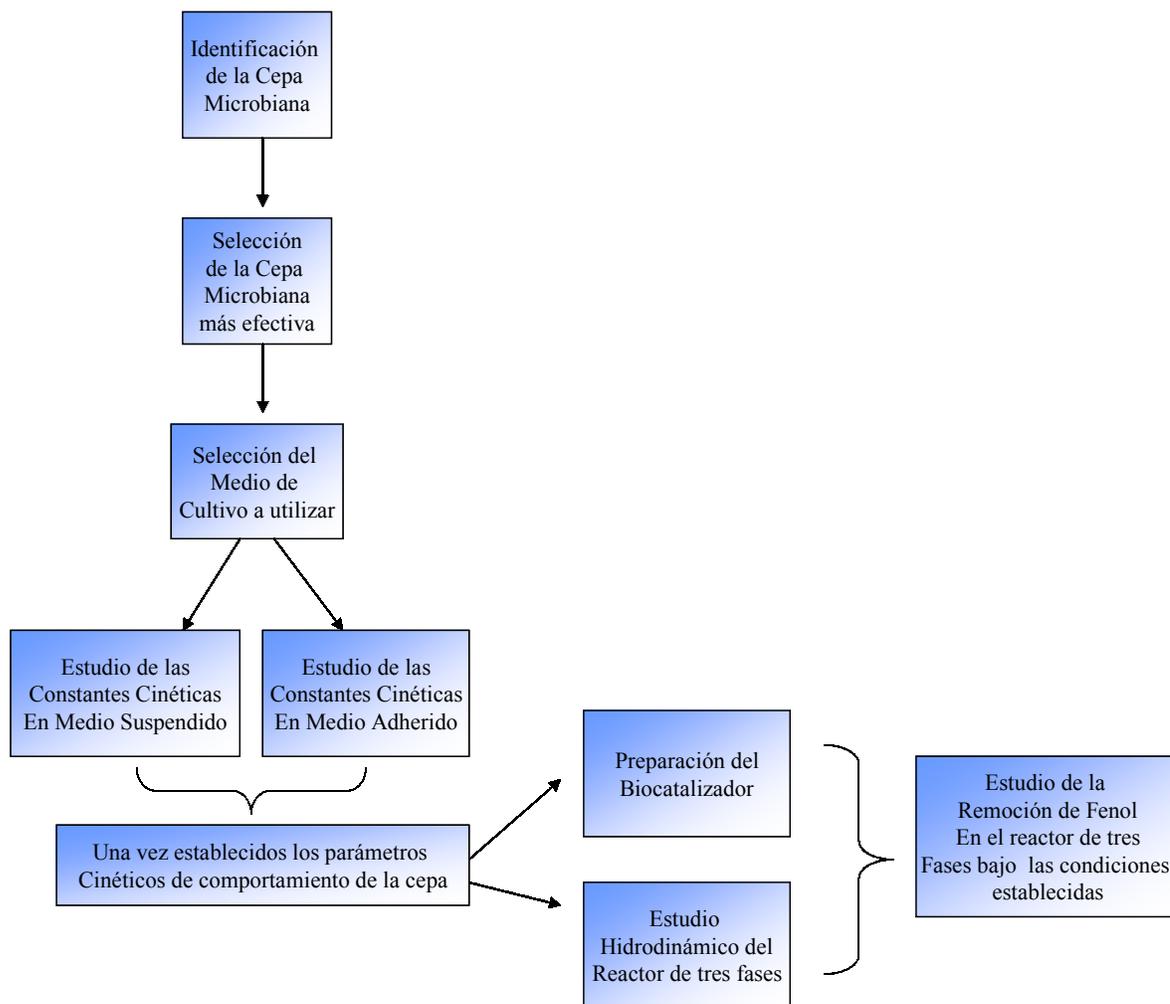
- La porosidad del lecho fluidizado de tres fases se reduce cuando se utilizan partículas de 2 mm de diámetro y la velocidad de flujo líquido es menor a 13,10 cm/s, independiente del flujo de gas.
- Con un flujo de líquido constante y a una dada velocidad del aire, el diámetro de la burbuja que emerge del lecho alcanza un mínimo en la medida que el diámetro de la partícula sólida aumenta.
- Cuando el lecho está constituido por partículas de 2 – 4 mm de diámetro y para una velocidad constante del gas, el tamaño de la burbuja que emerge del lecho disminuye cuando se incrementa la velocidad del líquido; sin embargo para partículas mayores (6 a 8 mm) a velocidad del aire constante el diámetro de la burbuja disminuye en la medida que la velocidad del líquido aumenta.
- A un dado flujo de líquido y cuando se emplean partículas de 2 mm de diámetro, el tamaño de la burbuja que emerge del lecho es independiente del flujo de aire.

Richards y col. (1983), utilizaron este tipo de reactor, con un distribuidor cónico, inmovilizando una población bacteriana principalmente de *Pseudomonas sp.* sobre partículas de carbón, las cuales se fluidizaron con una corriente de líquido que contenía aproximadamente 0,1 g/L de fenol. Como corriente de gas se utilizó oxígeno. Ellos indicaron que la degradación de fenol por los microorganismos inmovilizados, en un proceso por carga, a nivel de frascos bajo agitación, respondía a una cinética de primer orden dependiente de la concentración de fenol a elevadas concentraciones de oxígeno ( $P_{O_2} = 1 \text{ atm}$ ); y a una cinética de orden cero a bajas concentraciones de fenol y  $P_{O_2} \leq 0,2 \text{ atm}$ .

Los datos cinéticos por ellos obtenidos responden a un modelo de inhibición competitiva. El reactor fue matemáticamente descrito como uno de mezcla completa con limitaciones para la transferencia de masa de oxígeno de la fase gas a la líquida y los resultados experimentales comprueban esta hipótesis. El análisis de la concentración de fenol en muestras líquidas obtenidas a lo largo del eje axial del reactor, demostraron que no existía gradiente en la concentración de fenol y por lo tanto concluyeron que se cumplía la suposición teórica adoptada en el modelaje teórico. La tasa de degradación de fenol fue definida como la variación en la concentración de fenol entre la entrada y salida del reactor dividida entre el tiempo de residencia del líquido en el lecho. Los valores correspondientes a dicha tasa, a lo largo de 10 días de operación continua del reactor con una tasa de alimentación de líquido promedio de 0,291 l/min (4,85 mL/s) fue de aproximadamente 22,02 ppm/min.

## CAPITULO 2: MATERIALES, EQUIPOS Y MÉTODOS UTILIZADOS

En la Figura 7 se presentan esquemáticamente las etapas de la investigación; que incluye: la selección de la cepa, del medio, determinar las constantes cinéticas de la cepa microbiana seleccionada, establecer el comportamiento de la cepa inmovilizada a nivel de frascos en un medio a distintas concentraciones de fenol como única fuente de carbono. Seguidamente, evaluar la cepa seleccionada inmovilizada en partículas de nylon 6 en un reactor de tres fases a ser utilizado para la biodegradación de fenol en las condiciones de operación establecidas.



**Figura 7: Esquema General de las Etapas de Experimentación**

## 2.1.-REACTIVOS UTILIZADOS

En la Tabla 5 se resumen los reactivos utilizados; su grado de pureza, el proveedor y su utilización durante la etapa experimental.

**Tabla 5: Lista de Reactivos Utilizados**

Reactivo	Grado de Pureza	Proveedor	Aplicación
Almidón	Bacto	Merck	Estandarización de una Solución de Fenol
Ácido Sulfúrico	95 %	Fisher	
Bromato de Potasio	99,5 %	Riedel de Haen	
Bromuro de Potasio	99,5 %	Merck	
Dicromato de Potasio	99,8 %	Riedel de Haen	
Hidróxido de Sodio	98 %	Analar	
Yoduro de Potasio	99,5 %	Riedel de Haen	
4-aminoantipirina	99 %	Riedel de Haen	Determinación de la Concentración de Fenol
Cloruro de Amonio	99,5 %	Riedel de Haen	
Ferricianuro de Potasio	99 %	Riedel de Haen	
Hidróxido de Amonio	30 %	Fisher	
Fosfato de Potasio Dibásico	97 %	Riedel de Haen	Medio de Cultivo
Fostato de Potasio Monobásico	99,4 %	Riedel de Haen	
Sulfato de Amonio	99 %	Fisher	
Nitrato de Potasio	99 %	Fisher	
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	99,5 %	Analar	
Sulfato de Hierro III Heptahidratado	99 %	Riedel de Haen	
Sulfato de Calcio	99 %	Fisher	
Cloruro de Magnesio Hexahidratado	99,5 %	Riedel de Haen	
Cloruro Ferrico Hexahidratado	99 %	Riedel de Haen	
Cloruro de Calcio	99 %	Riedel de Haen	
Extracto de Levadura		Difco	Medio de Cultivo Enriquecido
Cloruro de Sodio		Riedel de Haen	
Peptona		Fisher	
Acido Clorhídrico	37 %	Riedel de Haen	Hidrólisis y Activación del Nylon
Acido Bórico	98 %	Riedel de Haen	
Borato de Sodio	99 %	Riedel de Haen	
Glutaraldehído	25 %	Sigma	
Agar – Agar	Bacto	Difco	Conservación del Microorganismo
Nylon (partículas cilíndricas de 2,76 mm de altura y 2,68 mm de diámetro aprox.)	6	Flexilón	Soporte

## 2.2.-EQUIPOS UTILIZADOS

La Tabla 6 detalla los equipos utilizados a lo largo de la experimentación, así como su descripción y uso.

**Tabla 6: Lista de Equipos Utilizados**

Equipo	Descripción	Uso
Agitadores Orbitales – Incubadores con Control de Ambiente (2)	New Brunswick Scientific. Modelo G-24 y G – 25R	Crecimiento del Microorganismo. Control de Temperatura en la activación e hidrólisis del nylon
Autoclave	All American. Modelo 25 X	Esterilización
Balanza	Mettler	Preparación de soluciones. Pesada del Nylon
Bomba de Succión	Little Giant	Recirculación de agua a la camisa del reactor
Bombas Peristálticas	Cole – Parmer. Modelo E650MG	Alimentación de reactor
Calentador de Agua	Tecam. Modelo Tempette TE-7	Control de la temperatura en el reactor
Centrífuga de Laboratorio	Sorvall Instruments. Modelo GLC-4	Separación Sólido – líquido
Controles indicadores de Bombas Peristálticas	Cole-Parmer. Modelo Master Servodyne	Control e indicador de las bombas peristálticas
Espectofatómetro de Luz Visible	Genesys	Análisis Colorimétrico
Medidor de Flujo Gaseoso	Precision Scientific. Modelo Wet Test Meter GCA	Calibración del medidor de aire
Medidor de pH digital	Orion Research	Medición de Ph

### **2.3.-SELECCIÓN, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO EMPLEADO.**

Se evaluaron dos cepas de microorganismos bacterianos, las cuales fueron aisladas en el Laboratorio de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Simón Bolívar. La primera de ellas era una cepa de *Acinetobacter sp.*, mientras que la segunda correspondía a *Stenotrophomonas maltophilia (Pseudomonas maltophilia o Xanthomonas maltophilia)*, (Ver Anexo 1). Para llevar a cabo esta evaluación, ambos microorganismos se cultivaron en un medio líquido MSM descrito en la Tabla 3, Sección 1.4, Capítulo 1, pág. 28.

Se realizaron dos corridas comparativas por triplicado entre ambas cepas microbianas en medio MSM con una concentración inicial de 323,67 ppm de Fenol. Cada corrida consta de 7 fiolas de 250 mL que contienen 80 mL del medio mineral MSM, se inoculan con una relación de volumen 10% de inóculo adaptado a las concentraciones de fenol de 250 ppm y una edad de 48 horas. El contenido de las fiolas se mantienen a una temperatura constante de 30 °C y una agitación orbital de 200 rpm. Al contenido de cada fiola a analizar se le mide concentración de fenol, pH y la biomasa presente cada cuatro horas. Para la medición de la concentración de fenol se utiliza el método indicado en la sección 2.3.7.2 y para la determinación de la biomasa se usa la curva de peso seco obtenida por el método indicado en la sección 2.3.6. El criterio para la selección de la cepa a emplear experimentalmente se basa en la condición de mayor biodegradación de fenol en el menor tiempo.

#### **2.3.1.- MANTENIMIENTO DE LA CEPA SELECCIONADA**

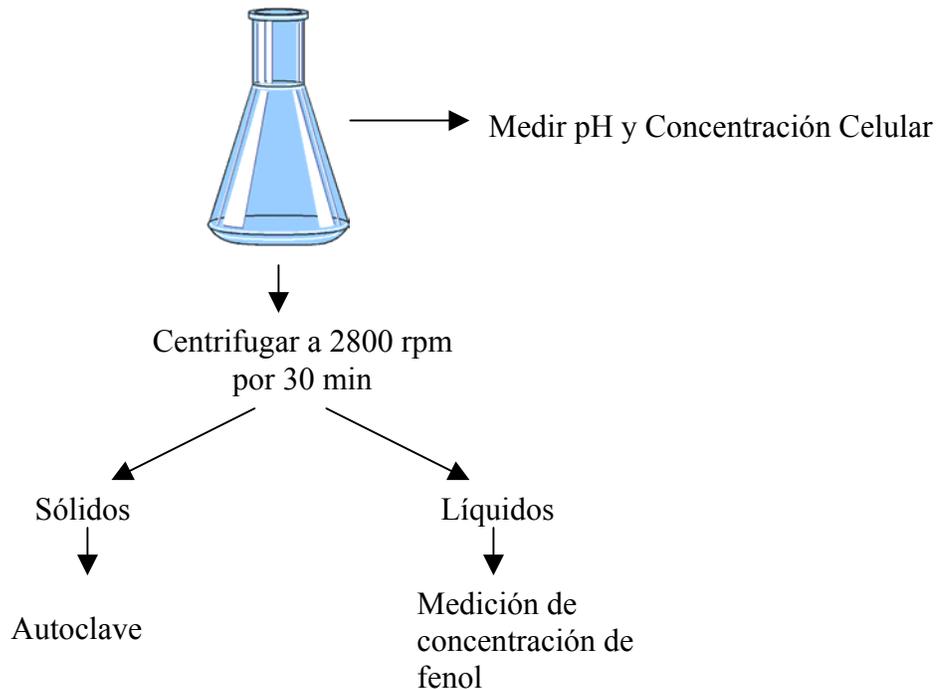
La cepa microbiana seleccionada se mantiene, inoculándola cada 2 días, en una fiola de 250 mL que contiene 80 mL de un medio mineral SW (descrito en la Tabla 4, Sección 1.4, Capítulo 1, pág. 29) con 250 ppm de fenol como única fuente de carbono. Para cada inoculación, el volumen de inóculo a transferir es de 10 mL y

el contenido de la fiola se mantiene a una temperatura de 30 °C y una agitación orbital de 200 rpm.

### **2.3.2.- SELECCIÓN DEL MEDIO MINERAL A UTILIZAR EN EXPERIMENTOS A NIVEL DE FRASCOS.**

Se realizó una corrida comparativa entre el medio SW (descrito en la Tabla 4, Sección 1.4, Capítulo 1, pág. 29) y el medio MSM (descrito en la Tabla 3, Sección 1.4, Capítulo 1, pág. 28) para seleccionar el medio más adecuado a utilizar en la determinación de las constantes cinéticas de la cepa microbiana seleccionada.

En esta parte de la investigación se realizaron dos corridas por sextuplicado donde se midieron las concentraciones de fenol, pH y biomasa presentes cada cuatro horas. Cada corrida se realiza en 7 fiolas de 250 mL con 80 mL del medio mineral a evaluar, se inocularon con una relación de volumen 10% de inóculo adaptado a 500 ppm de fenol y una edad de 48 horas. El contenido de las fiolas se mantiene a una temperatura constante de 30 °C y un agitador orbital a 200 rpm. Para medir la concentración de fenol se utiliza el método indicado en la sección 2.3.7.2 y para determinar la biomasa se usa la curva de peso seco obtenida por el método indicado en la sección 2.3.6. El tratamiento del contenido de cada fiola para las mediciones de los parámetros indicados se muestra en el esquema de la Figura 8 a continuación:



**Figura 8: Esquema de Tratamiento del Cultivo Suspendido**

### **2.3.3.- CONSTANTES CINÉTICAS DE LA CEPA MICROBIANA EMPLEADA CULTIVO SUMERGIDO A NIVEL DE FRASCOS.**

En esta etapa, se evaluaron las constantes cinéticas de la cepa seleccionada, en cultivos sumergidos por carga en un medio mineral MSM con fenol como única fuente de carbono. Las constantes cinéticas obtenidas fueron: tasa específica máxima de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) y la constante de inhibición ( $K_i$ ).

Se realizaron seis corridas por triplicado donde se determinaron concentración de fenol y biomasa cada cuatro horas. Cada corrida se realiza en 21 fioles de 250 mL con 80 mL cada una de un medio mineral MSM, inoculadas previamente con una relación de volumen 10% de inóculo adaptado a las concentraciones de fenol

estudiadas 323 ppm, 574 ppm, 733 ppm, 1.046 ppm, 1.263 ppm y 1.407 ppm respectivamente, con una edad de 48 horas.

