

Universidad Tecnológica de Panamá
Facultad de Ingeniería Civil

Tesis

Eficiencia de degradación de DQO y naftaleno utilizando la especie
***Rhodococcus equi*, en un reactor en continuo a escala de laboratorio**

Presentado por:

Arenas M., Lourdes P. 8-848-1326

Pérez E., Aminta A. 4-755-1378

Trabajo de Graduación presentado a la Universidad Tecnológica de
Panamá como requisito para optar por el título de Licenciatura en
Ingeniería Ambiental

Panamá, República de Panamá

2014

RESUMEN

La presente investigación tuvo como principal objetivo, evaluar la eficiencia de degradación de Demanda Química de Oxígeno y naftaleno de la cepa *Rhodococcus equi*, utilizando agua artificial de refinería la cual contenía naftaleno, el mismo se encuentra en el grupo de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Para tales fines se utilizó un reactor aerobio en continuo a escala de laboratorio, como aporte en el futuro para plantas de tratamiento de industrias que contengan el Hidrocarburo. La bacteria *Rhodococcus equi*, fue aislada de los sedimentos recolectados en la Bahía de Manzanillo, Provincia de Colón.

Las fases de prueba se dividieron en dos (2) etapas, la primera la cual duro un periodo aproximado de doce (12) días, donde el tiempo de retención que se les dio a la bacteria para que hicieran el trabajo de degradación fue de veinticuatro horas (1 día), y la segunda fase también alrededor de quince (15) días con un tiempo de retención de cuarenta y ocho horas (2 días). Las muestras fueron recolectadas en cada fase al finalizar cada tiempo de retención estipulado, para realizar diferentes pruebas, como lo son: temperatura, potencial de hidrógeno, Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Bioquímica de Degradación (DBO₅), Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV), Sólidos Disueltos Totales (SDT), entre otras. Para el análisis de la muestras se utilizó la guía del Standard Methods (1980). El naftaleno se analizó por cromatografía líquida (HPLC).

En el Escenario 1, se logró observar que el crecimiento de la cepa bacteriana tomó una respuesta positiva a la alimentación del reactor con carga orgánica (en términos de la DQO) y naftaleno obteniendo crecimientos de hasta aproximadamente ocho órdenes de magnitud mayor (6×10^{13}) en UFC/mL, en relación a la inoculada ($7,85 \times 10^6$), esto bajo una temperatura de $23.57 \text{ }^\circ\text{C}$ y un pH de 6.71. Mientras que en el Escenario 2, se observó un crecimiento mucho mayor al del Escenario 1. La inoculación fue de 3.00×10^9 UFC/mL y el máximo crecimiento en este escenario fue de 2.17×10^{11} UFC/mL.

Se pudo comprobar la eficiencia de degradación de naftaleno de la cepa *Rhodococcus equi*, a la salida del reactor en relación con la entrada al mismo, logrando el 100 % de consumo del hidrocarburo, la máxima eficiencia de degradación en DQO fue 36,44% y en DBO_5 fue 66,19%, esto se da cuando el tiempo de retención hidráulica en el reactor es mayor, como fue el caso de Escenario 2, donde el TRH fue de 48 horas. Mientras que los porcentajes de eficiencias en el Escenario 1 fueron menores en comparación con el Escenario 2. De esta manera se comprueba que al aumentar el tiempo de retención hidráulico, aumenta la eficiencia de la Cepa de realizar su trabajo de degradación en el reactor.

Por otra parte se recomienda comprobar la eficiencia de degradación, de la cepa *Rhodococcus equi*, tomando otros tiempo de retención hidráulica y caudales de entrada. Analizar el desempeño de la Cepa con otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. También es favorable realizar otros estudios en los cuales se ensaye la eficiencia de degradación de la Cepa, en función de

cambios en los parámetros de diseño del reactor en continuo; además, de trabajar con una combinación de cepas, para aumentar la Eficiencia de Biodegradación de Naftaleno y otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Se deben continuar estudios sobre el aislamiento e identificación de especies nativas en sitios contaminados.

DEDICATORIA

A Dios, por haberme bendecido, guiado y brindado la sabiduría e inteligencia necesaria para realizar esta investigación, para alcanzar mi meta a pesar de los obstáculos que se presentaron en el camino y darme la fuerza y aliento para seguir adelante.

