

## Biodegradación Óptima de Compuestos Fenólicos en un Reactor Discontinuo Secuencial

Iván Moreno-Andrade y Germán Buitrón

*Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA),  
Instituto de Ingeniería, Unidad Académica-Campus Juriquilla.*

*Universidad Nacional Autónoma de México.*

*Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, Qro.*

E-mail: gbuitronm@ii.unam.mx

**Palabras clave:** Biodegradación, aclimatación, control óptimo, reactor discontinuo, compuestos fenólicos

**Key words:** Biodegradation, acclimation, optimal control, discontinuous reactor, phenolic compounds

### Resumen

Se estudió la biodegradación de compuestos fenólicos en un reactor discontinuo secuencial con objeto de optimizar un proceso de tratamiento de aguas residuales industriales. La investigación se dividió en dos etapas. En la primera, se evaluó el cambio de la actividad de los microorganismos durante el proceso de aclimatación a los compuestos tóxicos y por la desaclimatación debido a las variaciones de concentración en el influente. El estudio se realizó utilizando una cepa pura (*Pseudomonas aeruginosa*) y un consorcio de microorganismos (lodos activados). En la segunda etapa se evaluó la aplicación de una nueva estrategia de control óptimo para la degradación de aguas residuales inhibitorias conteniendo compuestos fenólicos. En esta parte del estudio se evaluó la implementación práctica de dicha estrategia y su robustez ante situaciones transitorias (picos de concentración) comúnmente encontradas en los efluentes industriales.

### Abstract

The optimal biodegradation of phenolic compounds in a sequencing batch reactor was studied in order to optimize an industrial wastewater treatment process. The research was divided in two experimental sets. In the first one, the variation on the microbial activity during the acclimation process, and the effect of starvation periods due to the variation in the influent concentration, was evaluated. The study was conducted utilizing a pure culture (*Pseudomonas aeruginosa*) and a mixed culture (activated sludge). In the second part, a new optimal control strategy for the degradation of inhibitory industrial wastewaters containing phenolic compounds was tested. In part of the study the practical implementation of the strategy and its robustness to some transitory events (shock loads) commonly found in industrial wastewaters was evaluated.

---

### INTRODUCCIÓN

El proceso por lodos activados es el más ampliamente utilizado para tratar las aguas residuales industriales. La descarga de las industrias farmacéutica, química y petroquímica,

plásticos, papel y celulosa, etc., contiene compuestos tóxicos inhibitorios que pueden variar en flujo y concentración. Esto trae como consecuencia que los procesos continuos

presenten bajas eficiencias de degradación. Con el fin de evitar este problema y aumentar las eficiencias de degradación, se ha explorado el uso de reactores discontinuos secuenciales o SBR (Sequencing Batch Reactor, por sus siglas en inglés) (Wilderer *et al.*, 2001). En general, los SBR presentan tres características importantes: la repetición periódica de una secuencia de fases bien definida; la duración de cada fase del proceso se determina de acuerdo con el resultado de tratamiento esperado; y algo muy importante, el proceso se realiza en función del tiempo, y no en función del espacio como sucede en un proceso continuo. Por su flexibilidad, los sistemas SBR son susceptibles a ser totalmente automatizados y controlados por una computadora.

Los sistemas de tipo SBR funcionan generalmente bajo cinco fases: llenado, reacción, sedimentación, vaciado, y tiempo muerto. En el modo usual de operación, la duración de estas fases es determinada típicamente por un operador basado en su experiencia y en exhaustivas pruebas en el laboratorio con una planta experimental. En este modo de operación, la fase de reacción es suficientemente larga para permitir que las sustancias tóxicas sean degradadas. La duración de las fases de sedimentación y vaciado se fijan de acuerdo con las características de la biomasa y del reactor. Por ello se considera a esta estrategia operacional como estrategia de tiempo fijo.

A pesar de sus ventajas, cuando los procesos discontinuos funcionan bajo el modo usual de operación (fases con tiempos fijos), se han observado problemas de inhibición de los microorganismos derivados de un aumento repentino en la concentración de compuestos tóxicos (picos de concentración), desaclimatación y problemas por ayuno de los microorganismos lo cual se refleja en bajas eficiencias en la degradación de compuestos tóxicos (Buitrón y Moreno 2002; Buitrón *et al.*, 2003).

El objetivo de este trabajo fue contribuir a la solución del tratamiento de aguas residuales

industriales contaminadas por compuestos fenólicos por medio de la optimización de un reactor discontinuo secuencial. La investigación se dividió en dos etapas: una fundamental para evaluar los cambios de actividad de los microorganismos presentes en el proceso, y otra aplicada en donde se maximizó la velocidad de degradación por medio de una estrategia de control óptimo basada en la estimación en línea de la actividad respiratoria de los microorganismos.

### MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo empleando un agua residual sintética conteniendo 4-clorofenol (4CF) como única fuente de carbono y energía. Se agregaron nutrientes (nitrógeno, fósforo y oligoelementos) de acuerdo con Moreno-Andrade y Buitrón (2006). La investigación se dividió en dos etapas. En la primera, se evaluó el cambio de la actividad de los microorganismos durante el proceso de aclimatación al 4CF y por la desaclimatación debido a las variaciones de concentración en el influente. El estudio se realizó utilizando una cepa pura (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145) y un consorcio de microorganismos (lodos activados). En esta etapa se determinaron los parámetros cinéticos, fisicoquímicos y respirométricos. En el caso de la cepa pura se evaluó la pérdida de viabilidad de las células debido al ayuno, por medio de las técnicas de cuenta heterótrofa en placa y citometría de flujo.

En el caso de los lodos activados, se analizó la aclimatación a tres diferentes bloques de experimentos, con concentraciones iniciales de 4CF de 50, 100 y 200 mg/L (AC50, AC100 y AC200). Una vez que la biomasa fue aclimatada, se expuso a diferentes periodos de ayuno, para ello, los microorganismos se mantuvieron en condiciones endógenas, en ausencia de sustrato y solo con suministro de aire. Este procedimiento simula las variaciones de concentración frecuentemente encontradas en los efluentes industriales. Para cada biomasa aclimatada a 50, 100 y 200 mg/L

(DA50, DA100 y DA200) fueron estudiados distintos tiempos de ayuno: para DA50: 8, 12 y 24 h; para DA100: 12 y 24 h; y para DA200: 12, 24 y 36 h. En cada una de las condiciones de ayuno la biomasa fue recuperada a su actividad inicial, es decir, la actividad observada antes de ser expuesta al ayuno. Esta actividad fue recuperada por medio de una reaclimatación que consistió en controlar el tiempo de degradación de manera que el tiempo de reacción fuera suficiente para permitir una completa degradación del 4CF en cada ciclo, hasta recobrar el tiempo de degradación observado antes del ayuno.

Se realizó un análisis de los cambios en la comunidad microbiana durante la aclimatación de los lodos activados empleando técnicas de biología molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*), clonado y secuenciación. El ADN total fue extraído a partir de muestras de 2 mL del lodo activado usando un kit de aislamiento de ADN (Ultra clean™ Soil DNA isolation kit, MoBio). La amplificación por PCR fue realizada de acuerdo con un ciclo de temperatura recomendado por BioRad, con el siguiente programa: activación inicial 95°C (15 min), 35 ciclos de: desnaturación 94°C (1 min), 53°C para alineación (1 min) y elongación a 72°C (1 min) y una extensión final a 72°C (1 min). Los primers universales GC-338F y 518R fueron utilizados para la amplificación de acuerdo con Muyzer *et al.* (1995). Los productos de PCR fueron separados por la técnica de DGGE usando el sistema D-code universal mutation detection system (BioRad, Hercules, CA) según lo descrito por Muyzer *et al.* (1995). Las porciones centrales de las bandas seleccionadas fueron cortadas y los amplicons extraídos fueron utilizados como plantilla para la re-amplificación. Estos productos de PCR fueron clonados en el plásmido PCR2.1-TOPO (Invitrogen, USA.). Los clones positivos fueron secuenciados con el primer M13 reversa (5'-CAGGAAACAGCTATGAC) en un secuenciador ABI

Prism 3100 DNA sequencer. La identificación de los clones se realizó por medio de una búsqueda en la base de datos GenBank por medio del software BLAST (del NCBI, *National Center for Biotechnology Information*).

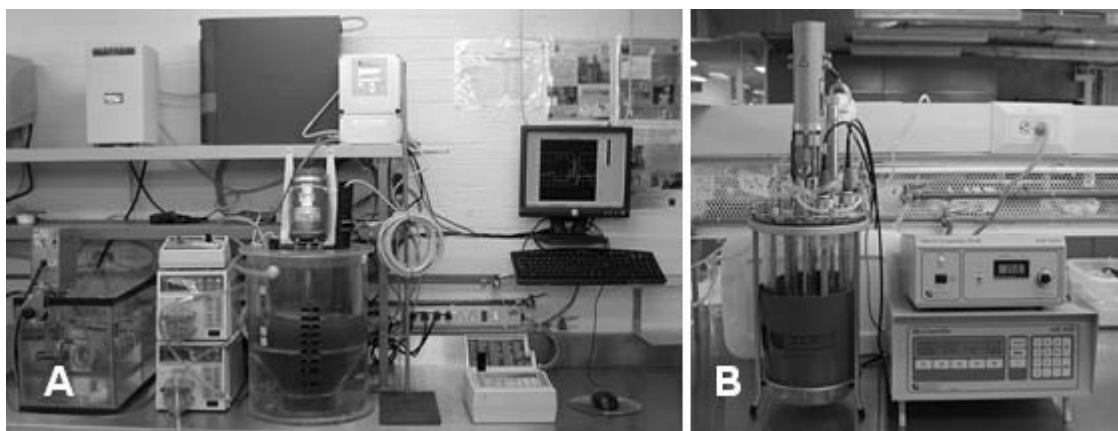
En la segunda etapa se evaluó la aplicación de una nueva estrategia de control óptimo para la degradación de aguas conteniendo 4CF. En esta parte del estudio se evaluó la implementación práctica de dicha estrategia y su robustez ante situaciones transitorias (picos de concentración) comúnmente encontradas en los efluentes industriales. La estrategia de control se basa en realizar un llenado óptimo con el fin de mantener a los microorganismos cerca de su máxima tasa de degradación, es decir a la máxima actividad sin que exista inhibición por la concentración de compuestos tóxicos y así evitar su ayuno. Se evaluó la implementación práctica la estrategia en la degradación de 4CF. Se expuso el reactor controlado a la degradación de aumentos puntuales de la concentración de 4CF (3000, 5000 y 7000 mg/L). También se probó el uso de la estrategia en la degradación de aguas residuales municipales mezcladas con diferentes concentraciones de fenol. Para este bloque de experimentos se emplearon microorganismos aclimatados a la degradación de 4CF y fenol, respectivamente.