Para ello, es necesario preparar el medio de cultivo con un  $\text{pH}_{\text{inicial}} = 7.0$ ; y mantener bajo agitación orbital de 200 rpm y una temperatura de 30 °C. A lo largo del período de experimentación es necesario cuantificar la concentración de fenol empleando el método indicado en la sección 2.3.7.2 y determinar la biomasa resultante a través del empleo de la curva de peso seco obtenida mediante el método descrito en la sección 2.3.6. El procedimiento utilizado para el análisis del contenido de cada fiola y las respectivas determinaciones de los parámetros antes indicados, se muestran en el esquema de la Figura 8.

Para cada corrida se obtuvo la velocidad específica de crecimiento graficando el logaritmo natural de la concentración de biomasa producida en función del tiempo para la fase de crecimiento exponencial del microorganismo. La tasa específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) y la constante de inhibición ( $K_i$ ) se obtuvo a partir de graficar el inverso de la velocidad específica de crecimiento en función de la concentración inicial de fenol para cada corrida.

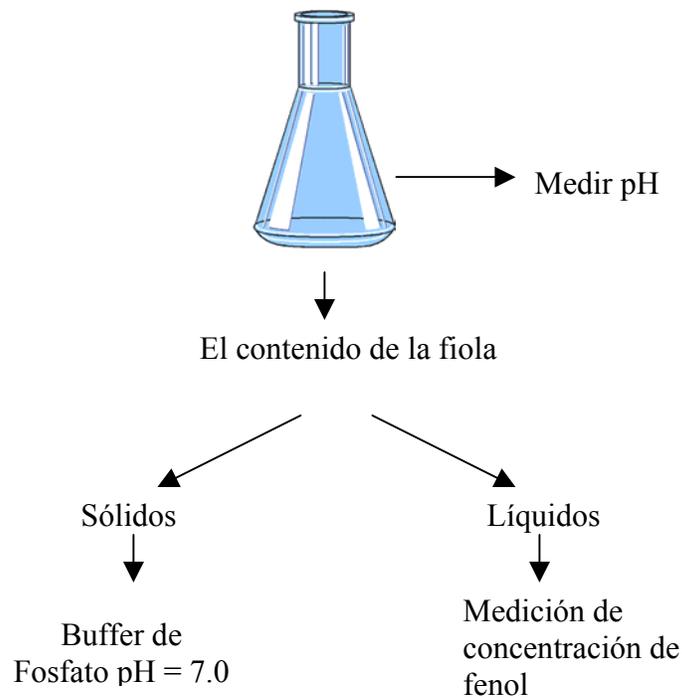
#### **2.3.4.- DEGRADACIÓN DE FENOL CON MICROORGANISMOS INMOVILIZADOS EN NYLON A NIVEL DE FRASCOS.**

Se repitió el procedimiento experimental anteriormente descrito pero con la variante de tener el microorganismo inmovilizado en nylon según el método descrito en la sección 2.4 y 2.5. Se realizó el estudio de la degradación de fenol con la biomasa inmovilizada empleando el medio mineral MSM con fenol como única fuente de carbono.

Se realizaron tres corridas por triplicado, con una concentración de fenol en el medio de 263 ppm, 522 ppm y 746 ppm como única fuente de carbono

respectivamente. Cada corrida de 21 fiolas de 250 mL, contienen 80 mL del medio MSM, con un  $\text{pH}_{\text{inicial}} = 7.0$ ; una temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una agitación orbital de 200 rpm. Se construyó una cesta de malla plásticas para cada fiola soldadas con nylon, con el fin de emular un reactor (Revel-Chion, 1975) y se coloca una masa fija de 5,5 gramos de biocatalizador de manera de garantizar el estudio en igualdad de condiciones. Este dispositivo se puede detallar en el Anexo 2. Al contenido de cada fiola se procedió a medir la cantidad de fenol remanente presente por la metodología descrita en la sección 2.3.7.2. y el pH.

El tratamiento del contenido de cada fiola para las mediciones de los parámetros indicados se muestra en el esquema de la Figura 9 a continuación:



**Figura 9: Esquema de Tratamiento de la Biomasa Inmovilizada**

### **2.3.5.- DETERMINACIÓN DE pH.**

La medición de pH de la solución presente en las fiolas se realiza a través de un medidor de pH digital marca Orion previamente calibrado.

### **2.3.6.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR.**

Se estimó la concentración celular presente en la solución analizada, con el uso de una curva de peso seco que relaciona la absorbancia de la suspensión a una longitud de onda de 660 nm con la cantidad de biomasa contenida en dicha solución. Para establecer la curva de peso seco a utilizar se sigue el siguiente procedimiento:

1. Tomar una membrana millipore 0,22  $\mu\text{m}$  y llevar a peso constante.
2. Tomar 8 fiolas de mantenimiento inoculadas con 48 horas de antelación y filtrar su contenido a través de membrana millipore 0,22  $\mu\text{m}$ .
3. Transferir la membrana y el sólido retenido a un vidrio de reloj, para poder realizar un secado en una estufa a 60 °C.
4. Esperar que se enfríe y pesar. Llevar a peso constante el mismo para garantizar que toda la humedad se ha retirado de la muestra.
5. Realizar la diferencia de peso entre el papel de filtro con la biomasa y el papel de filtro llevado a peso constante y obtener la cantidad de biomasa inactiva disponible.
6. Resuspender la biomasa pesada en 5 mL de agua destilada.
7. Determinar la absorbancia de la solución en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.
8. Preparar diluciones 1/5; 0,8/5; 0,7/5; 0,6/5; 0,5/5; 0,4/5; 0,3/5; 0,2/5 y 0,1/5 con agua destilada para obtener absorbancia en un rango entre 0,1 y 0,8.
9. Realizar el gráfico de Densidad Óptica (absorbancia) en función de la concentración de biomasa presente en la muestra utilizada; el cual se muestra en el Anexo 3 Figura 10.

## **2.3.7.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FENOL.**

### **2.3.7.1.- ESTANDARIZACIÓN DE SOLUCIÓN DE FENOL**

Realizar la estandarización de la solución de fenol según la metodología descrita en el “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (1999) en el apartado 5530 C3-a. Por presentarse en el mercado inexistencia de bi-iodato de potasio para el momento de realización de la investigación, fue necesario sustituirlo por dicromato de potasio que cumple el mismo fin dentro de la técnica.

Cuantificar la concentración de fenol en la solución a través de una titulación por retroceso del iodo presente en la solución de dicromato de potasio, la cual se utiliza en presencia de una solución de bromuro-bromato para estandarizar la muestra de fenol. La solución de bromuro-bromato en un medio ácido produce bromo libre el cual reacciona con el anillo fenólico generando 2,4,6 tribromo fenol; de esta manera el exceso de bromo libre presente reacciona con el ioduro de potasio produciendo iodo y bromuro de potasio.

### **2.3.7.2.- DETERMINACIÓN DE FENOL POR EL MÉTODO DE 4-AMINOANTIPIRINA.**

La determinación de fenol presente en la solución sigue la metodología descrita en el “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (1999) en el apartado 5530 D.

Este método mide la capacidad de reacción del fenol con la 4-aminoantipirina en una solución de  $\text{pH} = 7,9 \pm 0,1$  en presencia de potasio hexaciano ferrato para dar un color característico, y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm.

### **2.3.7.3.- DETERMINACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN DE FENOL.**

Generar una curva de calibración de fenol partiendo de la solución de fenol estandarizada según el procedimiento descrito en el punto 2.3.7.1. Se preparan diluciones que contengan una concentración entre 0 y 5 mg/L de fenol, siendo tratadas según la metodología descrita en el punto 2.3.7.2. Seguidamente se obtiene una curva relacionando densidad óptica (absorbancia) en función de la concentración de fenol presente; la cual se muestra en el Anexo 4 Figura 11.

### **2.4.- PREPARACIÓN DEL SOPORTE.**

#### **2.4.1.- HIDRÓLISIS Y ACTIVACIÓN DEL NYLON 6.**

Siguiendo a Concha y col., (2005) se hidrolizó el nylon con una relación de 1 litro de HCl 3M por cada 33,34 gramos de soporte (nylon 6), los cuales debieron someterse a 200 rpm y 30 °C durante 12 horas. Una vez hidrolizado el soporte; el mismo se lava por triplicado con una solución de buffer de borato pH = 9,0 para neutralizar su pH en una relación de 50 ml de buffer por cada 33,34 gramos de nylon tratado.

Seguidamente, para su activación se trataron cada 33,34 gramos del mismo con 250 mL de glutaraldehído 12 % v/v diluido con buffer de borato pH = 9,0 ± 0,1. Esta mezcla se agitó a 200 rpm durante una hora a 54 °C. Luego se lavó el soporte preparado con buffer de fosfato por un espacio de 10 minutos para retirar cualquier exceso de glutaraldehído presente.

## **2.5.- INMOVILIZACIÓN DE LA BIOMASA.**

### **2.5.1.- CULTIVO DE LA BIOMASA A INMOVILIZAR**

Se emplea un medio LB constituido por 5 gr. de extracto de Levadura, 10 gr. de NaCl y 10 gr. de Peptona por litro de solución (Abd-El Hallem y col., 2003) a un  $\text{pH}_{\text{inicial}} = 7,0 \pm 0,1$  para cultivar la cepa seleccionada, a una temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y agitado a 200 rpm por un lapso de 10 horas.

Una vez generada la biomasa se centrifuga el contenido del medio mineral, se descarta el sobrenadante y se resuspende el material celular en 2 litros de una solución buffer de fosfato de sodio de  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$  previamente esterilizado; luego se determina la concentración celular inicial a través de la curva de peso seco descrita en el punto 2.3.6.

### **2.5.2.- INMOVILIZACIÓN DE LA BIOMASA EN EL SOPORTE**

Para inmovilizar la biomasa generada en el punto 2.5.1 se coloca el soporte activado en el reactor (mostrado en el Anexo 5) según el método descrito en el punto 2.5.1. Se recircula la solución buffer de fosfato de sodio con la suspensión de la biomasa empleando un flujo de 120 mL/min a una temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 48 horas.

Determinar la concentración celular de la suspensión remanente para evaluar la cantidad de microorganismos inmovilizados por área superficial disponible de soporte. Luego lavar el soporte con buffer de fosfato de sodio  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$  previamente esterilizado con el fin de remover los microorganismos que hayan quedado libres.

Llenar el reactor con medio mineral MSM de 750 mg/L de fenol dejándola en reposo por 12 horas para propiciar la adaptación del cultivo microbiano obtenido a las nuevas condiciones de operación. Seguidamente lavar el contenido del reactor con buffer de fosfato de sodio  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$  previamente esterilizado.

## **2.6.-BIODEGRADACIÓN DE FENOL A TRAVES DE MICROORGANISMOS INMOVILIZADOS EN UN REACTOR DE LECHO FLUIDIZADO DE TRES FASES.**

Para evaluar la eficiencia en la remoción de fenol del reactor de tres fases, primero se establecieron las condiciones hidrodinámicas de operación y luego se estudió el comportamiento del reactor bajo las condiciones previamente establecidas.

### **2.6.1.- ESTUDIO HIDRODINÁMICO DEL REACTOR**

En esta etapa se realizaron las pruebas hidrodinámicas evaluando la influencia, tanto de un distribuidor cilíndrico como un distribuidor cónico; para determinar su efecto sobre la distribución y diámetro de las burbujas de gas generadas en la parte inferior del reactor, al igual que el efecto de diferentes pesos de sólido en el lecho.

El distribuidor cilíndrico fue construido con lámina de acero inoxidable 316, con diámetro interior de 7,7 cm y una altura de 19,9 cm; en cambio, el distribuidor cónico, también de acero inoxidable, tenía un diámetro interno máximo de 7,7 cm y un diámetro interno mínimo de 1,27 cm. Una representación esquemática de los mismos se incluye en el Anexo 6, Figura 12. A lo largo de la evaluación estos distribuidores se rellenaron con malla tejida de acero inoxidable con la finalidad de obtener una distribución uniforme del flujo del líquido a la entrada del reactor. Para la inyección de la fase gaseosa (aire) se utilizó una tubería de acero inoxidable 316 de

¼” de diámetro terminada en una aguja, la cual estaba colocada justo a la entrada del reactor.

El reactor propiamente dicho, estaba constituido por un tubo cilíndrico de vidrio de 10,16 cm de diámetro interno, una altura total (a partir del distribuidor) de 148 cm. Provisto en su parte superior de una zona de expansión de 10,16 (4 “) a 15,24 (6”) cm de diámetro interior y 20 cm de altura con una salida lateral de 2,54 cm (1”). A lo largo de su eje axial posee siete puntos de muestreo separados entre sí por una distancia de aproximadamente 20 cm. Justo en la zona de distribución como al final de la sección cilíndrica (inicio de la zona de expansión) se disponía de puntos para la conexión de un manómetro de mercurio con el fin de evaluar la caída de presión a lo largo de la zona de reacción.

En una primera instancia, utilizando el distribuidor cilíndrico y 400 g de partículas de nylon, se evaluó el funcionamiento del reactor, en términos de caída de presión, diámetro y frecuencia de aparición de las burbujas de aire a una presión de operación de 40 psig y 23,7 °C (Curva de Calibración, Figura 13, Anexo 7) y diferentes flujos de líquido (agua) controlados mediante un rotámetro (Curva de Calibración, Figura 14, Anexo 8). Es importante destacar aquí, que la fluidización del lecho (fluidización incipiente) se obtuvo utilizando el gas, al contrario de lo que normalmente se acostumbra en la operación de este tipo de reactores, dado que debían considerarse aspectos tales como: consumo del medio sintético empleado como alimentación al reactor, costos asociados al mismo, tiempo de contacto mínimo requerido entre el biocatalizador elaborado y el medio sintético, dispersión y tamaño de burbujas en el seno de la fase líquida. En una segunda etapa, se emplearon 1.000 y 2.000 gramos de sólido respectivamente y, en cada caso, se repitió la experiencia antes mencionada.

Finalizada la evaluación del distribuidor cilíndrico, se procedió a estudiar los efectos de la utilización del distribuidor cónico sobre el desempeño hidrodinámico del reactor.

A partir de los resultados obtenidos en esta etapa fue posible seleccionar las condiciones de operación a ser utilizadas en la evaluación de la biodegradación del fenol con microorganismos inmovilizados sobre el nylon, utilizado como soporte.

### **2.6.2.- EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE FENOL EN EL REACTOR DE TRES FASES**

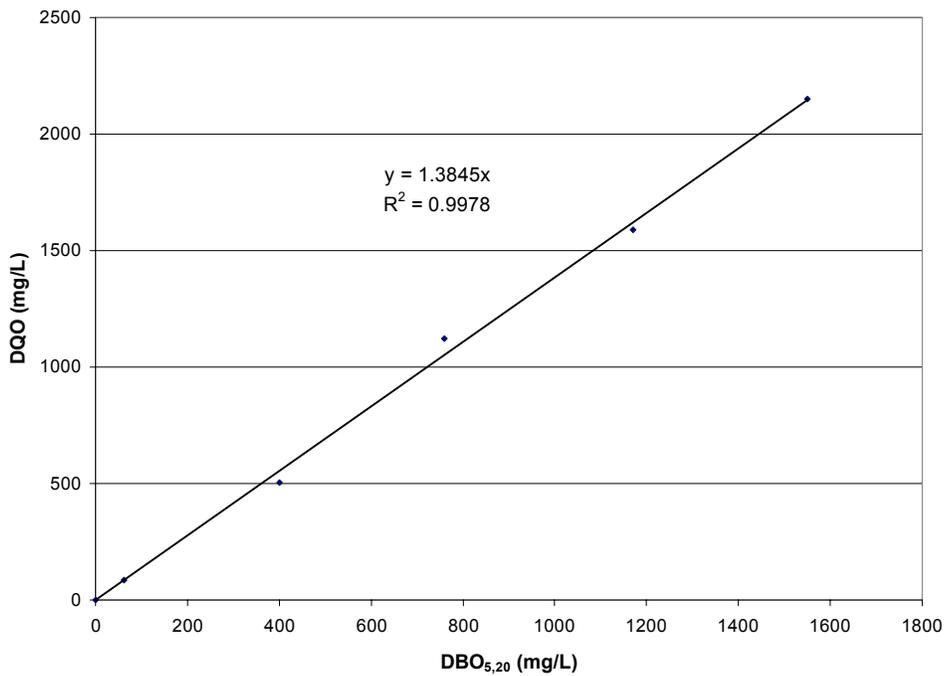
Determinados los parámetros de operación según lo establecido en el punto 2.6.1 (flujo de aire (40 psig y 23,7 °C) y flujo de alimentación), se procedió a evaluar la eficiencia de remoción del fenol utilizando 2.000 gramos de sólido sobre el cual se había inmovilizado el cultivo microbiano puro. En este caso, la fase líquida estaba constituida por el medio sintético MSM (Tabla 3, Sección 1.4, Capítulo 1, pág. 28.), en el cual el fenol era la única fuente de carbono.

La evaluación se llevó a cabo solamente durante 11 días con muestreo diario, debido a restricciones financieras para la adquisición de los reactivos necesarios para una experimentación de mayor duración.

La toma de muestras se realizó en la entrada y la salida de reactor cada 24 horas con la finalidad de determinar concentración del fenol, pH y la eventual presencia de células libres en el efluente, para establecer el porcentaje de remoción de este contaminante y la viabilidad de este método de tratamiento. En lo relativo a la detección de células libres viables, se emplearon técnicas fotométricas y de cultivo en placas de Petri.