A mis familiares, en especial a mis padres y hermano, por todo su apoyo, motivación y los sacrificios realizados para que pudiera culminar mis estudios con éxito y teniendo la certeza de que seguirán haciéndolo.

A mis amigos y compañeros, con los que compartí a lo largo de mi camino universitario demostrándome su más sincero apoyo.

A mis profesores, que a lo largo de este camino me brindaron día con día, sus conocimientos, apoyo, orientación y experiencia para culminar con éxito esta meta trazada.

Aminta Alexandra Pérez Espinosa

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios, quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaron. Enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia, en especial a mis padres por su apoyo incondicional, consejos y ayuda. Y a mis hermanos, por estar siempre presente acompañándome para poder culminar esta meta lograda.

A mis amistades, quienes estuvieron presente durante la realización de esta investigación y toda mi carrera universitaria. Gracias por los consejos y ánimos en los momentos difíciles.

A mis profesores, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de esta investigación. Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

Lourdes Pamela Arenas Moreno

AGRADECIMIENTO

Agradecerles en primer lugar a Dios y a la Dra. Viccelda Domínguez, que como nuestra asesora nos brindó su apoyo, dedicación y tiempo para desarrollar la presente investigación; que con gran paciencia y toda la disposición nos compartió sus conocimientos, enseñanzas y experiencias permitiéndonos crecer tanto personal como académicamente.

A los profesores Ariel Grey, Albano Díaz, Fermín Mejía, Noriel Franco y Cenobio Cárdenas, por el apoyo, orientación, y enseñanza durante la realización de este trabajo.

Al laboratorio de Sanitaria de la Universidad Tecnológica de Panamá (UTP) por acogernos y el apoyo brindado en la ejecución de la investigación. En especial a la Lic. Yarisel González, por su amabilidad y colaboración de buena voluntad en la realización de este estudio.

A todos nuestros profesores que a lo largo de nuestra carrera universitaria compartieron con nosotras enseñanzas valiosas en las aulas de clases y forman parte importante de los logros alcanzados hasta el momento.

A nuestros padres y familiares, por su apoyo incondicional y sus palabras de ánimo, a amigos y compañeros por estar presentes y atentos de nuestro avance en esta investigación.

Aminta Y Pamela

INDICE GENERAL

Contenido

| | |
|--|-------|
| RESUMEN..... | i |
| DEDICATORIA | iv |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | x |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | xiv |
| ÍNDICE DE ANEXOS | xvi |
| INTRODUCCIÓN..... | xviii |
| ABREVIATURAS GENERALES | xxiii |
| GLOSARIO DE TÉRMINOS | xxvi |
| CAPÍTULO I. MARCO CONCEPTUAL..... | 1 |
| 1.1. Antecedentes del problema | 1 |
| 1.2. Justificación..... | 6 |
| 1.3. Planteamiento del Problema | 9 |
| 1.4. Objetivos: General y específicos | 10 |
| 1.4.1. Objetivos Generales..... | 10 |
| 1.4.2. Objetivos Específicos..... | 10 |
| 1.5. Tipo de investigación..... | 11 |
| 1.6. Formulación de Hipótesis..... | 11 |
| CAPÍTULO II. ORIGEN, EFECTOS, TRANSPORTE Y DESTINO DE LOS HAP EN EL AMBIENTE | 12 |
| 2.1. Principales Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos | 12 |
| 2.2. Origen y Formación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos..... | 15 |
| 2.2.1. Formación y generación | 15 |
| 2.2.2. Fuentes de emisión y exposición | 15 |
| 2.3. Efectos en la salud. | 18 |
| 2.4. Efectos en el ambiente. | 21 |
| CAPITULO III. BIODEGRADACIÓN EN EL MEDIO ACUÁTICO DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS..... | 24 |