### *Reactores piloto*

Se emplearon dos SBR aerobios para la realización de los experimentos. El primero fue usado para los experimentos con lodos activados (Fig. 1A) y el segundo reactor fue operado exclusivamente en los experimentos con la cepa pura (Fig. 1B). El primer SBR fue un biorreactor aerobio instrumentado con un volumen útil de de 7 L y un volumen de intercambio de 57%. El reactor fue agitado a 120 rpm. El flujo de aire empleado fue 1.5 Lpm (0.2-0.4 vvm) y la temperatura fue controlada a 20 ± 0.2°C, El reactor fue equipado con un sensor en línea de oxígeno disuelto y temperatura (Hendress+Hauser), bombas de

alimentación y vaciado (Masterflex). El llenado, tiempo de aeración, y vaciado del SBR fueron automatizadas. El SBR fue operado con los siguientes tiempos en cada etapa: preaeración: 15 min; llenado: 5 min; reacción: variable dependiendo del tiempo necesario para conseguir una eficiencia de degradación de 4CF de 99%; sedimentación: 12

a 30 min. El biorreactor fue inoculado con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (2000 mg de sólidos suspendidos volátiles/L). Para el caso de la evaluación de los picos de concentración se agregaron los nutrientes respetando la misma relación concentración de fenol/nutrientes.



**Fig. 1.** Biorreactores automatizados empleados para la degradación de compuestos fenólicos, A) Lodos activados, B) Biorreactor para cultivos puros.

Para los experimentos con la cepa pura se empleó un reactor SBR esterilizable (Applikon) con una capacidad de 7 L y un volumen útil de 4 L. La temperatura fue mantenida en  $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$  dentro del reactor por medio de una resistencia controlada. El reactor estaba conectado a un BioControlador (Applikon ADI 1030 Bio Controller), el cual controlaba su temperatura, así como la agitación (150 rpm), el oxígeno disuelto (70% del valor de saturación del medio líquido) y el pH dentro del mismo. El cultivo fue agitado a una velocidad de 150 rpm. El biorreactor fue esterilizado e inoculado con una cepa pura (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145). Como sustrato se empleó agua sintética conteniendo 25 mg/L de 4CF como única fuente de carbono y energía.

En todos los casos la aclimatación de los microorganismos se realizó por medio de la estrategia de tiempos de reacción variables y eficiencias fijas (Moreno-Andrade & Buitrón, 2006). Las técnicas analíticas empleadas fueron de

acuerdo con APHA (1992): Fenoles totales por 4-aminoantipirina, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Carbono Orgánico Disuelto (COD), Sólidos Suspendidos Volátiles y Totales (SSV y SST) y la Respirometría (tasa específica de consumo de oxígeno, TECO). El análisis de toxicidad se realizó por medio del método Microtox (ASTM D-5660-96, 2004).

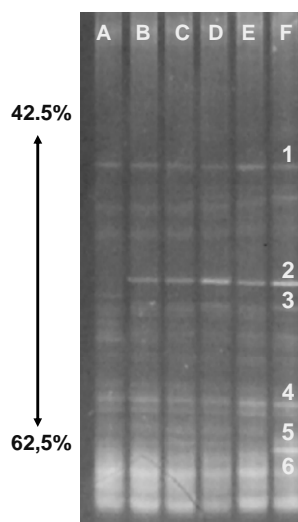
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Aclimatación y desaclimatación de los microorganismos*

Se observó que durante la aclimatación de los lodos activados al 4-clorofenol se genera un aumento exponencial en la tasa específica de degradación (reportados en Moreno-Andrade & Buitrón 2004). Los resultados coinciden con los presentados por Buitrón *et al.*, 1998, donde reportaron que el aumento exponencial de la tasa de degradación de 4CF podría explicarse por una

multiplicación de los microorganismos especializados. Dado que en este caso la única fuente de carbono y energía del medio fue el 4CF, la una selección de microorganismos especializados pudo ser debida debido a la presión de selección ocasionada por el compuesto tóxico. Esto coincide con los resultados del análisis de la comunidad por medio del DGGE (Fig. 2). En este estudio se demostró que durante la aclimatación existió un aumento (multiplicación) de una

población inicial pequeña de microorganismos del género *Pseudomonas* (banda 2 del gel en la Fig. 2). Se ha reportado que los microorganismos del género *Pseudomonas* presentan la capacidad de degradar clorofenoles como única fuente de carbono (Radehaus & Schmidt, 1992). Es posible concluir que durante la aclimatación existe una selección y multiplicación microorganismos especializados en la degradación del clorofenol, en este caso *Pseudomonas* sp.