Considerando la naturaleza sintética del efluente utilizado, se elaboraron curvas de calibración que permitieron correlacionar la Demanda Bioquímica de

Oxígeno ( $\text{DBO}_{5,20}$ ) y Demanda Química de Oxígeno (DQO) con la concentración de Fenol presente. Los análisis correspondientes a las muestras suministradas fueron realizados por el personal técnico del Laboratorio de la Planta Experimental de Tratamiento de Agua (PETA) de la Universidad Central de Venezuela. Las curvas de Calibración de  $\text{DBO}_{5,20}$  y DQO se pueden observar en el Anexo 9 Figura 15 y Anexo 10 Figura 16 respectivamente; pero a continuación se muestra la relación directa de  $\text{DBO}_{5,20}$  y DQO.



**Figura 17: Relación  $\text{DBO}_{5,20}$  y DQO de muestra sintética**

A continuación se muestra el esquema del reactor en la Figura 18:

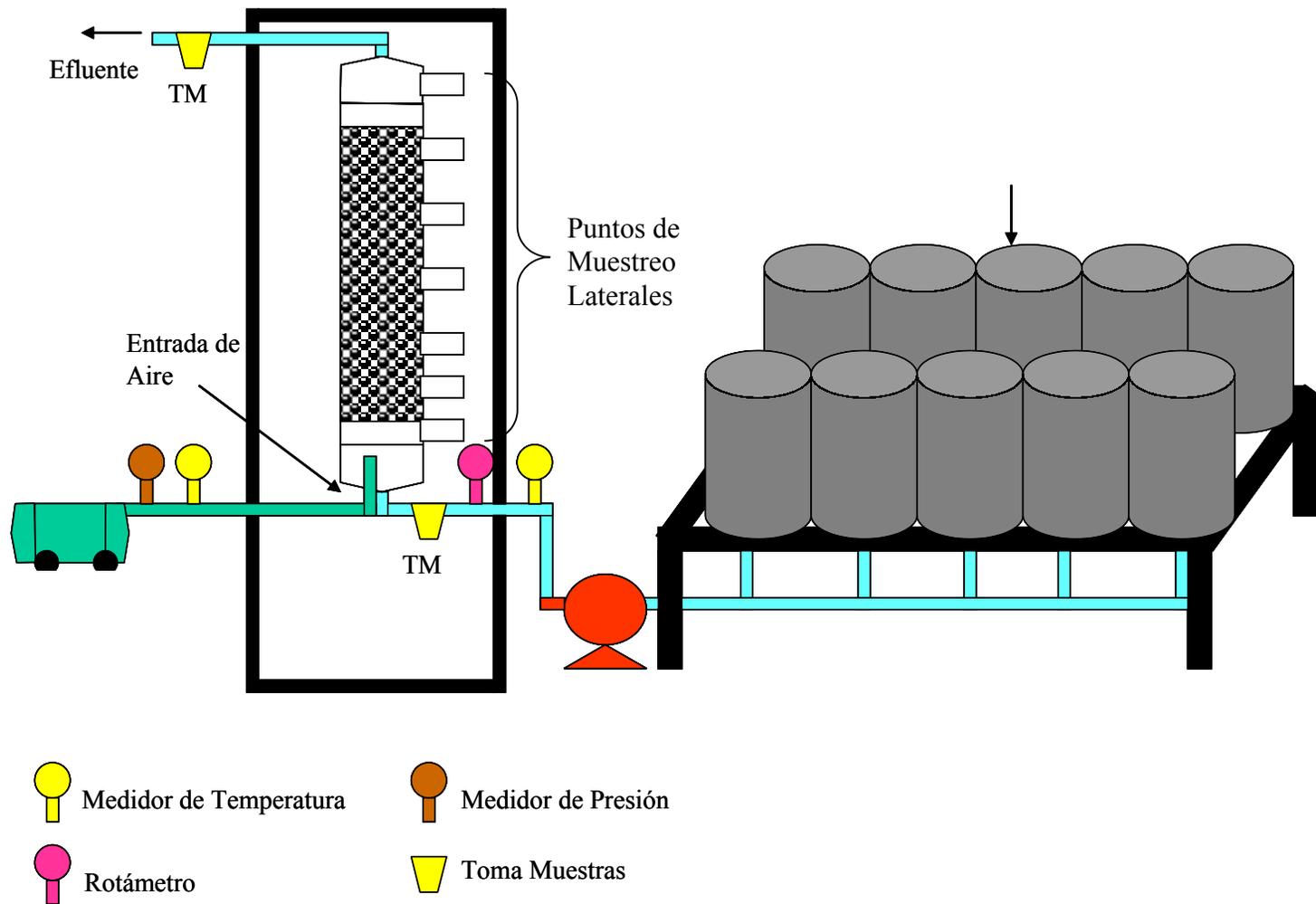


Figura 18: Esquema del Sistema de Tres Fases empleado para la biodegradación

## CAPITULO 3: RESULTADOS OBTENIDOS

### 3.1.-SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO EMPLEADO

Para la investigación se evaluó y comparó el comportamiento, en cuanto a degradación de fenol en función del tiempo, de las cepas *Acinetobacter sp* y *Stenotrophomonas maltophylia* (*Pseudomonas maltophylia* o *Xanthomonas maltophylia*). Como se puede observar en la Figura 19 la cepa de *Stenotrophomonas maltophylia*, es capaz de remover la totalidad del fenol inicialmente presente en un lapso menor que la otra cepa bacteriana. Este resultado coincide con lo señalado en varias investigaciones en cuanto a la utilización de cultivos puros y a la capacidad comprobada del género *Pseudomonas* para degradar compuestos fenólicos. Bayly y col., (1973), Yang y col. (1975), Busweil, (1975), Cabrera y col. (1981), Anselmo y col. (1985), Kotturi y col (1991), Hinteregger y col., (1992), González y col., (1992), Allsop y col (1993), Kennes y col. (1994), Nakamura y col. (2000), Amsden y col. (2003), Concha y col., (2005). En el Anexo 11 se detallan las Tablas correspondientes a la Figura 19 que se presenta a continuación:

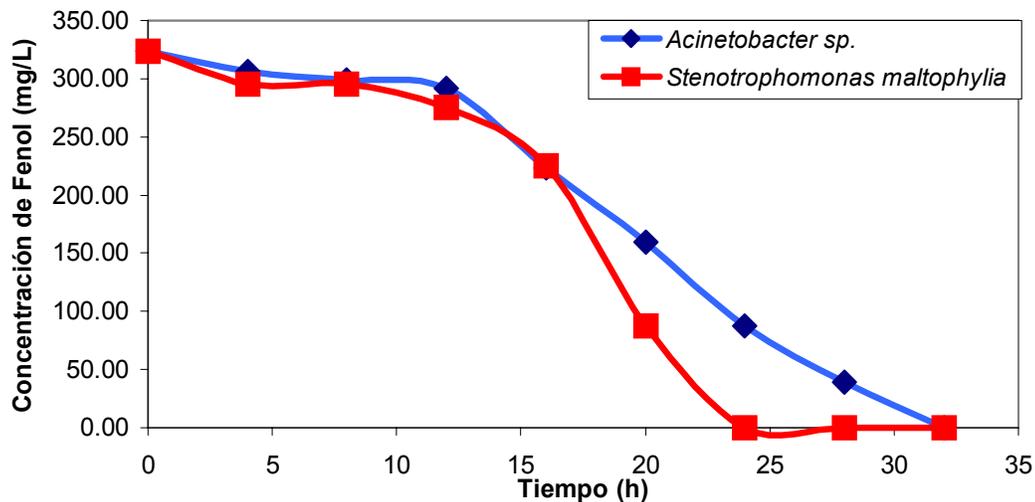
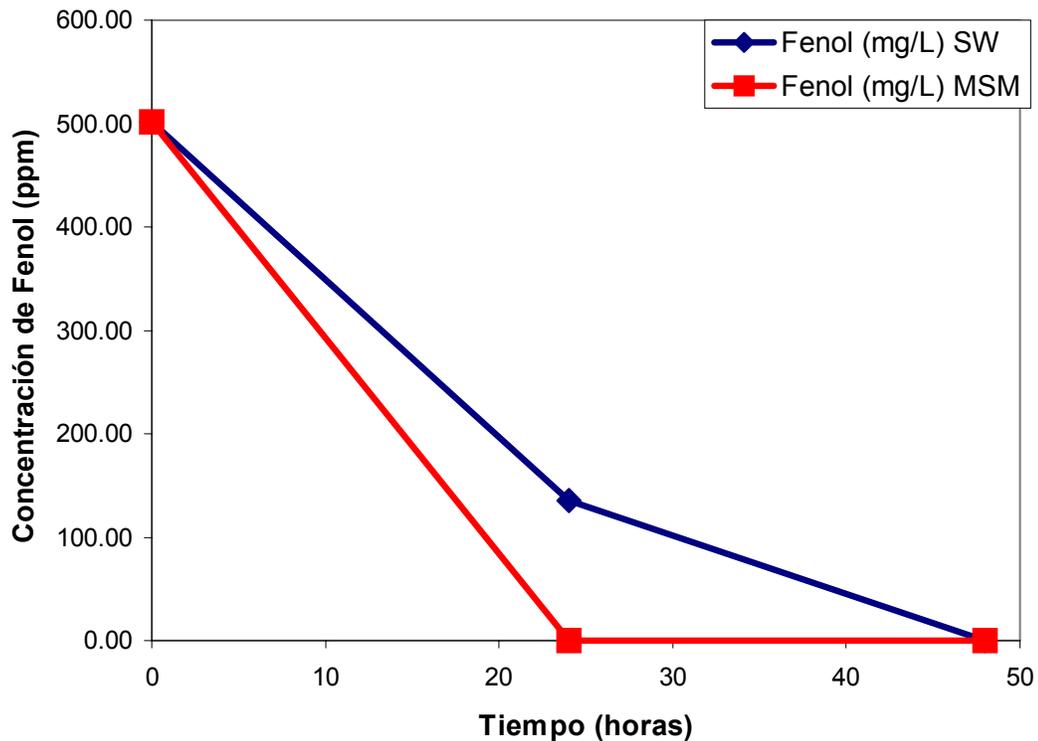


Figura 19: Degradación de Fenol para las Cepas Estudiadas

### 3.2.- SELECCIÓN DEL MEDIO MINERAL A UTILIZAR EN EXPERIMENTOS A NIVEL DE FRASCOS

Una vez seleccionada la cepa *Stenotrophomonas maltophilia*, se evaluó su crecimiento en dos medios minerales diferentes (MSM y SW; sección 1.4, Capítulo 1, Tabla 3, Pág. 28 y Tabla 4, Pág. 29.). La Figura 20 muestra como la cepa microbiana biodegrada el fenol a lo largo del tiempo, destacándose que el período utilizado para metabolizar el medio MSM es la mitad del correspondiente al medio SW. Las tablas de datos correspondientes a esa figura están incluidas en el Anexo 12.



**Figura 20: Degradación de Fenol en función del tiempo SW vs MSM**

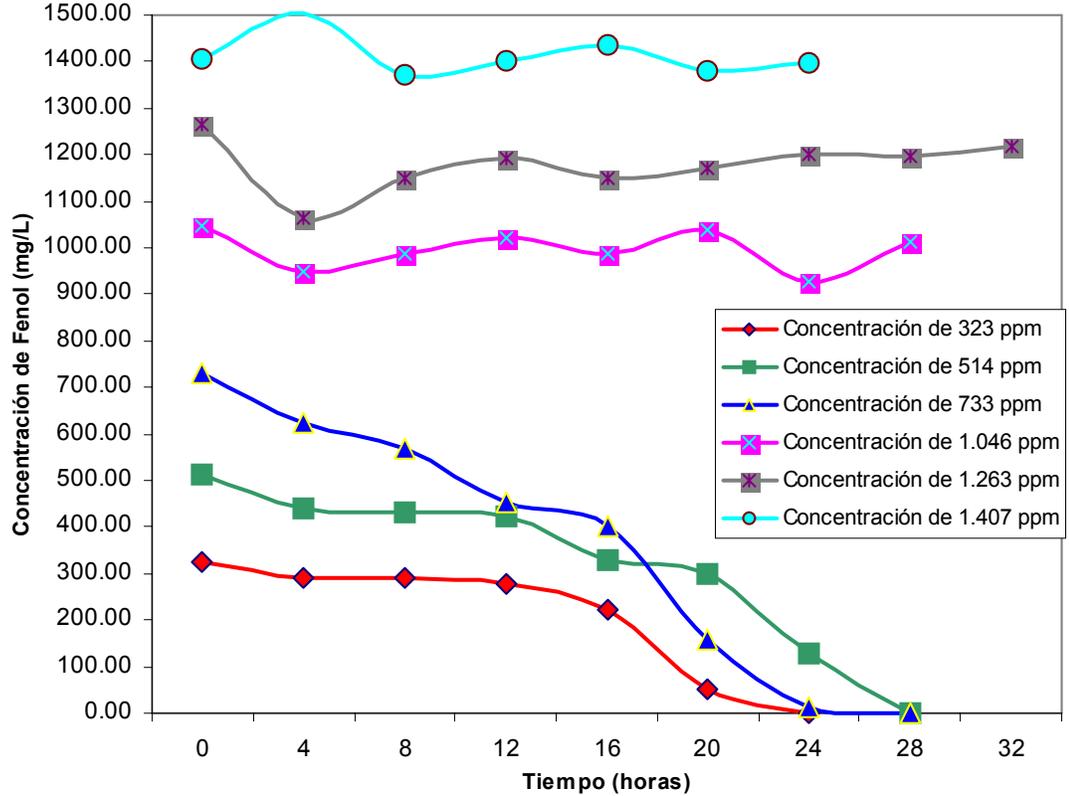
Tomando en consideración que ambos medios contienen las mismas sales y la misma concentración de fenol, podría atribuirse que este tipo de resultado es la

consecuencia de la diferencia de concentraciones de las sales que de alguna manera intervienen en el sistema metabólico de la cepa. Debido a razones de disponibilidad de reactivos se decidió preparar los inóculos en el medio SW, mientras que para el resto de la experimentación se utilizó el medio MSM.

### **3.3.- CONSTANTES CINÉTICAS DE LA CEPA MICROBIANA EMPLEADA EN CULTIVO SUMERGIDO A NIVEL DE FRASCOS**

La Figura 21 muestra como la cepa microbiana estudiada (*Stenotrophomonas maltophilia*) es capaz de degradar fenol en un 100% en concentraciones comprendidas entre 324 mg/L y 733 mg/L; pero en concentraciones mayores de este contaminante (como única fuente de carbono en el medio de cultivo) su capacidad de degradación no es detectable a lo largo del lapso estudiado, lo que parece indicar que a partir de 733 mg/L hay un efecto inhibitorio resultante de la concentración del sustrato. Resultados similares han sido obtenidos por Yang y col. (1975), Lallai y col. (1989), Kotturi y col. (1991), González y col. (1992), Allsop y col. (1993), Dikshitulu y col. (1993), y Concha y col. (2005).

En el Anexo 13 puede observarse con mayor detalle las tablas de datos promedio obtenida para cada una de las concentraciones estudiadas.

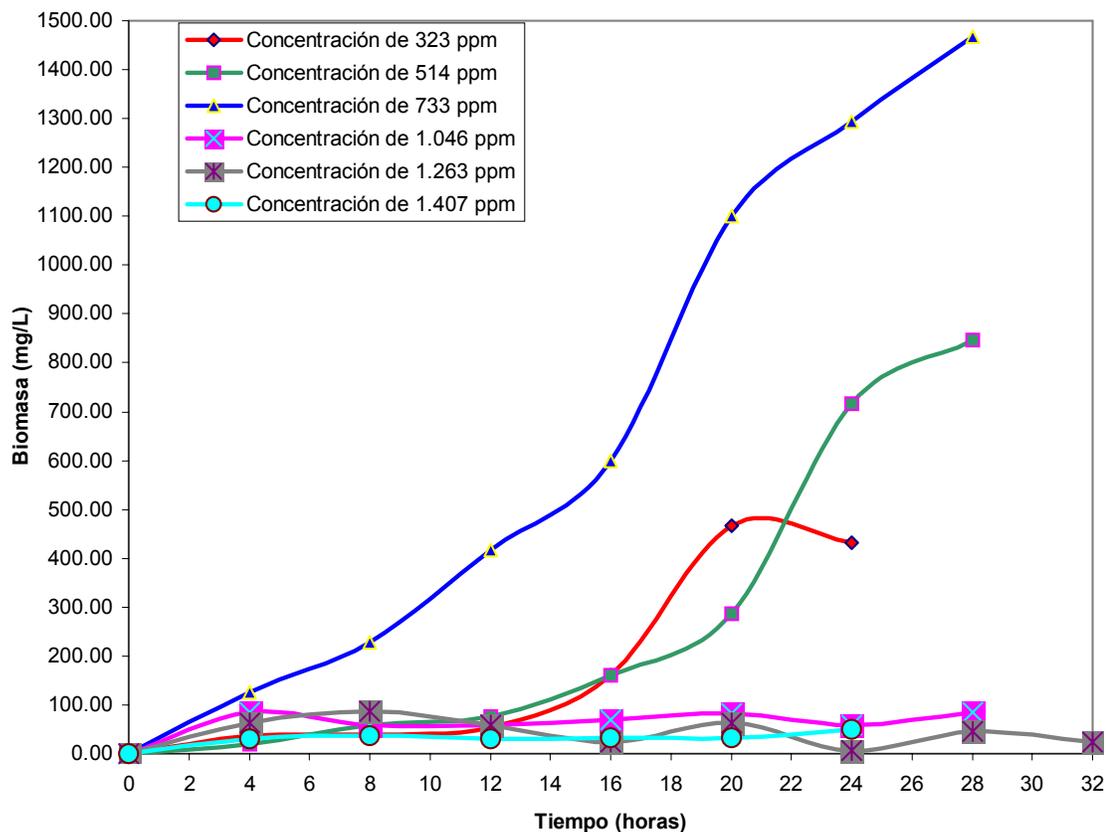


**Figura 21: Degradación de Fenol en función del tiempo para Biomasa Suspendida**

Por otra parte, en cuanto al crecimiento de la biomasa mostrado en la Figura 22 se denota las siguientes observaciones:

1. La biomasa presenta un mayor crecimiento en los medios con concentraciones de 323 ppm, 514 ppm y 733 ppm.
2. No se detectó un crecimiento microbiano en los medios en los cuales la concentración de fenol fue de 1.046 ppm, 1.263 ppm y 1.407 ppm.
3. El crecimiento neto final de la biomasa (una vez consumido todo el fenol) entre las concentraciones de 323 ppm y 733 ppm fue proporcional a la cantidad de fenol disponible para degradar.