| | | |
|--|---|--------------------------------------|
| 3.1. | La deshalogenación de compuestos orgánicos..... | 27 |
| 3.2. | Cometabolismo..... | 30 |
| 3.2.1. | Cometabolismo de compuestos xenobióticos en el ambiente. | 31 |
| 3.3. | Regulación genética de la biodegradación de xenobióticos. | 33 |
| 3.4. | Biotransformación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en las plantas de tratamiento de aguas residuales..... | 36 |
| CAPITULO IV. LA ELIMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR PROCESOS BIOLÓGICOS..... | | 39 |
| 4.1. | Procesos aerobios..... | 40 |
| 4.2. | Procesos anaerobios..... | 41 |
| 4.3. | Utilización de bacterias nativas en la biodegradación de hidrocarburos | 43 |
| 4.3.1. | Factores que influyen en la concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación del contaminante | 44 |
| CAPITULO V. METODOLOGÍA, EJECUCIÓN Y PUESTA EN MARCHA DEL REACTOR EN CONTINUO A ESCALA DE LABORATORIO PARA EL TRATAMIENTO DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS. | | 46 |
| 5.1. | Diseño de investigación..... | 46 |
| 5.2. | Diseño Experimental | 46 |
| 5.3. | Agua residual artificial | 48 |
| 5.4. | Cepa bacteriana <i>Rhodococcus equi</i> | 48 |
| 5.5. | Control de operaciones y puesta en marcha | 49 |
| 5.6. | Medición de parámetros físicos, químicos, biológicos y medición del Naftaleno..... | 51 |
| 5.6.1. | Parámetros físicos | 51 |
| 5.6.2. | Parámetros Químicos | 54 |
| 5.6.3. | Parámetro Biológicos..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| 5.6.4 | Medición del Naftaleno | 61 |
| 5.7. | Laboratorio de Análisis..... | 62 |
| CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | | 63 |
| 6.1. | Resultados | 63 |
| 6.1.1. | Resultados Escenario 1..... | 63 |
| 6.1.1.1. | Resultados de entrada..... | 63 |

| | | |
|--|--|-----|
| 6.1.1.2. | Resultados del reactor..... | 66 |
| 6.1.1.3. | Resultados de salida. | 75 |
| 6.1.1.4. | Eficiencia en el Escenario 1..... | 80 |
| 6.1.2. | Resultados Escenario 2. | 82 |
| 6.1.2.1. | Resultados de entrada..... | 82 |
| 6.1.2.2. | Resultados del reactor..... | 83 |
| 6.1.2.3. | Resultados de salida. | 92 |
| 6.1.2.4. | Eficiencia en el Escenario 2..... | 100 |
| 6.1.2.5. | Relación del reactor y salida..... | 101 |
| 6.1.2.6. | Medición del hidrocarburo Aromático Policíclicos en el reactor y la salida en el Escenario N°2 | 103 |
| 6.2. | Resumen de la Discusión..... | 107 |
| CAPITULO VII. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES. | | 109 |
| CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFÍA. | | 112 |
| CAPÍTULO IX. ANEXOS. | | 128 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Contenido | Página |
|--------------------|---|--------|
| Figura 1.1 | Sitio de donde se aisló la bacteria <i>Rhodococcus equi</i> . | 9 |
| Figura 2.1 | Principales Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos | 13 |
| Figura 3.1 | Mecanismo de deshalogenación. | 29 |
| Figura 4.1 | Esquemas de reacciones aerobias y anaerobias. | 40 |
| Figura 5.1 | Esquema del diseño experimental. | 47 |
| Figura 5.2 | Construcción e instalación del sistema. | 47 |
| Figura 5.3 | Reactivos que componen el agua residual artificial. | 48 |
| Figura 5.4 | Cepa bacteriana aislada, degradadora de Naftaleno. | 49 |
| Figura 5.5 | Adición de bacterias. | 50 |
| Figura 5.6 | Lectura del pH. | 51 |
| Figura 5.7 | Multiparámetro. | 52 |
| Figura 5.8 | Medición de temperatura y SDT | 52 |
| Figura 5.9 | Medición de Sólidos Suspendidos en el espectrofotómetro. | 53 |
| Figura 5.10 | Muestras de DQO. | 58 |
| Figura 5.11 | Lectura del DQO. | 58 |
| Figura 5.12 | Pruebas de DBO ₅ . | 59 |
| Figura 5.13 | Siembra de muestras. | 60 |
| Figura 5.14 | Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. | 60 |
| Figura 5.15 | Cromatógrafo Líquido Angilent. | 62 |
| Figura 5.16 | Inyección de muestras. | 62 |