Banda	Secuencia Determinada (pb)	Afiliación filogenética	Similaridad (100%)	NCBI GenBank
1	ND	ND	ND	ND
2	195	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	AY269867.1
3	168	<i>Novosphingobium subarticum</i> strain	99	AY167828.1
4	195	Bacteria no cultivable	100	UEU409001
5	170	<i>Hyphomicrobiaceae</i> No cultivable	100	AY710861.1
6	143	<i>Paracoccus</i> sp.	85	AY312056.1

ND= No determinada

**Fig. 2.** Análisis de la comunidad durante la aclimatación. La tabla muestra los microorganismos identificados en base a la secuenciación de los clones obtenidos. Cada microorganismo identificado corresponde a una banda presentada en gel del DGGE. A) Inóculo (0 h), B) 24 h, C) 48 h, D) 72 h, E) 96 h, F) 120 h.

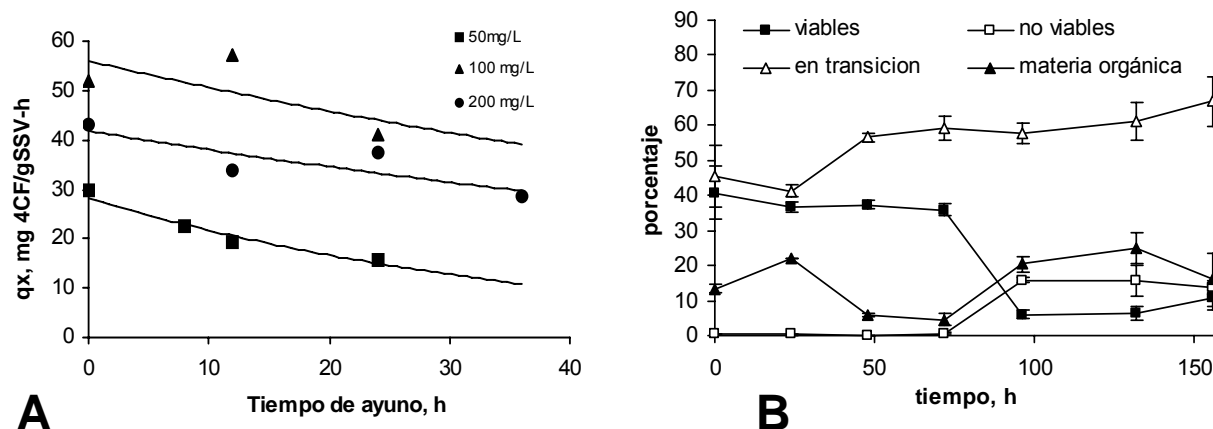
Los experimentos de ayuno demostraron que estos periodos de estrés generan disminución de la actividad microbiana (medida como TECO) y de la tasa específica de degradación,  $q$ , (Fig. 3A). En general, debido a la introducción de ayunos (entre 8 y 36 h), se observó un decremento entre 21 y 44% en la  $q$  y una pérdida de la actividad respirométrica entre el 26 y 35%. El grado del desaclimatación o porcentaje de pérdida de actividad de los microorganismos a la degradación del 4CF debido al ayuno parece ser determinado por la historia de la biomasa. Se evidenció que el efecto del ayuno sobre la tasa de degradación es menos significativo

cuando los microorganismos son puestos en condiciones de ayuno, re-aclimatados y sujetos posteriormente a un ayuno. Este efecto no fue observado cuando los ayunos son cíclicos y no hay un período de re-aclimatación intermedio. En cualquier caso, existió una disminución de la actividad de los microorganismos generada por el ayuno, lo cual afecta la actividad de los microorganismos en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Para verificar si la disminución de actividad por ayuno no solo es debida a una selección de especies, sino también a una pérdida de actividad y

viabilidad de los microorganismos, se utilizó una cepa pura. Los experimentos con *Pseudomonas aeruginosa* mostraron que la pérdida de actividad para degradar el sustrato tóxico esta relacionada con la disminución de la viabilidad celular. En la Fig. 3B es posible observar que existe un rápido incremento en el porcentaje de células muertas entre 72 y 96 h de ayuno (16% de las células mueren). Este fenómeno coincide con la disminución de las células viables iniciales de 40 a 8% (pérdida de viabilidad en 80% de las células iniciales). Para este caso, periodos de ayuno superiores a 72 h producen severos cambios en la viabilidad de las células, ya que menos del 10% de

la población se mantiene viable. Un punto de discusión interesante es que para el caso de más de 96 h de ayuno, los porcentajes de las células viables y no viables se estabilizan; sin embargo la actividad de los microorganismos para degradar el 4CF continúa disminuyendo. La tasa específica de degradación mostró que existe un decremento de  $16 \times 10^{-8}$  a  $6.51 \times 10^{-8}$  mg 4CF/Unidades formadoras de colonias/h debido a la exposición de la biomasa aclimatada a un ayuno de 132 h. Esto demuestra que existe disminución en la tasa de degradación relacionada con la pérdida de la actividad degradadora de los microorganismos.