4. La duración de la fase de latencia de este microorganismo es menor a medida que aumenta de concentración, debido a que la cepa fue adaptada a dicha concentración para el momento del experimento.

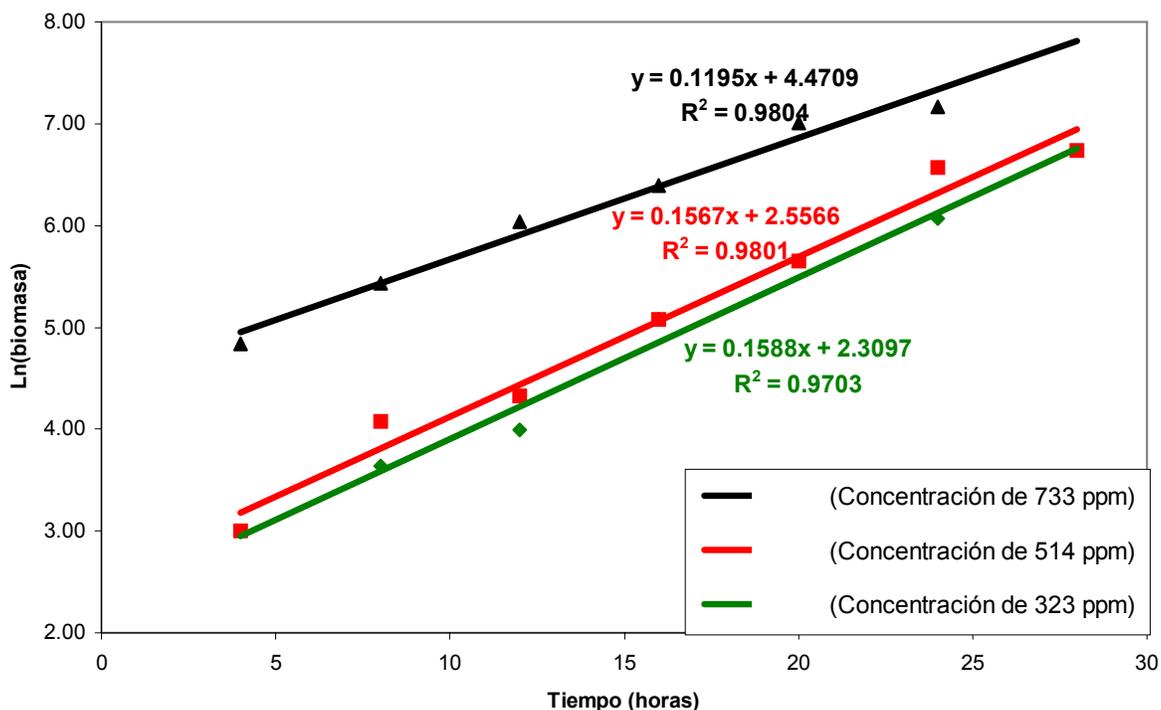


**Figura 22: Crecimiento de la Biomasa Suspendeda en función del tiempo**

Estos resultados concuerdan con el comportamiento previsto según lo indicado en la Figura 2, donde a partir de una concentración de fenol de 1.046 ppm aparece el efecto de inhibición por sustrato, y a valores cercanos a 733 ppm el microorganismo tiene una mayor afinidad por esta fuente de carbono.

La Figura 23 corresponde a la representación gráfica de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) que se obtiene de la pendiente resultante de la

correlación existente entre el Ln de la concentración celular en función del tiempo. Los resultados numéricos se detallan en la Tabla 21.



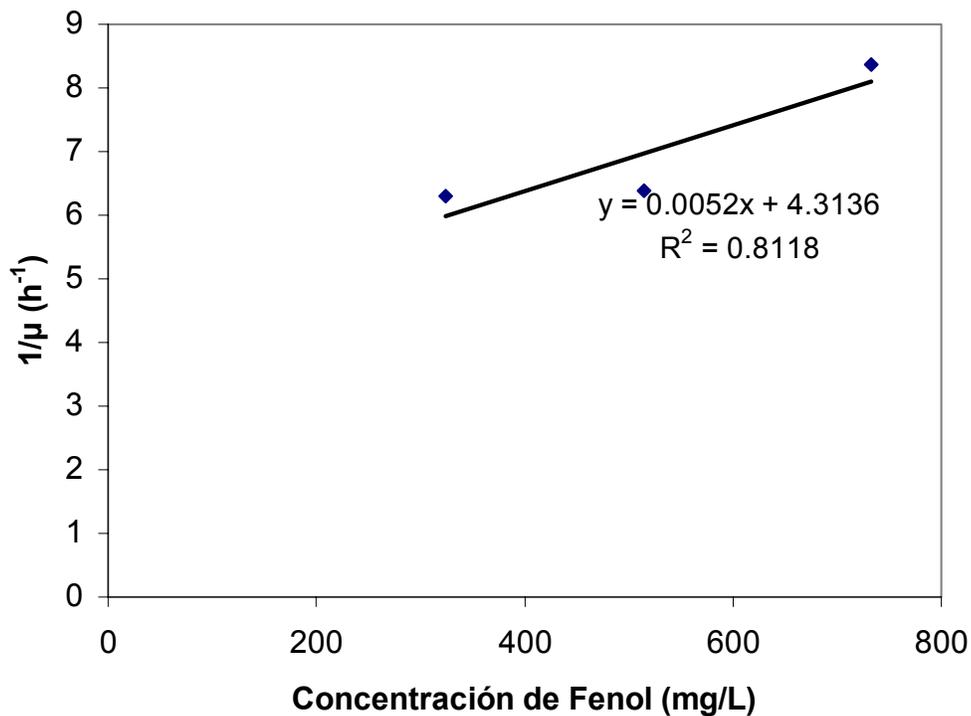
**Figura 23: Velocidad Específica de Crecimiento de la Cultivo Suspendido**

Concentración Inicial de Fenol (ppm)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )
323.67	0.1588
514.34	0.1567
732.58	0.1195

**Tabla 21: Velocidad Específica de Crecimiento Cultivo Suspendido**

Con relación a la velocidad específica de crecimiento de la biomasa, se pudo verificar que concuerda con lo señalado en la ecuación de Haldane (8) Sección 1.2 en el capítulo 1; ya que se evidencia un efecto inhibitorio del fenol sobre la cepa estudiada.

Este comportamiento de la cepa evaluada, es respaldado por los estudios simulados por Yang y col. (1975). Anselmo y col. (1985) y Allsop y col. (1993)



**Figura 24: Gráfica para Determinar las Constantes Cinéticas de Crecimiento de la Biomasa Suspendida**

De la Figura 24 se puede determinar que para un crecimiento de biomasa suspendida aproximado por la ecuación (6), la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_m$ ) fue de  $0,2318 \text{ h}^{-1}$  y la constante de inhibición  $K_i$  tuvo un valor de  $829,54 \text{ mg/L}$ , que si son comparadas con las constantes presentadas en la Tabla 22 de estudios similares, se puede demostrar que están ubicados dentro del rango de investigaciones realizadas anteriormente. El valor de  $K_i$  confirma la presencia del efecto inhibitorio en la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* luego de la concentración estudiada de  $733 \text{ mg/L}$ .

Este valor se encuentra comprendido entre otros valores que se pueden apreciar en la Tabla 22.

**Tabla 22: Constantes Cinéticas de Estudios de Biodegradación de Fenol**

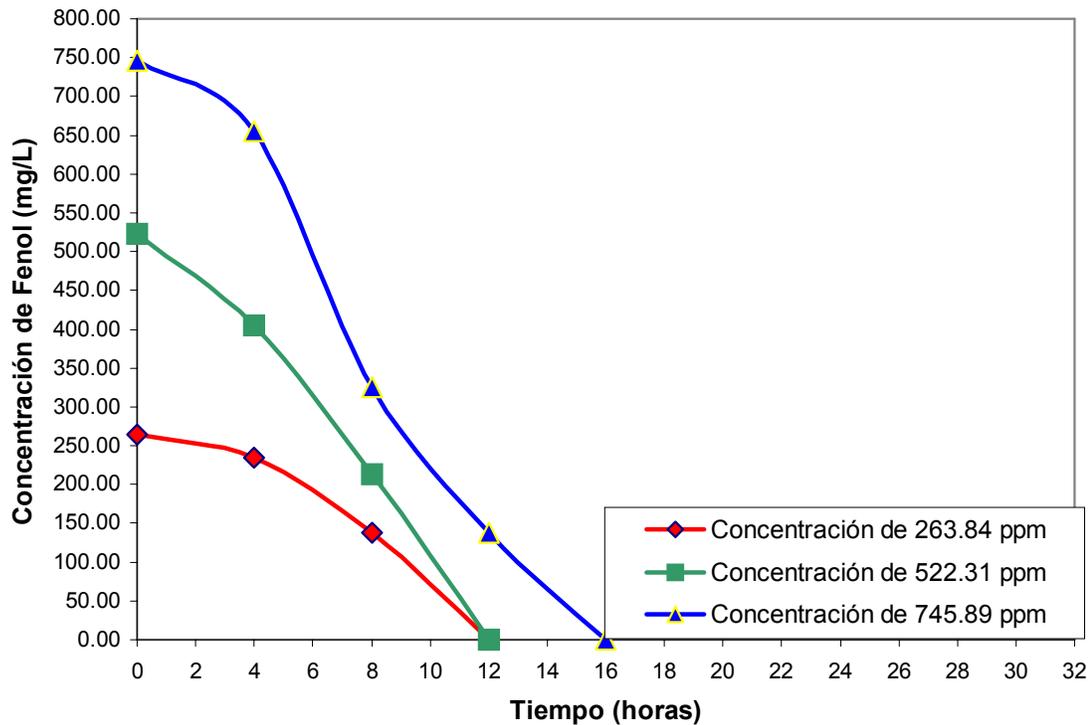
Referencia	Microorganismo utilizado	Condición	Modelo Cinético	Constantes Cinéticas
Pawlowsky y Howell (1973)	Microorganismos Mixtos	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.26 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 25.4 \text{ mg/L}$ $K_i = 173 \text{ mg/L}$
Hill y Robinson (1975)	<i>Pseudomonas putida</i>	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.534 \text{ h}^{-1}$ $K_i = 470 \text{ mg/L}$
Humphrey (1975)	<i>Pseudomonas putida</i>	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.567 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 2.38 \text{ mg/L}$ $K_i = 106 \text{ mg/L}$
Chi y Howell (1976)	<i>Pseudomonas putida</i>	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.369 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 5.94 \text{ mg/L}$ $K_i = 227 \text{ mg/L}$
Szetela y Winnicki (1981)	Microorganismos Mixtos	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.33 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 19.2 \text{ mg/L}$ $K_i = 229 \text{ mg/L}$
D'Adamo y col. (1983)	Microorganismos Mixtos	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.131 - 0.363 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 5 - 266 \text{ mg/L}$ $K_i = 142 - 1199 \text{ mg/L}$
Lallai y Mura (1989)	Microorganismos Mixtos	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.381 \text{ h}^{-1}$ $K_s = 57.35 \text{ mg/L}$ $K_i = 1503 \text{ mg/L}$
González y Revel Chion (1992)	<i>Pseudomonas putida</i>	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.688 \text{ h}^{-1}$ $K_i = 581 \text{ mg/L}$
Okaygun y col. (1992)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cultivo por Carga y pulsos consecutivos	Haldane	$\mu_m = 0.326 \text{ h}^{-1}$ $K_i = 8 \text{ mg/L}$
Durán y Revel Chion (1995)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.184 \text{ h}^{-1}$ $K_i = 560.9 \text{ mg/L}$
Concha y Revel Chion (2005)	<i>Pseudomonas</i> sp.	Cultivo por Carga	Haldane	$\mu_m = 0.579 \text{ h}^{-1}$ $K_i = 191.43 \text{ mg/L}$

### 3.4.-DEGRADACIÓN DE FENOL CON MICROORGANISMOS INMOVILIZADOS EN NYLON A NIVEL DE FRASCOS.

Este estudio sólo se evaluó la degradación de fenol en soluciones con concentraciones comprendidas entre 264 ppm, y 746 ppm, dado que en la Sección anterior se demostró que el cultivo sumergido podía actuar dentro de ese rango. En la Figura 25, se muestra que la cepa microbiana es capaz de degradar en su totalidad el fenol inicialmente presente en las soluciones, en un lapso menor que el correspondiente al cultivo sumergido. En efecto, si se comparan la Figura 21 y la Figura 25, puede observarse que para soluciones de fenol con similares concentraciones iniciales a las utilizadas en el cultivo sumergido, hay una considerable reducción en el tiempo requerido para la degradación del contaminante. En efecto, cuando las concentraciones de fenol son de aproximadamente 264 ppm, ese lapso se reduce en un 50 %; mientras que en el caso de las otras concentraciones empleadas, esa disminución es cercana al 75 %.

Un resultado similar fue obtenido por Anselmo y col. (1985) cuando inmovilizaron una cepa de *Fusarium flocciferum* en diferentes tipos de soporte. Sus experimentos demostraron que las células libres eran sensibles a un efecto inhibitorio a los 1.300 mg/L de fenol, mientras que la preparación inmovilizada podía someterse a una concentración inicial de fenol de hasta 4.000 mg/L. Por otra parte, Kennedy y col. (1990) llegaron a la conclusión que el sistema inmovilizado permite reducir el manejo de la biomasa obtenida, en algunos casos mejora la actividad metabólica de las células y sobretodo, hay un aumento en la resistencia de la célula hacia los efectos tóxicos del fenol. Análogos resultados fueron obtenidos por Abd-El-Haleem y col. (2003) al emplear cultivos inmovilizados de *Acinetobacter sp.* en alginato de calcio. Estos investigadores encontraron que la biomasa inmovilizada reduce en un 80% el tiempo de degradación de fenol en comparación con el comportamiento de la cepa en un cultivo sumergido cuando se utiliza el mismo medio sintético con fenol como única fuente de carbono.

En el Anexo 14 se observa en detalle las tablas de datos promedio obtenida para cada una de las soluciones estudiadas.

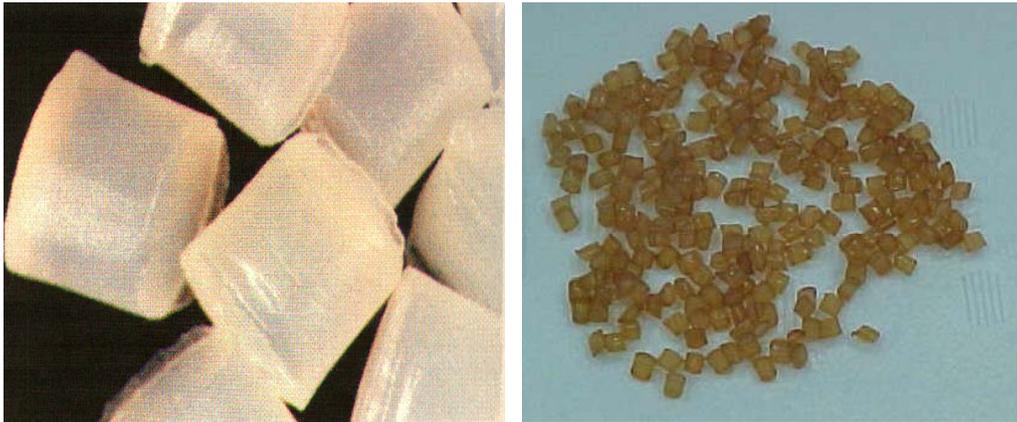


**Figura 25: Degradación de Fenol en función del tiempo para Biomasa Inmovilizada**

Ahora bien, si se considera que durante el proceso de inmovilización en la etapa de enfrentamiento entre el soporte activado (1.118,62 g) y la suspensión de biomasa, esta última contenía inicialmente 3.627,31 mg de microorganismos (producto de la concentración celular en buffer de fosfato pH = 7,0 por el volumen de la solución) y que al final del período de inmovilización y luego de los respectivos lavados la concentración celular remanente en solución era equivalente a 1.095,66 mg, podría concluirse que 2.531,65 mg de biomasa se adhirieron a 1.118,62 g de soporte tratado. Mediante estos estimados se podría concluir que se inmovilizaron 2,26 mg de biomasa por gramo de soporte. Si ahora se consideran las características

físicas de una partícula promedio del soporte de nylon tal como se indica en el Anexo 15 podría concluirse que la concentración de biomasa inmovilizada en promedio fue de 0,04096 mg de biomasa por  $\text{mm}^2$  de superficie de soporte; donde la superficie considerada para este cálculo sólo corresponde al desarrollo de la circunferencia de la partícula cilíndrica empleada como soporte y no se han incluido en el cálculo las áreas correspondientes a las circunferencias de las bases del cilindro; ya que los resultados obtenidos por Ledesma y col. (2001) demostraron que la biomasa solo se adhiere en la periferia del nylon y no en aquellas áreas terminales de la partícula.