| | | |
|---------------------|--|----|
| Figura 6.1 | Crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> (UFC/mL) en función del tiempo. | 69 |
| Figura 6.2 | Relación de temperatura con el crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el reactor. Escenario1 | 70 |
| Figura 6.3 | Relación pH con el crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el reactor. Escenario 1. | 71 |
| Figura 6.4 | Relación de la DQO con respecto al crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> . Escenario 1. | 72 |
| Figura 6.5 | Relación de la DQO con respecto la temperatura del Reactor. | 73 |
| Figura 6.6 | Relación del DQO y el pH del reactor. | 73 |
| Figura 6.7 | Valores de DQO y DBO ₅ obtenidos del reactor | 74 |
| Figura 6.8 | Valor del DQO a la salida del sistema en relación a la temperatura. | 78 |
| Figura 6.9. | Valores de DQO en la salida al sistema en relación al pH del efluente. | 79 |
| Figura 6.10 | Valores DQO y DBO ₅ con respecto a la salida. Escenario 1 | 79 |
| Figura 6.11 | Valores de DQO del reactor y la salida del sistema. | 80 |
| Figura 6.12. | Comparación de los valores de DBO ₅ del reactor y de la salida para cada periodo de prueba del Escenario 1. | 81 |
| Figura 6.13. | Crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el | 83 |

| | | |
|---------------------|---|----|
| | reactor. Escenario 2. | |
| Figura 6.14. | Relación temperatura con el crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el reactor. Escenario 1. | 86 |
| Figura 6.15 | Relación pH con el crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el reactor. Escenario 1 | 88 |
| Figura 6.16 | Relación DQO con respecto al crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el reactor. Escenario 2. | 89 |
| Figura 6.17 | Relación DQO con la temperatura en el reactor. Escenario 2. | 89 |
| Figura 6.18. | Relación DQO con el pH en el reactor. Escenario 2. | 90 |
| Figura 6.19 | Relación entre la DQO y DBO ₅ del reactor en el Escenario 2. | 91 |
| Figura 6.20 | Crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> . Salida - Escenario 2. | 94 |
| Figura 6.21 | Relación temperatura con el crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el salida. Escenario 2. | 95 |
| Figura 6.22 | Relación pH con el crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el salida. Escenario 2. | 96 |
| Figura 6.23 | Relación DQO con respecto al crecimiento de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> . Salida - Escenario 2. | 97 |
| Figura 6.24 | Relación DQO con Temperatura en la salida. Escenario 2. | 97 |
| Figura 6.25 | Relación DQO con pH en la salida. Escenario 2. | 98 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura 6.26 | Relación DQO con la DBO ₅ en la salida. Escenario 2. | 99 |
| Figura 6.27 | Relación DQO con respecto al reactor y la salida. Escenario 2. | 101 |
| Figura 6.28 | Relación DBO ₅ con respecto al reactor y la salida. Escenario 2. | 102 |
| Figura 6.29 | Cromatograma de la muestra del reactor al inicio del ensayo 2 a las 48 horas. | 103 |
| Figura 6.30 | Cromatograma de la muestra tomada de la salida al final del ensayo 2 a las 96 horas. | 104 |
| Figura 6.31 | Cromatograma muestra del reactor tomada al inicio del Ensayo 5 a las 192 horas. | 104 |
| Figura 6.32 | Cromatograma muestra de salida del ensayo 5 a las 240 horas. | 105 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | Contenido | Página |
|-------------------|---|--------|
| | Principales hidrocarburos aromáticos policíclicos | |
| Tabla 2.1 | (HAP), con sus respectivos números y nombres CAS. | 14 |
| Tabla 2.2 | Datos relativos a los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos HAP. | 20 |
| Tabla 3.1 | Géneros de especies que degradan Hidrocarburos. | 26 |
| Tabla 5.1 | Comparación entre DQO, DBO ₅ y COT. | 55 |
| Tabla 5.2 | Gradiente de fase móvil. | 61 |
| Tabla 6.1 | Periodos de medición del Escenario 1 | 63 |
| Tabla 6.2 | Medición de parámetros de entrada en el Escenario 1 | 64 |
| Tabla 6.3 | Medición de parámetros del reactor, Escenario 1. | 67 |
| Tabla 6.4. | Proporción DBO ₅ /DQO del reactor en el Escenario 1. | 74 |
| Tabla 6.5 | Medición de parámetros de la salida, Escenario 1. | 76 |
| Tabla 6.6. | Eficiencia en el Escenario 1. | 81 |
| Tabla 6.7 | Periodos de medición del Escenario 2 | 82 |
| Tabla 6.8 | Parámetros de medición de entrada, Escenario 2. | 83 |
| Tabla 6.9 | Parámetros de medición del reactor en el Escenario 2. | 84 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| Tabla 6.10 | Proporción DBO_5/DQO del reactor en el Escenario 2. | 92 |
| Tabla 6.11 | Parámetros de medición de salida. Escenario 2 | 93 |
| Tabla 6.12. | Proporción DBO_5/DQO de la salida en el Escenario 2. | 99 |
| Tabla 6.13 | Eficiencia del Escenario 2. | 100 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| Anexo | | Página |
|------------------|---|--------|
| ANEXO 6 | RESULTADOS | |
| ANEXO 6.1 | RESULTADOS. ESCENARIO 1. | |
| Anexo 6.1.1 | Tabla promedio de medición de parámetros en la entrada. | 127 |
| Anexo 6.1.2 | Tabla promedio de medición de parámetros en el reactor. | 128 |
| Anexo 6.1.3 | Gráfico de crecimiento bacteriano de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el reactor. | 129 |
| Anexo 6.1.4 | Gráfica logarítmica de crecimiento bacteriano de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el reactor. | 129 |
| Anexo 6.1.5 | Gráfico de sólidos suspendidos vs la DQO del reactor. | 130 |
| Anexo 6.1.6 | Gráfico de la DQO y Sólidos Disueltos del reactor. Escenario 1 | 130 |
| Anexo 6.1.7 | Tabla promedio de medición de parámetros en la salida. | 131 |
| Anexo 6.1.8 | Gráfico de Sólidos Suspendidos y DQO de la salida. | 132 |
| Anexo 6.1.9 | Gráfico de sólidos suspendidos de la salida. Escenario 1. | 132 |