**Fig. 3.** A) Influencia del tiempo de ayuno sobre la tasa específica de degradación de los lodos activados. Los resultados son comparados con las condiciones iniciales antes de la perturbación. B) Cambios en la viabilidad determinada por citometría de flujo debido al ayuno en la cepa pura *Pseudomonas aeruginosa*. Nota: Las células en transición son células vivas no viables (con la membrana dañada pero no muertas, por lo cual podrían o no volver a recobrar su viabilidad).

Para el caso de 132 y 156 h de ayuno, la biomasa fue seriamente inhibida y se presentó un residual de 4CF de 78 y 84% respectivamente (publicado en Moreno-Andrade & Buitrón, 2007). Esto indica que no solamente existe un decremento de la viabilidad de las células durante al ayuno, sino también existe disminución de la actividad para degradar 4CF. Por lo anterior se puede concluir que para el caso lodos activados no sólo hay cambios en la dinámica poblacional, ya que algunas

especies mueren y otras resisten a la exposición a periodos de ayuno, sino que también existe pérdida de la actividad degradadora y en la viabilidad de las células.

#### Estrategia de tiempo óptimo

En el modo usual de operación de los SBR, la duración de cada una de estas fases es determinada típicamente por un experto, basado en su experiencia y pruebas en laboratorio con una

planta experimental. Generalmente, la fase de la reacción se fija de forma que sea suficientemente larga para permitir que las sustancias tóxicas sean degradadas. Sin embargo, presentan problemas cuando se aplican en la degradación de aguas residuales tóxicas: inhibición y desaclimatación de los microorganismos, problemas debidos a aumentos puntuales en la concentración de de compuestos tóxicos (picos de concentración), y problemas de ayuno de los microorganismos, causando bajas eficiencias de degradación en el proceso y por lo tanto un tratamiento deficiente del agua residual (Buitrón *et al.*, 2004).

Para superar estos problemas, se propuso el uso de una nueva estrategia de control llamada Control de Tiempo Óptimo Dirigido por Eventos o ED-TOC (Betancur *et al.*, 2006). La estrategia de control requiere solamente la medida en línea de la concentración de oxígeno disuelto, el valor del coeficiente de transferencia de masa del oxígeno ( $k_L a$ ) y el volumen del reactor, para controlar el caudal del influente de modo que la tasa de degradación del sustrato se mantenga alrededor de su valor máximo durante la toda la fase de llenado y reacción. La ventaja de la estrategia es que no requiere el uso de modelos matemáticos complejos, ni de parámetros cinéticos del proceso. Lo anterior hace que la estrategia de control óptimo sea fácilmente aplicable en una planta de tratamiento.

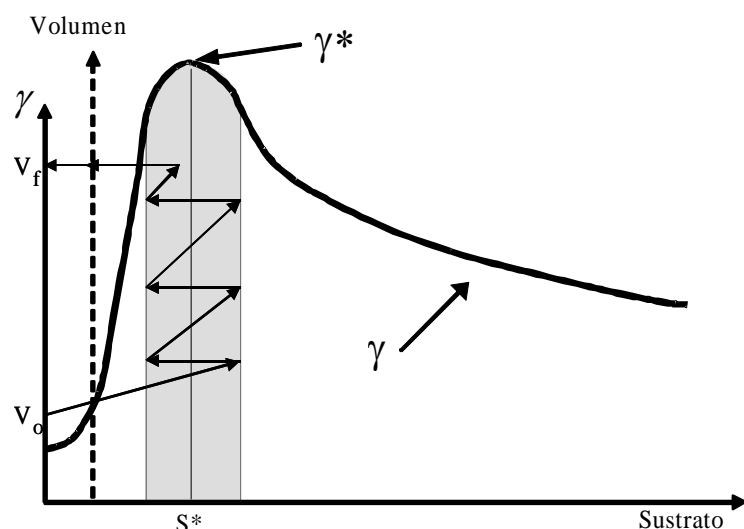
La estrategia ED-TOC estima una variable llamada gama ( $\gamma$ ) relacionada con la tasa de reacción. Esta variable se puede estimar en tiempo real usando la concentración de oxígeno disuelto y el volumen del reactor. A continuación se describe brevemente el método de estimación (el desarrollo matemático se encuentra completamente descrito en Moreno *et al.*, 2006). Se sabe que para compuestos tóxicos el comportamiento de la tasa de crecimiento de la biomasa ( $\mu$ ), o la tasa de degradación de sustrato, en función de la concentración del sustrato (S) se puede describir por la ley de Haldane. En este modelo,  $\mu$  alcanza un valor máximo,  $\mu^*$ , cuando la concentración del