En la Figura 26, que se muestra a continuación, se puede observar la variación en la apariencia física de las partículas cilíndricas de nylon 6 utilizadas para la inmovilización del cultivo microbiano seleccionado desde la etapa inicial (soporte sin tratar) y la etapa final (cultivo inmovilizado).



Antes del Tratamiento

Después de la Inmovilización

**Figura 26: Variación de la Apariencia Física del Soporte**

### 3.5.-ESTUDIO HIDRODINÁMICO DEL REACTOR.

En el anexo 16 pág. 96 se detallan los resultados de los tiempos de residencia hidráulicos dentro del lecho en función de la caída de presión ( $\Delta P$ ) detectada en el manómetro, caudal del aire y caudal del medio líquido; tanto para el distribuidor de forma cónica como el de forma cilíndrica; para diferentes pesos de sólidos. La selección de las condiciones de operación del reactor de tres fases más convenientes, efectuadas a partir de los resultados correspondientes a fluidización incipiente, se fundamentaron en las siguientes consideraciones: disponibilidad de reactivos, duración de la experimentación y tiempo de residencia o contacto entre el contaminante y el biocatalizador o lecho sólido.

Tomando en consideración lo anteriormente expuesto las condiciones experimentales de operación del reactor de tres fases, a fluidización incipiente fueron:

- Distribuidor Cónico
- 2.000 gramos de soporte
- Altura inicial del lecho de 68,7 cm (porosidad = 0,45 aprox.)
- Altura Final del Lecho 97,3 cm (porosidad experimental = 0,773 aprox.) (Bruce y col., 1974)
- Flujo de Aire 86,29 mL/s (40 psig; 23,7 °C)
- Flujo de Líquido 3,48 mL/s. (equivalente a 28,123 min de tiempo de residencia dentro del lecho)

Es oportuno destacar que durante esta etapa de evaluación se estudió cualitativamente el movimiento del sólido en el reactor, una vez establecidas las condiciones anteriormente indicadas. Para ello se pintaron una porción de las partículas de nylon para utilizarlas como trazadoras y verificar las corrientes de circulación del sólido característico de este tipo de reactor. Se pudo comprobar que

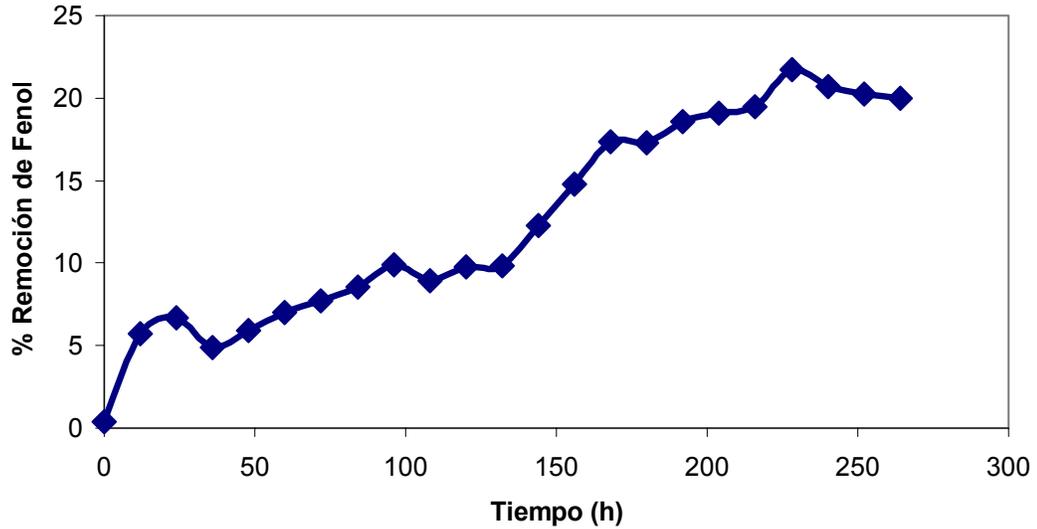
existía una circulación ascendente – descendente desde la zona de distribución hacia la máxima altura del lecho.

### **3.6.- EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE FENOL EN EL REACTOR DE TRES FASES**

En la puesta en marcha del reactor de tres fases la concentración de fenol en la alimentación osciló entre 622,49 mg/L y 626,50 mg/L, a lo largo de la experimentación. Por otro lado, el flujo en la salida del reactor se reguló para mantenerlo entre 3,32 y 3,54 mL/s.

La Figura 27 muestra que en el transcurso de 11 días de experimentación la remoción de fenol fue aumentando a lo largo del tiempo, alcanzando un máximo de 21,7 %, posiblemente debido a la adaptación progresiva de la película microbiana al nuevo sistema inmovilizado. La tasa de degradación de fenol expresada como la diferencia entre la concentración de fenol a la entrada y a la salida del reactor dividida entre el tiempo de residencia dentro del lecho fluidizado, equivale a 4,85 ppm/min. Este valor es inferior a 22,02 ppm/min obtenido por Richards y col. (1983) al estudiar la remoción de fenol utilizando partículas de carbón como soporte. Sin embargo, es necesario señalar que en ese estudio se detectó una apreciable remoción de fenol por encima del lecho del biocatalizador, siendo eso una evidencia de la existencia de células libres viables en el proceso.

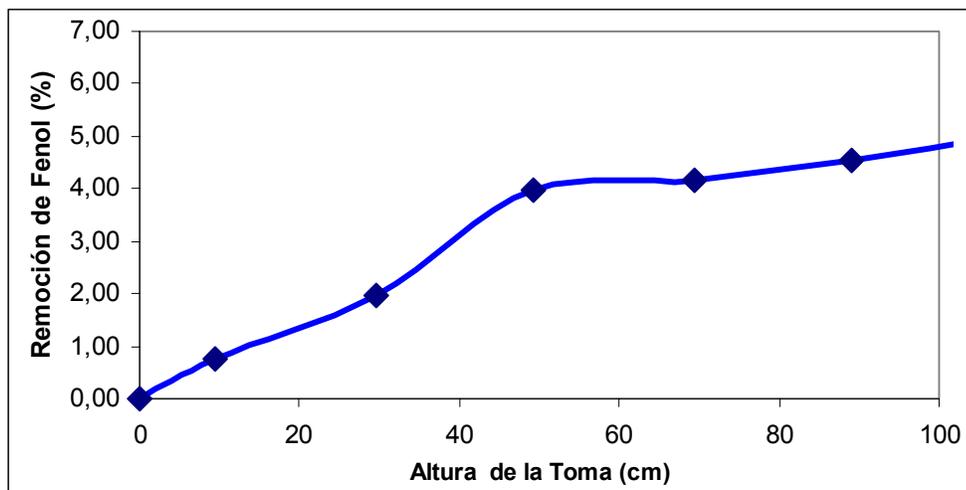
Desafortunadamente, la extensión del experimento no permitió evaluar el tiempo de vida útil del biocatalizador bajo condiciones de operación continua. La tabla de resultados correspondientes a la Figura 27 se muestra en el Anexo 17.



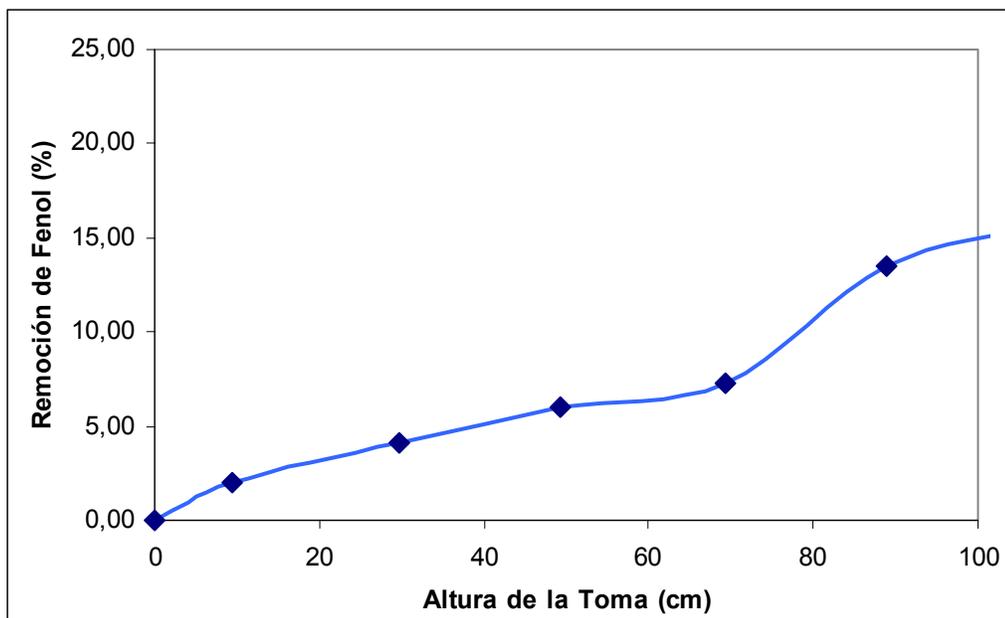
**Figura 27: Porcentaje de Remoción de Fenol en el Reactor de Tres Fases**

El análisis de las muestras que a lo largo de todo el experimento y de manera periódica, se tomaron para verificar la existencia de células libres viables (siembra de placas de Petri y cuantificación de la densidad óptica) demostraron que la remoción del fenol era únicamente debida a la biomasa inmovilizada sobre el soporte.

En el transcurso de los 11 días de experimentación, se tomaron muestras a lo largo del eje axial del reactor a las 48 y 216 horas. Los resultados obtenidos que se muestran en las Figuras 30 y 31 son una clara evidencia de que existe un gradiente de concentración en la fase líquida y en consecuencia estos resultados parecen indicar un flujo tipo pistón independiente del movimiento circulatorio de la fase sólida. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Richards y col (1983), pero corresponden tanto a las condiciones operativas utilizadas como al diseño físico del reactor empleado.



**Figura 28: Perfil del Reactor a las 48 horas**



**Figura 29: Perfil del Reactor a las 216 Horas**

## CAPITULO 4: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del estudio realizado se puede concluir lo siguiente:

1. Los microorganismos autóctonos *Stenotrophomonas maltophylia* y *Acinetobacter sp.* son capaces de degradar fenol como única fuente de carbono en un medio mineral bajo las condiciones de experimentación estudiadas.
2. La cepa identificada como *Stenotrophomonas maltophylia* (*Pseudomonas maltophylia* o *Xanthomonas maltophylia*) es capaz de degradar fenol como única fuente de carbono en un menor lapso que la cepa aislada de *Acinetobacter sp.*, cuando ambos microorganismos se cultivan bajo idénticas condiciones experimentales.
3. El cultivo suspendido, a nivel de frascos, de *Stenotrophomonas maltophylia* responde a las características propias del crecimiento con inhibición de sustrato, en este caso de un sustrato tóxico como el fenol. Sus constantes cinéticas corresponde a una velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_m$ ) de  $0,2318 \text{ h}^{-1}$  y a una constante de inhibición  $K_i$  igual a  $829,54 \text{ mg de Fenol/L de solución}$ .
4. La cepa del género *Stenotrophomonas maltophylia* (*Pseudomonas maltophylia* o *Xanthomonas maltophylia*) una vez inmovilizada sobre nylon puede degradar fenol como única fuente de carbono, cuando se evalúa a nivel de frasco.
5. El biocatalizador obtenido empleando nylon como soporte y la cepa microbiana *Stenotrophomonas maltophylia* permite reducir el tiempo de degradación de fenol en un  $83,33 \%$  en comparación con el cultivo sumergido del mismo microorganismo cuando se evalúan bajo las mismas condiciones experimentales y a nivel de frascos.

6. En el reactor de tres fases construido las condiciones más adecuadas para su operación a nivel de fluidización incipiente, para 2.000 gr de sólido son:

- Distribuidor Cónico
- Altura inicial del lecho de 68,7 cm (porosidad = 0,45 aprox.)
- Altura Final del Lecho 97,3 cm (porosidad experimental = 0,773 aprox.) (Bruce y col., 1974)
- Flujo de Aire 86,29 mL/s (40 psig; 23,7 °C)
- Flujo de Líquido 3,48 mL/s. (equivalente a 28,123 min de tiempo de residencia dentro del lecho)

7. Bajo las condiciones utilizadas en el reactor de tres fases y a lo largo de 11 días de experimentación, fue posible obtener 21,70% de remoción de fenol a partir de una concentración inicial de 624,5 mg de fenol/L de solución y un tiempo de contacto en el lecho de 28,12 minutos.

8. El comportamiento del reactor de lecho fluidizado de tres fases, dentro de las condiciones experimentales utilizadas, corresponde a un reactor de flujo pistón.

En base a los resultados y observaciones realizados en este trabajo de investigación se sugieren las siguientes recomendaciones:

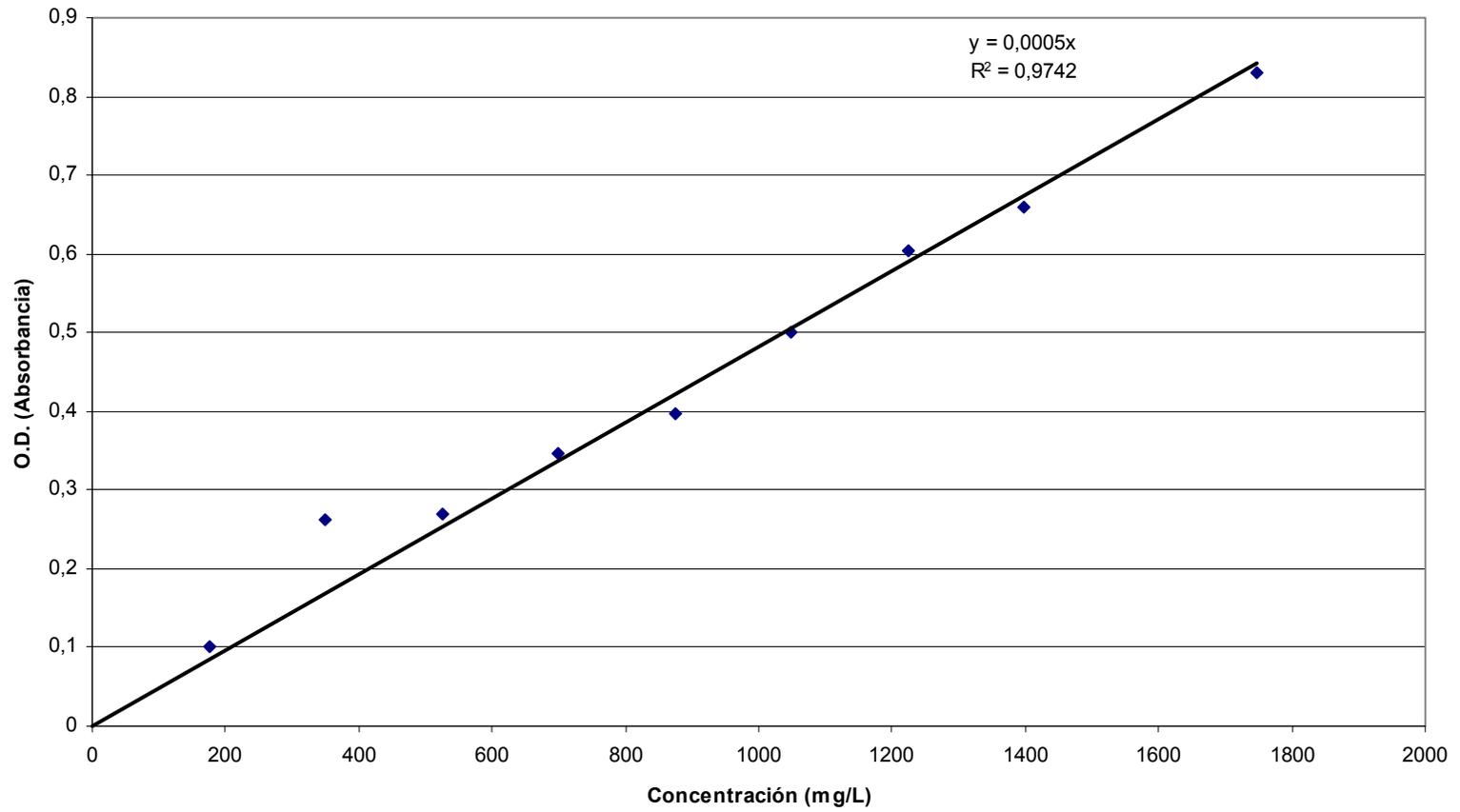
1. Estudiar la posible adaptación de la cepa aislada a mayores rangos de concentraciones de fenol a lo largo de períodos de experimentación prolongados.
2. Evaluar la estabilidad operacional del biocatalizador obtenido en operación continua del reactor por períodos de mayor extensión, así como su estabilidad bajo almacenamiento y diferentes condiciones de temperatura.