| | | |
|---|--|-----|
| ANEXO 6.2 RESULTADOS. ESCENARIO 2. | | |
| Anexo 6.2.1 | Tabla promedio de medición de parámetros en la entrada. | 133 |
| Anexo 6.2.2 | Tabla promedio de medición de parámetros en el reactor. | 133 |
| Anexo 6.2.3 | Gráfica logarítmica de crecimiento bacteriano de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en el reactor. Escenario 2. | 134 |
| Anexo 6.2.4 | Gráfico de sólidos disueltos del reactor. Escenario 2. | 134 |
| Anexo 6.2.5 | Tabla promedio de medición de parámetros en la salida. | 135 |
| Anexo 6.2.6 | Gráfica logarítmica de crecimiento bacteriano de la cepa <i>Rhodococcus equi</i> en la salida. Escenario 2. | 136 |
| Anexo 6.2.7 | Gráfico de sólidos suspendidos de la salida. Escenario 2. | 136 |
| Anexo 6.2.8 | Gráfico de sólidos disueltos de la salida. Escenario 2. | 137 |
| ANEXO 6.3 CROMATOGRAMAS. | | |
| Anexo 6.3.1 | Cromatograma del Naftaleno y n-Hexano (Blanco). | 137 |
| Anexo 6.3.2 | Cromatograma de Naftaleno con medio artificial. | 138 |
| Anexo 6.3.3 | Cromatograma de Naftaleno con medio artificial y bacterias. | 138 |

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental ha ido incrementando a través de los años debido al desarrollo industrial alrededor del mundo. Además la contaminación por compuestos de hidrocarburos ha incrementado y muchos de estos compuestos contaminantes son considerados como un peligro para la salud. (Abd-Elsalam *et al.*, 2009).