sustrato es  $S^*$ . La concentración tóxica sobre o debajo de  $\mu^*$  generará una disminución en la tasa de crecimiento y, por lo tanto, también en la tasa de reacción. Así, si se garantiza que S está cerca a  $S^*$ , la tasa de degradación estará cerca de un valor máximo. El problema consiste, por lo tanto, encontrar y mantener  $\mu$  en su valor máximo durante todo el período de reacción del reactor. Un problema adicional es que  $\mu$  es muy difícil en la práctica medir en línea la concentración del sustrato. Es interesante precisar que en la estrategia de control se desarrolló un método para estimar  $\gamma$  y relacionarla con  $\mu$  de manera tal que ambos se encuentren en su valor máximo. Esto se realizó por medio de un balance de materia considerando las fases de llenado y reacción del SBR. Así,  $\gamma$  esta definida por la ecuación 1:

$$\gamma = k_L a (O_s - O)V + (O_{in} - O)Q_{in} - V \frac{dO}{dt}$$

donde  $\gamma$  es la tasa de consumo másico de oxígeno ( $\text{mgO}_2/\text{h}$ ),  $k_L a$  es el coeficiente de transferencia de masa del oxígeno ( $\text{h}^{-1}$ ),  $O_s$  es la concentración de saturación del oxígeno disuelto ( $\text{mg/L}$ ),  $O$  es la concentración del oxígeno disuelto en el reactor ( $\text{mg/L}$ ),  $V$  es el volumen del reactor (L) y  $O_{in}$  es la concentración de oxígeno disuelto en el influente ( $\text{mg/L}$ ).

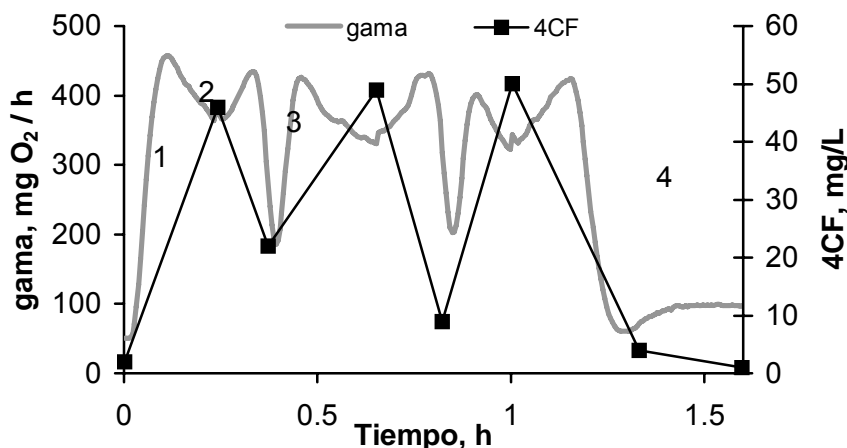
La Fig. 4 presenta el comportamiento de  $\gamma$  en función de la concentración del sustrato. Es claro en la ecuación 1 que  $\gamma$  es una función semejante a  $\mu$ , por lo cual ambas variables alcanzan sus valores máximo  $\gamma^*$  y  $\mu^*$  simultáneamente cuando  $S=S^*$ . De manera que si se mantiene  $\gamma$  en su máximo valor ( $\gamma^*$ ) durante toda la fase de llenado y reacción, se obtendrá la máxima velocidad de degradación, evitando la inhibición y minimizando el tiempo de reacción. Los únicos parámetros necesarios para calcular  $\gamma$  son el  $k_L a$ , la concentración de saturación del oxígeno disuelto ( $O_s$ ), y la concentración del oxígeno disuelto en el influente ( $O_{in}$ ).



**Fig. 4.** Estrategia de control ED-TOC. La estrategia controla el suministro del sustrato al reactor para mantener el valor de  $\gamma$  cerca de  $\gamma^*$ . El  $V_0$  indica el volumen inicial en el tanque. El flujo se alimenta al reactor de tal manera que se mantenga la tasa de degradación alrededor del valor óptimo (zona gris). Una vez que se alcance el volumen final,  $V_f$ , el reactor continúa su funcionamiento como un batch clásico con lo cual la tasa de degradación disminuye.

La estrategia de control funciona encendiendo o apagando la bomba de llenado (zona gris de la Fig. 4). La Fig. 5 presenta la cinética de 4CF, OD y  $\gamma$  durante un ciclo de degradación en el reactor controlado por la estrategia ED-TOC. Es posible distinguir el funcionamiento del control si se sigue el comportamiento del 4CF y de  $\gamma$  en la cinética de degradación. Una vez que el influente comienza a ser alimentado al reactor, la reacción comienza. El estimador calcula  $\gamma$  y monitorea su valor. Cuando el control detecta que el punto máximo de  $\gamma$  ha pasado, la bomba de alimentación se apaga (0.3 h, punto 2, Fig. 5). Los microorganismos degradan el sustrato y el valor de  $\gamma$  vuelve a pasar por su valor

máximo ( $\gamma^*$ ) y disminuye debido a que la concentración de sustrato es más baja que  $S^*$  (la concentración de 4CF ha pasado de 48 a 22 mg 4CF/L, observable a las 0.4 h, punto 3, Fig. 5). El control detecta este cambio, con lo cual se enciende la bomba de alimentación nuevamente, y una nueva carga de sustrato se alimenta al reactor. Este procedimiento se repite hasta que se ha alcanzado el volumen máximo del reactor y entonces la degradación continúa como en una reacción en lote ordinario, terminando la reacción cuando el  $\gamma$  está en un valor mínimo y constante (a partir de las 1.6 h, punto 4, Fig. 5).