3. Evaluar la posibilidad de reutilización del soporte una vez que el biocatalizador haya perdido su actividad catalítica.
4. Realizar un estudio detallado relacionado con los problemas de transferencia de masa entre la fase gaseosa y la fase líquida; con la finalidad de determinar si la disponibilidad del oxígeno en el reactor empleado es un factor limitante en la tasa de degradación de fenol.
5. Caracterizar la biopelícula existente sobre el soporte en términos de su espesor y área cubierta del mismo.
6. Evaluar la sensibilidad del cultivo a la temperatura del proceso, a fin de determinar la temperatura óptima de la preparación inmovilizada; así como su dependencia al pH.
7. Realizar la evaluación del comportamiento del biocatalizador obtenido en esta investigación para la degradación de un efluente industrial real.

## ANEXO 2: Fiola para Experimento con Biomasa Inmovilizada



### ANEXO 3



**Figura 10: Curva de Peso Seco para Determinar la Biomasa**

## ANEXO 4

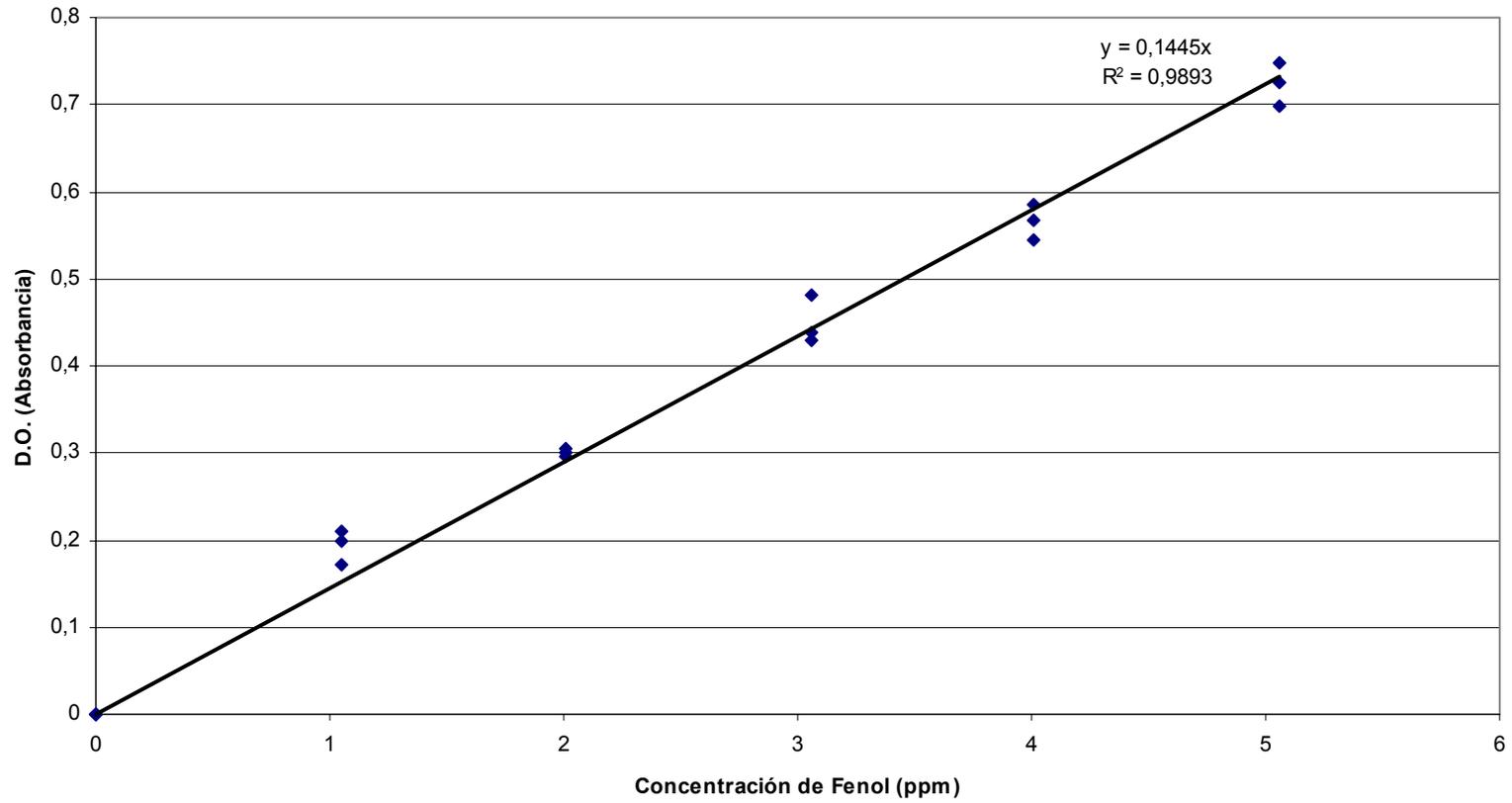
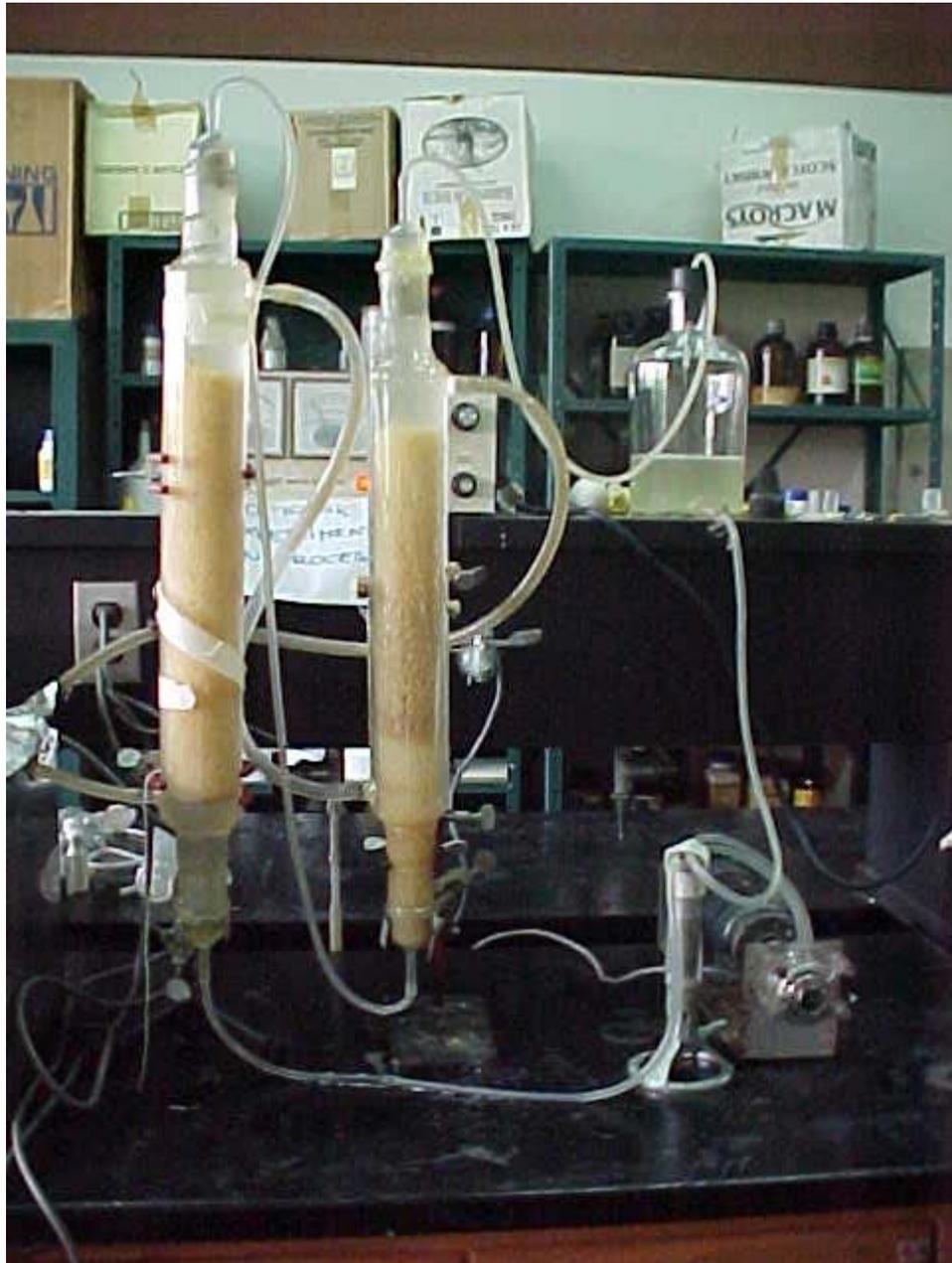


Figura 11: Curva de Calibración para la Medición de Fenol

## ANEXO 5: Reactor Utilizado para Inmovilizar la Biomasa Celular



## ANEXO 6: Esquema de Distribuidores de Flujo Estudiados

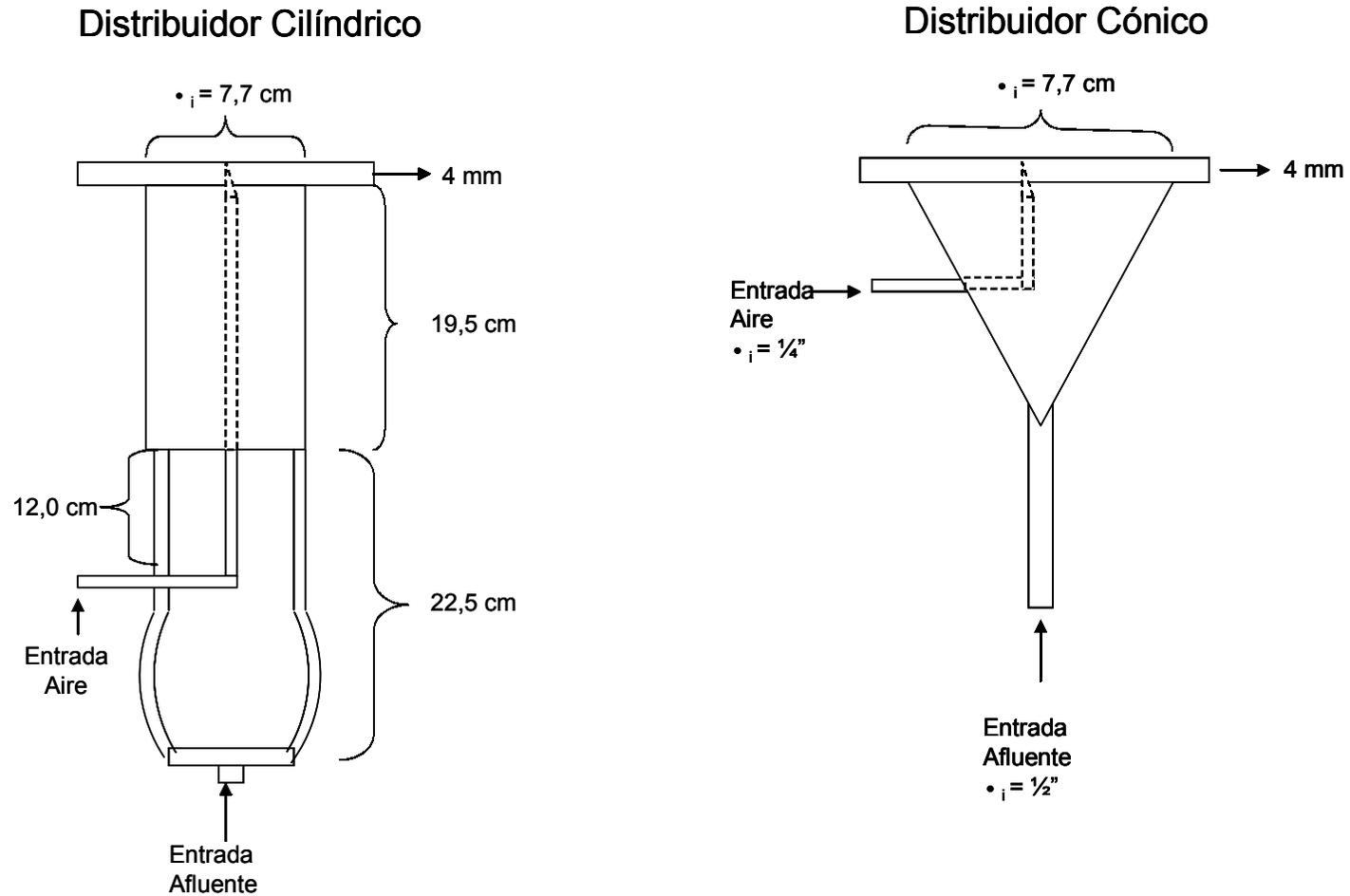
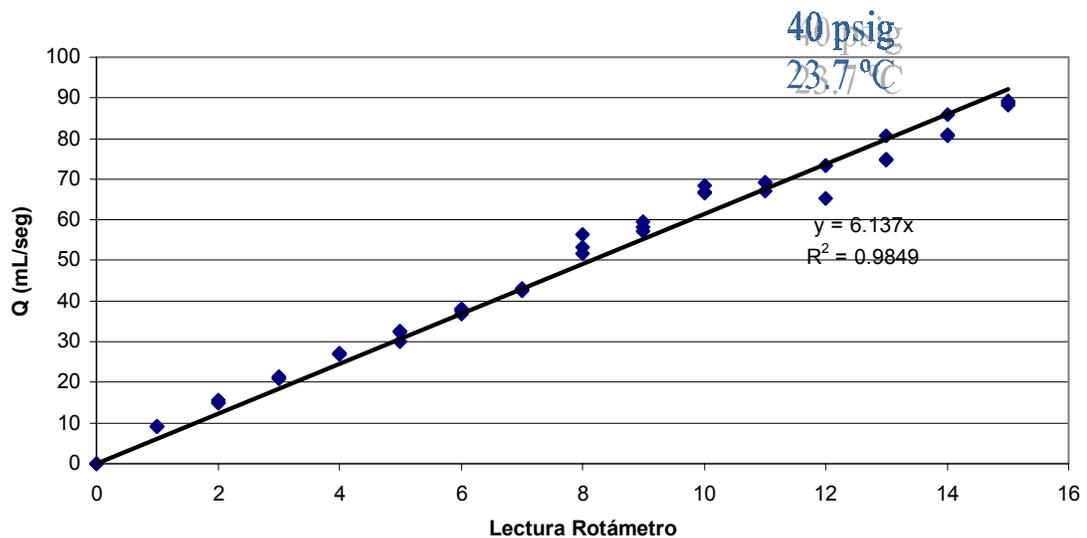


Figura 12: Esquema de Distribuidores de Flujo Estudiados

**ANEXO 7: Curva de Calibración del Rotámetro de Aire a 23,7 °C y 40 psig**

**Tabla 7 : Datos de la Calibración del Rotámetro de Aire**

Lectura Rotámetro	Volumen (mL)	Tiempo (seg)	Q (mL/seg)	Lectura Rotámetro	Volumen (mL)	Tiempo (seg)	Q (mL/seg)
0	0	0	0	8	400	7.74	51.6795866
0	0	0	0	8	400	7.52	53.1914894
0	0	0	0	8	400	7.09	56.4174894
1	300	33.19	9.03886713	9	500	8.74	57.208238
1	300	32.8	9.14634146	9	500	8.41	59.4530321
1	300	32.66	9.18554807	9	500	8.57	58.3430572
2	300	19.21	15.6168662	10	400	5.99	66.7779633
2	300	20.06	14.9551346	10	400	6	66.6666667
2	300	19.87	15.0981379	10	400	5.85	68.3760684
3	400	19.23	20.800832	11	500	7.22	69.2520776
3	400	18.81	21.2652844	11	500	7.46	67.0241287
3	400	18.72	21.3675214	11	500	7.23	69.1562932
4	400	14.74	27.1370421	12	500	7.66	65.2741514
4	400	14.75	27.1186441	12	400	5.45	73.3944954
4	400	14.94	26.7737617	12	400	5.45	73.3944954
5	400	13.28	30.1204819	13	500	6.69	74.7384155
5	400	12.3	32.5203252	13	500	6.67	74.9625187
5	400	12.32	32.4675325	13	500	6.2	80.6451613
6	400	10.48	38.1679389	14	400	4.95	80.8080808
6	400	10.62	37.6647834	14	400	4.94	80.9716599
6	400	10.9	36.6972477	14	400	4.66	85.8369099
7	400	9.34	42.8265525	15	400	4.5	88.8888889
7	400	9.28	43.1034483	15	400	4.53	88.3002208
7	400	9.4	42.5531915	15	400	4.48	89.2857143



**Figura 13: Curva de Calibración del Rotámetro de Aire**

## ANEXO 8: Curva de Calibración del Rotámetro de Líquido a 23,7 °C

Tabla 8 : Datos de la Calibración del Rotámetro de Líquido

Lectura de Rotámetro	Volumen (mL)	Tiempo (seg)	Q (mL/seg)	Lectura de Rotámetro	Volumen (mL)	Tiempo (seg)	Q (mL/seg)
0	0	0	0	60	167	20.03	8.33749376
10	56	62.78	0.89200382	60	171	20.38	8.390579
10	50	62.5	0.8	60	174	20.65	8.42615012
10	58	61.19	0.9478673	70	156	15.31	10.1894187
20	196	60.6	3.23432343	70	160	15.81	10.1201771
20	186	60.53	3.07285643	70	164	15.91	10.3079824
20	174	61.18	2.84406669	80	189	15.81	11.9544592
30	172	40.47	4.25006177	80	184	15.53	11.8480361
30	168	40.79	4.11865653	80	182	15.63	11.6442738
30	170	40.93	4.15343269	90	216	15.97	13.5253601
40	166	25.65	6.47173489	90	216	15.65	13.8019169
40	186	25.63	7.25712056	90	218	15.59	13.9833226
40	175	25.5	6.8627451	100	240	15.59	15.3944836
50	198	25.56	7.74647887	100	232	15.44	15.0259067
50	200	25.53	7.83392088	100	236	15.41	15.3147307
50	204	25.63	7.95942255				

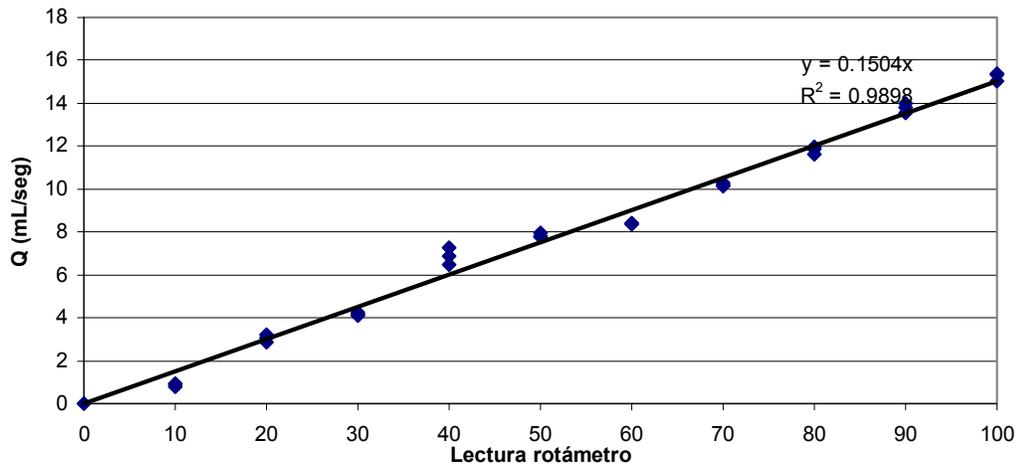


Figura 14: Curva de Calibración del Medidor de Flujo

## ANEXO 9: Curva de Calibración DBO<sub>5,20</sub>

Tabla 9 : Datos de DBO<sub>5,20</sub> en Función de la Concentración de Fenol

ppm de fenol	DBO <sub>5,20</sub> (mg/l)
0	0
29,35	62
187,88	400
354,65	760
616,89	1170
735,92	1550

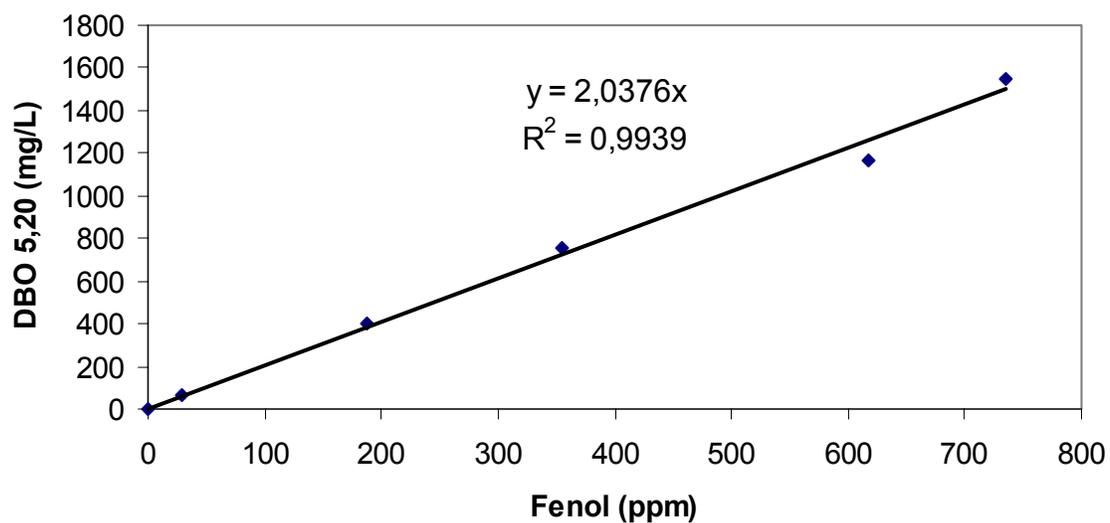


Figura 15: Curva de Calibración DBO<sub>5,20</sub>

## ANEXO 10: Curva de Calibración DQO

Tabla 10 : Datos de DQO en Función de la Concentración de Fenol

ppm de fenol	DOQ (mg/l)
0	0
29.35	84
187.88	505
354.65	1121
616.89	1588
735.92	2149

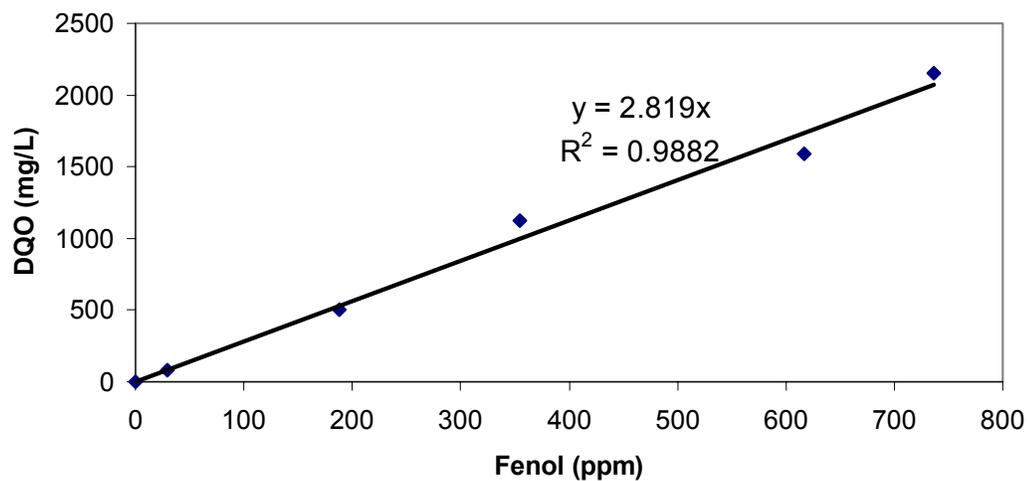


Figura 16: Curva de Calibración DQO

## ANEXO 11: Degradación de Fenol de las Cepas Estudiadas

**Tabla 11: Remoción de Fenol por *Acinetobacter* sp.**  
(T amb.= 23,8 °C y pH inicial de adaptación = 6,8)

Hora	pH	Biomasa (mg/ml)	Fenol (mg/L)	% Fenol Removido
0	6,54	0,00	323,67	
4	6,53	0,04	305,98	5,47
8	6,52	0,04	298,78	7,69
12	6,49	0,05	291,56	9,92
16	6,46	0,10	222,89	31,14
20	6,42	0,12	159,58	50,70
24	6,41	0,21	87,69	72,91
28	6,38	0,36	38,91	87,98
32	6,27	0,45	0,00	100,00

**Tabla 12: Remoción de Fenol por *Stenotrophomonas maltophilia*.**  
(T amb.= 23,8 °C y pH inicial de adaptación = 6,8)

Hora	pH	Biomasa (mg/ml)	Fenol (mg/L)	% Fenol Removido
0	6,54	0,00	323,67	
4	6,46	0,04	295,39	8,74
8	6,51	0,04	295,29	8,77
12	6,48	0,05	274,87	15,08
16	6,46	0,16	224,94	30,50
20	6,42	0,40	87,86	72,86
24	6,32	0,42	0,00	100,00

## ANEXO 12: Comparación del Comportamiento de la Cepa en los Medios SW y MSM

**Tabla 13: Degradación de Fenol en función del tiempo para el Medio SW**  
(T amb.= 23,7 °C y pH inicial de adaptación = 7,0)

Hora	pH	Biomasa (mg/L)	Fenol SW (mg/L)	% Remoción
0	7.18	0.00	501.42	---
24	6.70	0.49	135.45	72.99
48	7.12	0.49	0.00	100.00

**Tabla 14: Degradación de Fenol en función del tiempo para el Medio MSM**  
(T amb.= 23,7 °C y pH inicial de adaptación = 7,0)

Hora	pH	Biomasa (mg/L)	Fenol MSM (mg/L)	% Remoción
0	6.98	0.00	501.42	---
24	6.68	0.53	0.00	100.00
48	7.20	0.41	0.00	100.00

## ANEXO 13: Estudio de la Degradación de Fenol a Nivel de Frascos de la Cepa en Cultivos Sumergido

**Tabla 15: Degradación de Fenol en función del tiempo para 323 ppm**  
(T amb.= 23,6 °C y pH inicial de adaptación = 6,75)

Hora	pH	Biomasa (mg/L)	Fenol (mg/L)	% Remoción
0	6.54	0.00	323.67	---
4	6.47	37.35	291.79	9.85
8	6.52	38.04	291.30	10.00
12	6.49	53.95	279.14	13.76
16	6.45	159.78	220.77	31.79
20	6.41	466.21	50.98	84.25
24	6.31	430.93	0.00	100.00

**Tabla 16: Degradación de Fenol en función del tiempo para 514 ppm**  
(T amb.= 23,6 °C y pH inicial de adaptación = 6,9)

Hora	pH	Biomasa (mg/L)	Fenol (mg/L)	% Remoción
0	6.81	0.00	514.34	---
4	6.66	20.06	439.24	14.60
8	6.70	58.80	431.01	16.20
12	6.72	76.09	423.90	17.58
16	6.65	159.78	330.51	35.74
20	6.71	285.67	297.75	42.11
24	6.67	717.30	129.31	74.86
28	6.61	846.65	0.00	100.00

**Tabla 17: Degradación de Fenol en función del tiempo para 733 ppm**  
(T amb.= 23,6 °C y pH inicial de adaptación = 6,75)

Hora	pH	Biomasa (mg/L)	Fenol (mg/L)	% Remoción
0	6.99	0.00	732.58	---
4	6.78	125.89	623.64	14.87
8	6.83	228.26	569.64	22.24
12	6.75	417.10	454.36	37.98
16	6.76	599.02	400.62	45.31
20	6.65	1100.50	156.77	78.60
24	6.65	1293.49	13.91	98.10
28	6.61	1467.80	0.00	100.00

**Tabla 18: Degradación de Fenol en función del tiempo para 1.046 ppm**  
(T amb.= 23,6 °C y pH inicial de adaptación = 6,75)

Hora	pH	Biomasa (mg/L)	Fenol (mg/L)	% Remoción
0	6.77	0.00	1046.13	---
4	6.72	83.70	948.74	9.31
8	6.72	58.80	986.69	5.68
12	6.71	59.49	1021.39	2.36
16	6.67	69.17	986.00	5.75
20	6.77	82.31	1036.59	0.91
24	6.74	59.49	925.48	11.53
28	6.88	83.70	1012.87	3.18

**Tabla 19: Degradación de Fenol en función del tiempo para 1.263 ppm**  
(T amb.= 23,8 °C y pH inicial de adaptación = 6,91)

Hora	pH	Biomasa (mg/L)	Fenol (mg/L)	% Remoción
0	6.88	0.00	1263.39	---
4	6.74	62.95	1063.99	15.78
8	6.77	87.16	1148.18	9.12
12	6.84	58.10	1191.06	5.73
16	6.67	24.21	1147.63	9.16
20	6.77	62.25	1170.73	7.33
24	6.81	5.53	1201.87	4.87
28	6.80	45.65	1195.51	5.37
32	6.93	22.83	1216.44	3.72

**Tabla 20: Degradación de Fenol en función del tiempo para 1.407 ppm**  
(T amb.= 23,7 °C y pH inicial de adaptación = 6,90)

Hora	pH	Biomasa (mg/L)	Fenol (mg/L)	% Remoción
0	6.85	0.00	1407.11	---
4	6.85	29.74	1502.41	-6.77
8	6.80	35.97	1369.72	2.66
12	6.81	31.13	1401.59	0.39
16	6.86	33.20	1436.24	-2.07
20	6.76	32.51	1378.52	2.03
24	6.76	49.80	1397.93	0.65



## ANEXO 14: Estudio de la Degradación de Fenol a Nivel de Frascos para la Cepa Inmovilizada

**Tabla 23: Degradación de Fenol en función del tiempo para 264 ppm**  
(T amb.= 23,6 °C y pH inicial de adaptación = 7,0)

Hora	pH	Biomasa (mg/ml)	Fenol (mg/L)	% FENOL
0	6.92	0.00	263.84	
4	6.75	0.04	233.89	11.35
8	6.61	0.05	137.32	47.95
12	6.49	0.21	0.00	100.00

**Tabla 24: Degradación de Fenol en función del tiempo para 522 ppm**  
(T amb.= 23,7 °C y pH inicial de adaptación = 7,01)

Hora	pH	Biomasa (mg/ml)	Fenol (mg/L)	% FENOL
0	6.98	0.00	522.31	
4	6.83	0.02	405.45	22.37
8	6.70	0.06	213.69	59.09
12	6.46	0.22	0.00	100.00

**Tabla 25: Degradación de Fenol en función del tiempo para 746 ppm**  
(T amb.= 23,8 °C y pH inicial de adaptación = 7,01)

Hora	pH	Biomasa (mg/ml)	Fenol (mg/L)	% FENOL
0	6.99	0.00	745.89	
4	6.78	0.04	654.99	12.19
8	6.83	0.04	325.76	56.33
12	6.75	0.12	138.33	81.45
16	6.76	0.23	0.00	100.00

## ANEXO 15: DATOS FÍSICOS DEL NYLON

Datos del Nylon				
#	Peso (g)	Altura (mm)	Diámetro Menor (mm)	Diámetro Mayor (mm)
1	0,0178	2,96	2,20	3,20
2	0,0176	2,90	2,36	3,06
3	0,0199	2,70	2,32	3,24
4	0,0178	3,00	2,30	3,00
5	0,0195	2,90	2,32	3,26
6	0,0169	2,60	2,18	2,94
7	0,0168	2,76	2,30	2,90
8	0,0159	2,68	2,26	3,02
9	0,0168	2,72	2,18	3,30
10	0,0176	2,90	2,26	3,18
11	0,0174	2,66	2,20	3,12
12	0,0173	2,78	2,22	3,00
13	0,0189	2,60	2,20	3,40
14	0,0189	2,62	2,32	3,14
15	0,0173	2,66	2,20	3,10
16	0,0177	2,62	2,26	3,20
17	0,0183	2,56	2,26	3,00
18	0,0198	2,60	2,24	3,50
19	0,0172	2,70	2,26	3,00
20	0,0171	2,66	2,26	3,00
21	0,0199	2,76	2,30	3,24
22	0,0204	2,60	2,16	3,40
23	0,0184	2,66	2,22	3,20
24	0,0204	2,68	2,24	3,50
25	0,0169	2,66	2,18	3,00
26	0,0200	2,68	2,30	3,30
27	0,0203	3,00	2,26	3,12
28	0,0174	2,90	2,20	3,44
29	0,0203	2,50	2,30	3,22
30	0,0173	2,60	2,18	3,00
31	0,0149	2,66	2,60	2,68
32	0,0156	2,62	2,06	2,86
33	0,0153	2,88	2,10	2,66
34	0,0160	3,90	2,20	3,95
35	0,0178	2,66	2,20	3,14
36	0,0197	2,70	2,30	3,20
37	0,0163	2,60	2,10	3,00
38	0,0166	3,00	2,00	2,80
39	0,0194	3,00	2,18	3,14
40	0,0160	2,80	2,20	2,90
41	0,0184	2,70	2,18	3,08
42	0,0192	2,90	2,35	3,25
43	0,0183	3,00	2,20	3,00
44	0,0211	2,76	2,30	3,30
45	0,0181	2,70	2,40	3,30
46	0,0176	2,36	2,20	3,30
47	0,0157	2,80	2,25	3,00
48	0,0201	2,60	2,06	2,66
49	0,0199	3,00	2,20	3,06
50	0,0194	2,70	2,10	3,24

Peso Promedio (g)	0,0181 ± 0,0016
Altura Promedio (mm)	2,76 ± 0,22
Diámetro menor promedio (mm)	2,23 ± 0,10
Diámetro mayor promedio (mm)	3,13 ± 0,23

## ANEXO 16: RESULTADOS DE ESTUDIO HIDRODINÁMICO DEL REACTOR DE TRES FASES

**Tabla 26: Datos Hidrodinámicos del Reactor con el Distribuidor Cónico**

Masa de Soporte	• P (mm de Hg)	Caudal de Aire Entrada (mL/s)	Caudal de Agua Salida (mL/s)	Caudal Promedio de Salida (mL/s)	Tiempo de Residencia (min)	Observaciones
400 g.	1	12,27	8,71	8,56	6,37	Presencia de burbujas grandes y canales preferenciales
	1	12,27	7,98			
	1	12,27	8,99			
400 g.	1	36,82	11,25	11,08	5,07	Lecho fluidizado pero con porosidad irregular a lo largo del lecho
	1	36,82	10,96			
	1	36,82	11,04			
1.000 g.	2	18,41	9,87	9,67	5,84	Presencia de camino preferencial y burbujas grandes
	2	18,41	9,98			
	2	18,41	9,17			
1.000 g.	2	36,82	10,25	10,19	6,31	Presencia de canales preferenciales
	2	36,82	10,15			
	2	36,82	10,18			
2.000 g.	3	18,41	9,32	9,16	8,11	Porosidad irregular con presencia de canales preferenciales
	3	18,41	9,17			
	3	18,41	8,99			
2.000 g.	3	86,29	3,42	3,46	21,46	Lecho fluidizado con movimiento regular
	3	86,29	3,56			
	3	86,29	3,41			