**Fig. 5.** Evolución de la concentración de sustrato y  $\gamma$  (gama) en un ciclo bajo estrategia ED-TOC.

El SBR fue operado con la estrategia ED-TOC durante más de 450 ciclos de operación (100 días) en la degradación de 4CF, en las condiciones estándar (degradando 350 mg 4CF/L), de manera estable y reproducible. La mineralización del 4CF fue terminada de manera satisfactoria, con eficiencias de biodegradación mayores al 99.9% como 4CF y mayores a 98% como DQO o carbono orgánico. Los sólidos suspendidos totales en el efluente se mantuvieron debajo de 40 mg/L, valor requerido en la norma oficial mexicana para una descarga en un río o para su uso en riego agrícola o uso público urbano con previo tratamiento (NOM-001-ECOL-1996). Los lodos mostraron excelente sedimentabilidad sin importar que la tasa de degradación de los microorganismos se mantuviera en su valor máximo. La velocidad de sedimentación se mantuvo alrededor de 3 m/h y el índice volumétrico de lodos menor a 90 mL/g. Adicionalmente, se evaluó la variación del flujo de oxígeno, cambios en la concentración de biomasa en el reactor y variaciones del pH dentro del proceso encontrando que la estrategia ED-TOC fue robusta ante estas variaciones mostrando una excelente respuesta en el control del proceso.

Debido a que la estrategia de control óptimo permitió que la degradación ocurra a una tasa cercana al máxima durante la toda la fase de reacción, fue posible la biodegradación eficiente de efluentes conteniendo concentraciones de fenol y 4-clorofenol entre valores de 750 hasta 7000 mg/L sin ningún tipo de inhibición, lo cual no había sido posible por ningún proceso biológico. De hecho, este tipo de concentraciones pueden ser consideradas como un residuo peligroso. Se ha reportado que para los procesos continuos por lodos activados, la concentración máxima de fenoles que puede ser degradada es de 10 mg/L (Ellis *et al.*, 1996). Para el caso de reactores discontinuos los límites reportados son 1200 mg de fenol/L (Tziotzios *et al.*, 2005) y de 500 mg 4CF/L

(Buitrón *et al.*, 2005). Por lo anterior, esta estrategia demostró ser un excelente candidato para degradar efluentes industriales con altas concentraciones de efluentes inhibitorios. La Fig. 6 muestra una cinética de degradación de 7000 mg 4CF/L por medio de la estrategia ED-TOC. La degradación del sustrato se llevó a cabo en 42 h. Al comparar la estrategia ED-TOC con el modo usual de operación de los SBR se encontró que, para degradar la misma concentración de 4CF, el tiempo de degradación fue menor al emplear la estrategia ED-TOC (reducción del tiempo de degradación entre 25% y 52% para la degradación de 350 y 7000 mg 4CF/L, respectivamente). La estrategia de control mostró la factibilidad de ser empleada en forma práctica en el laboratorio. Adicionalmente la estrategia ED-TOC fue evaluada a una planta prototipo industrial de 1 m<sup>3</sup> degradando agua residual conteniendo 4CF (Fig. 7). La estrategia de control demostró que es robusta y estable al ser aplicada en el biorreactor por períodos largos de operación (más de 2 meses). Las eficiencias de degradación de 4-clorofenol fueron mayores a 99.9% y a 98% como 4CF y DQO respectivamente. La estrategia de control óptimo pudo manejar incrementos en la concentración de 4CF en el influente de 1000 mg/L sin problemas de la inhibición. Los resultados del escalamiento del reactor a un prototipo industrial se encuentran reportados en Buitrón *et al.*, (2007).

Un análisis de la comunidad por medio de la técnica de DGGE demostró que a pesar de que la estabilidad del sistema fue demostrada por medio de los parámetros fisicoquímicos, se evidenció una fuerte dinámica entre las poblaciones que llevan a cabo la degradación del 4CF, ya que algunas poblaciones mostraron mayor o menor dominancia y otras desaparecieron durante la operación del reactor a largo plazo. Así mismo se demostró que el proceso no solo eliminó el compuesto original y la DQO, sino que también se eliminó la toxicidad del 4CF (medida por medio del sistema Microtox).