\* Flujo de Gas, condiciones T = 23,7 °C y 40 psig

**Tabla 27: Datos Hidrodinámicos del Reactor con el Distribuidor Cilíndrico**

Masa de Soporte	• P (mm de Hg)	Caudal de Aire Entrada (mL/s)	Caudal de Salida (mL/s)	Caudal Promedio de Salida (mL/s)	Tiempo de Residencia (min)	Observaciones
400 g.	1	18,411	25,98	25,97	2,07	Lecho burbujeante y presencia de caminos preferenciales
	1	18,411	25,89			
	1	18,411	26,05			
400 g.	1	36,822	38,51	38,50	1,42	Mayor movimiento del sólido de manera irregular. Porosidad del
	1	36,822	38,16			
	1	36,822	38,83			
400 g.	1	18,411	43,23	43,13	1,52	Presencia de camino preferencial y burbujas grandes
	1	18,411	42,98			
	1	18,411	43,17			
400 g.	2	36,822	100,6	100,50	0,68	Máxima expansión de partículas pero con porosidad irregular a lo
	2	36,822	101,02			
	2	36,822	99,87			
1.000 g	2	18,411	22,35	22,48	3,19	Porosidad irregular con presencia de canales preferenciales
	2	18,411	23,04			
	2	18,411	22,05			
1.000 g.	3	36,822	8,99	9,05	8,48	Lecho compactado con movimiento de partículas
	3	36,822	9,14			
	3	36,822	9,02			

\* Flujo de Gas, condiciones T = 23,7 °C y 40 psig

## ANEXO 17: DATOS DE REMOCIÓN DE FENOL EN EL REACTOR DE TRES FASES

Tabla 28: Datos de Remoción de Fenol en el Reactor

Tiempo (h)	Entrada Promedio Fenol (ppm)	Salida Promedio Fenol (ppm)	% Remoción de Fenol	DQO entrada (mg/L)	DQO salida (mg/L)	DBO <sub>5,20</sub> entrada (mg/L)	DBO <sub>5,20</sub> salida (mg/L)	Remoción DQO (mg/L)	Remoción DBO <sub>5,20</sub> (mg/L)
0	624,57	622,15	0,39	1761	1754	1273	1268	6,83	4,94
12	626,30	590,31	5,75	1766	1664	1276	1203	101,44	73,33
24	625,95	584,08	6,69	1765	1647	1275	1190	118,03	85,31
36	617,30	587,20	4,88	1740	1655	1258	1196	84,86	61,34
48	618,34	581,66	5,93	1743	1640	1260	1185	103,40	74,74
60	620,42	576,82	7,03	1749	1626	1264	1175	122,90	88,84
72	620,42	572,66	7,70	1749	1614	1264	1167	134,61	97,30
84	623,18	569,90	8,55	1757	1607	1270	1161	150,22	108,58
96	624,57	562,63	9,92	1761	1586	1273	1146	174,60	126,20
108	614,53	559,52	8,95	1732	1577	1252	1140	155,09	112,10
120	614,53	554,33	9,80	1732	1563	1252	1129	169,73	122,68
132	611,76	551,56	9,84	1725	1555	1247	1124	169,73	122,68
144	610,73	535,64	12,29	1722	1510	1244	1091	211,67	153,00
156	624,57	532,18	14,79	1761	1500	1273	1084	260,44	188,25
168	622,84	514,88	17,33	1756	1451	1269	1049	304,33	219,98
180	622,84	515,22	17,28	1756	1452	1269	1050	303,36	219,27
192	629,41	512,46	18,58	1774	1445	1282	1044	329,70	238,31
204	629,41	509,34	19,08	1774	1436	1282	1038	338,48	244,65
216	626,99	504,84	19,48	1767	1423	1278	1029	344,33	248,88
228	628,37	492,04	21,70	1771	1387	1280	1003	384,32	277,79
240	623,53	494,46	20,70	1758	1394	1271	1008	363,84	262,98
252	623,88	497,58	20,24	1759	1403	1271	1014	356,03	257,34
264	622,49	498,27	19,96	1755	1405	1268	1015	350,18	253,11

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-El-Haleem,D. “Effects of mixed nitrogen sources on biodegradation of phenol by immobilized *Acinetobacter sp.* Strain W-17”. African Journal of Biotechnology. Vol.2(1), pp. 8-12. Enero 2003.
- Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F. “Biochemical Engineering”, 2ª Edition, Academic Press, New York, Capítulo 4. 1973
- Allsop, P. J., Chistí, Y. Moo-Young, H. and Sullivan, G. R. “Dynamic of phenol degradation by *Pseudomonas putida*”. Biotechnology and Bioengineering. 41 (5): 572 - 580. 1993.
- Alzarate S. R. A., Botero M. C. A. “Algunas Técnicas usadas en el Tratamiento de Aguas Residuales Fenólicas”. Revista Departamento de Ciencias Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Junio, 20-29, 2000.
- Amsden, B., Bochanysz, J. y Daugulis, A. “Degradation of xenobiotics in a partitioning birreactor in which the partitioning phases is a polymer”. Biotechnology and Bioengineering. Vol 84. N° 4, pp. 399 – 405. 2003
- Andrews, A.T. and Mbafor, W. “Immobilization of enzymes to nylon film”. Biochemical Society Transactions. 19:271 S. 1991.
- Anselmo, A. M., Mateus, M. Cabral, J. M. S. and Nováis, J. M. “Degradation of phenol by immobilized cell of *Fusarium flocciferum*”. Biotechnology Letters. 7 (12): 889 - 894. 1985.
- APHA, AWWA y WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Published by: American Public Health Association. Washington, D.C. 20 th Edition. 1998.
- Bayly, R. C. and Wigmore, G. J. “Metabolism of phenol and cresols by mutants of *Pseudomonas putida*”. Journal of Bacteriology. 113 (3): 1112 - 1120.1973

- Bettmann, H. y Rehm, H. J. "Degradation of phenol by polymer entrapped microorganism". Applied Microbiology and Biotechnology. **20**: 285-290. 1984.
- Beychok, M. R. Aqueous waste from petroleum and petrochemical plants. Willey & Sons. Londres. pp. 38 y 43. 1967.
- Bollag (1979) en Richards, D. J. and Shieh, W. K., "Biological fate of organic priority pollutants in the aquatic environment", Water Research. **20** (9): 1077-1090. 1986.
- Bruce, P y Revel-Chion, L. "Bed porosity in three phase fluidytation". Power Technology. Vol 10, 1974, pp. 243
- Busweil, J. A. "Metabolism of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*". Journal of Bacteriology. **124** (3): 1077 - 1083. 1975.
- Cabrera, L. y Revel-Chion, L. "Tratamiento biológico de un efluente fenólico en un reactor de lecho fluidizado de tres fases". Convención Anual de Asovac. 1981
- Cance, K. E. y H. G., Burke., "Contaminated condensate stripping and industry survey", Pulp and Paper Canada 81 (11), 78-81. 1980.
- Chamberlin, N. S. y A. E. Griffin. "Chemical oxidation of phenolic wastes with chlorine". Sewage and industrial wastes 24. pp. 750. 1952
- Chimielovsky, J. y W. Kuszniak. "Methane fermentation of some phenolic waste-water". Zesz. Nauk. Politech. Alaska. Inz. 9. 1966
- Chudoba,J., Strakova, P. y N. Kondo., "Compartmentalized versus completely-mixed biological wastewater treatment systems". Water Research 25. (8). 973-978. 1991
- Concha G., y Revel-Chion, L. "Biodegradation of phenol by immobilized microorganism". VII World Congress of Chemical Engineering, Secc, Glasgow, Scotland, 10-14 de Julio 2005

- Dikshitulu, S.; Baitzis, B. C. and Lewandowski, G. A., "Competition between two microbial populations in a sequencing fed-batch reactor: Theory, experimental verification, and implications for waste treatment applications"., Biotechnology and Bioengineering. **42**: 643-656. 1993.
- Dixon, M. y Webb, E. C. Enzymes. Academic Press. Nueva York. 1967
- Duran W. y Revel-Chion L. "Biodegradación de Fenol empleando microorganismos inmovilizados". XLV Convención Anual de Asovac. 1995. Caracas
- Eisenhawer, H. R., "Oxidación of phenolic wastes"., Journal of Water Pollution Control Fed. **36** (9), pp. 1116. 1964
- Freeman, H. M., Standard Handbook of Hazardous Waste Treatment and Disposal. Mc Graw-Hill, Nueva York, 1988
- Fuller, R. K. y Tomlin, J. L., " Phenol destruction in foundry wastewater". Modern Casting **6**. 78 : 25-27. 1988.
- García J., Diez F., "Métodos Alternativos para el tratamiento de efluentes fenólicos industriales". Ingeniería Química (Madrid), 151-157, Enero 1989
- Gil, L. H., "Degradación biológica del fenol por lodos activados: respuesta del sistema al incremento de carga", DYNA Revista Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, N.125, 36-40, Julio 1998
- Goldstein, D.; Freeman, A. and Sokolovsky, M., "Chemically modified nylons as supports for enzyme immobilization. Polyisonitrile-nylon"., Journal of Biochemistry. **143**: 497-509. 1974.
- Gómez M. C., "Remoción de Fenoles de las Aguas de Producción de los Campos Trinidad y Barquerena". Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 1998.
- González, M. y Revel-Chion L., "Tratamiento biológico de un efluente fenólico empleando microorganismos inmovilizados"., XLIII Convención Anual de Asovac. p. 97. 1992.

- Grosso, J. L., Díaz, M. P. y León, G. “Biodegradación de fenoles en aguas residuales de la industria petrolera”. Ciencia, Tecnología y Futuro. Vol. 1, N.-1. Dic. 1995.
- Gurol, M. D. y R. Vatista., “Oxidation of phenolic compounds by ozone and ozone + U.V. radiation: a comparative study”., Water Research 21. (8), 895 – 900. 1987
- Heipieper, H. J.; Keweloh, H. And Rehm, H. J., “Influence of phenols on the membrane permeability of free and immobilized bacteria”., DECHEMA Biotechnology Conferences 4. 641-643. 1990.
- Hill, G. y Robinson, C., “Substrate Inhibition Kinetics: Phenol Degradation by *Pseudomonas putida*”. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XVII. pp. 1599 – 1675, 1975
- Hinteregger, C; Leitner, R.; Loidí, M.; Ferschi, A. and Streichsbier, F., “Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII”., Applied Microbiology and Biotechnology, 37: 252-259, 1992.
- Holladay, D. W., Hancher, C. W., Scott, C. D. y Chilcote, D. D., “Biodegradation of phenolic waste liquors in stirred-tank, packed-bed, and fluidized-bed bioreactors”. Journal of Water Pollution Control Federation. 2573-2589. 1978.
- Hoyos Bibian, "Recuperación de fenol de aguas residuales industriales por tratamiento con NaCl", DYNA Revista Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, N.139, 25-34, Julio 2003.
- Inman, D. J., Hornby, W. E. “The immobilization of enzymes on nylon structures and their use in automated analysis”., Biochemical Journal., 129: 255-262. 1972.
- Jones, G. L., Jansen, F., A. J. McKay. “Substrate inhibition of the growth of bacterium NCIB 8250 by Phenol”., Journal of General Microbiology 74., 139 – 148, 1973
- Keith, C.L., “Intermediates in the anaerobic metabolism of benzoic acid”, Diss. Abs. 33 (7). 1973

- Kennedy, J. F., Melo, E. H. "Immobilized enzymes and cells". Chemical Engineering Progress, 81-89, 1990.
- Kennes, C. y Lema, J. M., "Degradation of major compounds of creosotes (PAH and phenols) by *Phanerochaete chrysosporium*"., Biotechnology Letters, 16, (7): 759-764. 1994.
- Korol, S., Orsingher, M., Santini, P., Moretton, J. y D'Aquino, M., "Biodegradation of phenolic compounds. II. Effects of inoculum, xenobiotic concentration and adaptation on *Acinetobacter* and *Pseudomonas* phenol degradation", Revista Latinoamericana de Microbiología, **31**: 117-120, 1989.
- Kotturi, G., Robinson, C. W. y Inniss, W. E., "Phenol degradation by a psychotrophic strain of *Pseudomonas putida*", Applied Microbiology and Biotechnology, **34**: 539-543, 1991.
- Lallai, A y Mura, G. "pH variation during phenol biodegradation in mixed cultures of microorganisms", Water Research, **23** (II): 1335-1338, 1989.
- Ledesma, A. y Revel-Chion L. "Biodegradación de fenol empleando microorganismo inmovilizados". Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela, 2001. (A ser publicado)
- Leuenberger, C., Giger, W., Coney, R., Graydon, J. W. y Molnar-Kubica, E., " Persistent chemicals in pulp mill effluents. Ocurrence and behaviour in an activated sludge treatment plant", Water Research, **19** (7): 885-894, 1985.
- Luthy, G. L. y J. T. Tallon, "Biological treatment of coal gasification process wastewater", Water Research **14**, 1269 – 1282, 1980
- Nakamura, Y, y Sawada, T., "Biodegradation of phenol in the presence of heavy metals", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **75**, pp. 137 – 142, 2000.
- Nakhla, G. y Suidan, M., "Determination of Biomasa Detachment Rate Coefficients in Anaerobic Fluidized Bed GAC Reactors", Biotechnology and Bioengineering, **80**. N° 6, 660 – 669, 2002

Neufeld, R. D; Mack, J. D. y J.P. Strakey., "Anaerobic phenol biokinetics", Journal WPFC 52 (2), 2367 -2377, 1980

Okaygun, M. S., Oreen, L. A. y Akgerman, A., "Effects of consecutive pulsing of an inhibitory substrate on biodegradation kinetics", Environmental Science and Technology 26, (9), 1746-1752, 1992.

Olthof, M. y J. Oleszkiew., "Anaerobic treatment of industrial wastewater", Chem. Eng. 121-126, 1982

Østergaard, K. en J. F. Davidson & Harrison, D. Fluidization. Chapter 18. Academic Press, Londres, 751- 780, 1971.

Østergaard, K. "Fluidization", Chem. Eng. Sci. 20, 470 -472, 1966.

Patterson, J., "Treatment technology for phenols". Wastewater Treatment Technology. Illinois Int. Of Tech. Chicago AM Arbor Science. 199-225. 1980

Perry, R. Perry's Chemical Engineers' Handbook, 7ª Edición, Editorial McGraw Hill. pp. 2-43, 1999

Quail, B. E.y Hill, G. A., "A packed-column bioreactor for phenol degradation: Model and experimental verification", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 52: 545-557, 1991.

Revel-Chion, L. "Fluidized bed enzyme reactor desing including methods of enzyme immobilization", Ph. D. Thesis, University of Birmingham, U.K., 1975.

Revel-Chion L, y Goncalves, J., "Biodegradación de Fenol", Acta Científica, Vol. 34 (1), 1983, p. 369.

Richards, A. D., Fricke, A. M., Scott, J. E., "Phenol Degradation in a Three-Phase Fluidized-Bed Bioreactor", OAK Ridge National Laboratory, AOK Ridge, Tennessee, USA, 1983.

- Salleh, A. B., "Activation of nylon by alkaline glutaraldehyde solution for enzyme immobilization", Biotechnology Letters, **4** (12), 769-774, 1982.
- Sikkema, J; De Bont, J. A. M. y Poolman, B., "Mechanims of membrane toxicity of hydrocarbons", Microbiological Reviews, **59** (2), 201-222, 1995.
- Solomons, G. Química Orgánica. Editorial Limusa. México. 1979
- Spagna, G., Pifferi, P. G. Tramontini, M. y Albertini, A., "Pectinlyase immobilization on polyamides for application in the food processing industry", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **59**, 341-348, 1994.
- Tang, W. y Fan, L., "Steady State phenol degradation in a draft-tube, gas-liquid-solid fluidized-bed bioreactor", AIChE Journal, Vol. 33, N° 2, pp. 239 – 249, 1987
- Thonart, M., Paquot, B., Bajot, D., Dalemans, "Las Células Inmovilizadas. Técnicas de la Ingeniería Bioquímica", Interferón y Biotecnología, Vol. 1, N° 2, pp. 11-24, 1984.
- Watson-Craik, I. A. y Senior, E. "Treatment of phenolic wastewaters by co-disposal with refuse", Water Research, **23** (10), 1293-1303, 1989.
- Wipple, E. B. y Ruta, M. J., Org. Chem, **39**, 1666-1668, 1974.
- Wisecarver, K. D. y Fan, L-S., "Biological phenol degradation in a gas- liquid-solid fluidized bed reactor", Biotechnology and Bioengineering, **33**, 1029-1038, 1989.
- Wu, K. A. y K. D. Wisecarver., "Biological Phenol Degradation in a Countercurrent three-phase Fluidizer Bed Using a Novel Cell Immobilization technique", AIChE Symposium Series 86, (276), 113 – 118, 1990
- Yang, R. D. y Humphrey, A. E., "Dynamic and steady State studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures", Biotechnology and Bioengineering, **27**, 1211-1235, 1975.

## **REFERENCIAS ELECTRÓNICAS**

<http://www.fim.utp.ac.pa/Revista/vol4/Tejedor.html>

## **GACETAS OFICIALES**

Decreto 883, “Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos”, Fecha 18 de Diciembre de 1995, publicado en la Gaceta Oficial N° 5.021