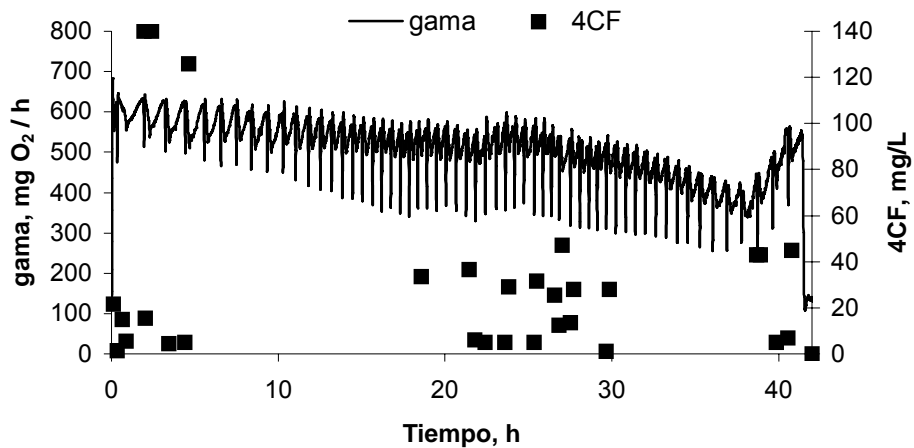


Fig. 6. Degradación de 7000 mg 4CF/L por medio de la estrategia de control óptimo.



Fig. 7. Planta piloto industrial de 1 m<sup>3</sup>

## CONCLUSIONES

Se evidenció que el grado de desaclimatación de los microorganismos en ayuno es determinado por la historia de la biomasa. El efecto del ayuno sobre la tasa de degradación es menos significativo cuando los microorganismos son sometidos a condiciones de ayuno, re-aclimatados y sujetos nuevamente a condiciones de ayuno. Para maximizar la degradación y evitar la desaclimatación de la biomasa activa es necesario que los microorganismos se mantengan cerca de la

máxima tasa de degradación durante toda la fase de reacción.

Con la estrategia de control propuesta fue posible la biodegradación eficiente de sustancias inhibitorias sin importar las variaciones de concentración de compuestos fenólicos en la alimentación, ya que la tasa de degradación de los microorganismos se mantiene en valores cercanos al máximo durante todo el ciclo de reacción, por lo cual la concentración del compuesto tóxico no llega a valores que sean inhibitorios para los microorganismos. Se demostró que la

implementación práctica de la estrategia fue factible en un prototipo industrial de 1 m<sup>3</sup>.

## AGRADECIMIENTOS

Al financiamiento de CONACYT a través del proyecto 46093Y. Iván Moreno Andrade agradece a CONACYT la beca de posdoctorado otorgada (*IdAP 10310*). Este trabajo incluye resultados del proyecto EOLI del programa INCO de la Unión Europea (ICA4-CT-2002-10012). Se agradece la asistencia técnica de Jaime Pérez Trevilla y Gloria Moreno.

## REFERENCIAS

- ASTM D 5660-96 (2004) Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium. American Society for Testing and Materials Standards, EEUU.
- AFNOR (1985) Evaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles, Normalisation française, NFT 90-312. Francia.
- APHA (1992) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA/AWWA/WEF. 18<sup>th</sup> ed., Washington DC. Part 2000 y 5000.
- Betancur MJ, Moreno JA, Moreno-Andrade I & Buitrón G (2006) Practical optimal control of fed-batch bioreactors for the wastewater treatment. *Int. J. Robust Nonlinear Control*. 16: 173-190.
- Buitrón G, Gonzalez A & Lopez-Marin LM (1998) Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Sci. Technol.* 37: 371-378.
- Buitrón G & Moreno J (2004) Modeling of the acclimation/deacclimation processes of a mixed culture degrading 4-chlorophenol. *Water Sci. Technol.* 49: 79-86.
- Buitrón G, Moreno-Andrade I, Linares-García JA, Pérez J, Betancur MJ, & Moreno JA (2007) Evaluation of an optimal fill strategy to biodegrade inhibitory wastewater in an industrial-prototype discontinuous reactor. *Water Sci. Technol.* 55: 47-54.
- Buitrón G, Schoeb M-E & Moreno J (2003) Automated Sequencing Batch Bioreactor Under Extreme Peaks of 4-Chlorophenol. *Water Sci. Technol.* 47: 175-181.
- Ellis TG, Smets BF, Magbanua BS & Grady CPL Jr (1996) Changes in measured biodegradation kinetics during the long-term operation of completely mixed activated sludge (CMAS) bioreactors. *Water Sci. Technol.* 34: 35-42.
- Moreno JA, Betancur MJ, Buitrón G & Moreno-Andrade I (2006) Event-Driven Time-Optimal Control for a class of discontinuous bioreactors, *Biotech Bioeng.* 94: 803-814.
- Moreno-Andrade I & Buitrón G (2004) Variation of the microbial activity during the acclimation phase of a SBR system degrading 4-chlorophenol. *Wat. Sci. Technol.* 50: 251-258.
- Muyzer G & Ramsing NB (1995) Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Arch. Microbiol.* 32: 1-9.
- Radehaus PM & Schmidt SK (1992) Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2879-2885.
- Tziotziou G, Teliou M, Kaltsouni V, Lyberatos G & Vayenas DV (2005) Biological phenol removal using suspended growth and packed bed reactors. *Biochem. Eng. J.* 26: 65-71.
- Wilderer PA, Irvine RL & Goronszy MC (2001) Sequencing batch reactor technology. Scientific and technical report No 10, IWA Publishing, London. 76 pp.