Se estima que el 85 ó 90 % del total de vertidos de hidrocarburos al mar proviene de limpieza de depósitos y sentinas; derrames de pequeño o mediano tamaño en operaciones de carga y descarga, pequeños accidentes, rotura de depósitos, entre otros. Una vez que el petróleo y sus derivados se han introducido al medio ambiente, actúan sobre los organismos vivos y producen en ellos efectos adversos que dependen de la concentración y el tiempo de exposición (Dominguez, *et al.*, 2013).

Algunos de estos compuestos contaminantes de hidrocarburos son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP). Los HAP son un gran grupo de compuestos orgánicos con dos o más anillos aromáticos fusionados en arreglos lineales, angulares o en racimo (Abd-Elsalam *et al.*, 2009). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, presentes en el petróleo, constituyen contaminantes que tienen gran impacto en los ecosistemas, debido a que alteran el equilibrio ecológico, y pueden ser carcinógenos y mutágenos para el hombre (Bracho, *et al.*, 2004).

El naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno, han sido los hidrocarburos más estudiados debido a que forman parte de una amplia variedad de productos de importancia biológica, química e industrial (Bracho, *et al.*, 2004).

Los científicos han llevado a cabo investigaciones sobre técnicas de limpieza rentables y con un mínimo daño a largo plazo para el medio ambiente (Mehrasbi *et al.*, 2003).

La cinética de degradación y transporte de compuestos orgánicos (i.e. los hidrocarburos) va a depender de su tipo de estructura y peso molecular, y por otra parte las características físico, químico y biológico del ambiente (La Grega *et al.*, 2001).

La biodegradación se considera que es la ruta principal para la eliminación de estos contaminantes desde el medio ambiente; sin embargo, la biodegradación es a menudo limitada debido a su naturaleza altamente hidrofóbico y la adsorción a los sedimentos que presentan un problema importante que afecta a las estrategias de biorremediación (Bharti *et al.*, 2014).

Es importante definir biorremediación en el contexto de la biodegradación, un proceso que ocurre de forma natural. La biodegradación es de gran importancia en el desgaste de los componentes del petróleo y es un proceso natural por el cual las bacterias u otros microorganismos alteran y descomponen las moléculas orgánicas en otras sustancias, con el tiempo la producción de ácidos grasos y dióxido de carbono. Biorremediación es la aceleración de este proceso mediante

la adición exógena de las poblaciones microbianas, a través de la estimulación de las poblaciones indígenas o por medio de manipulación de los medios contaminados mediante técnicas como la aireación o el control de la temperatura (Domínguez *et al.*, 2013).

Estudios han demostrado que en la naturaleza, se encuentran distribuidos microorganismos que cuentan con la capacidad de degradar biológicamente los hidrocarburos, debido a que el petróleo es un producto natural y que la contaminación crónica producida a lo largo de los años ha provocado la adaptación de la microflora del lugar para metabolizar estos compuestos. Los microorganismos que se utilizan en los tratamientos de efluentes hidrocarbureados son desarrollados en ciertas condiciones ambientales que incluyen el control de factores fisicoquímicos y fuentes de carbono (Nievas, 2006).

La biorremediación utilizando diversas cepas de bacterias del género *Rhodococcus* ha demostrado ser una opción prometedora para la limpieza de los sitios contaminados. Los grandes genomas de *Rhodococcus*, sus vías catabólicas redundantes y versátiles, su capacidad de absorción y metabolizar compuestos hidrofóbicos, para formar biopelículas, de persistir en condiciones adversas y la disponibilidad de herramientas recientemente desarrolladas para la ingeniería genética en *Rhodococcus* las convierten en microorganismos industriales adecuados para biotransformaciones y la biodegradación de muchos compuestos orgánicos (Martínková *et al.*, 2009).

La diversidad metabólica que presentan los microorganismos del género *Rhodococcus* los hace ser candidatos ideales para su utilización en bioprocesos, con un gran potencial tanto en aplicaciones industriales como ambientales (Ellis *et al.*, 2001).

El género *Rhodococcus* fue muy bien definido por los estudios taxonómicos y de sistemática realizados por Goodfellow y Anderson en 1977. Se reconocen nueve especies, indicando a *R. rhodochrous*, como especie, e incluyen a *R. bronchialis*, *R. coprophilus*, *R. corallinus*, *R. equi*, *R. erythropolis*, *R. ruber*, *R. rubropertinctus* y *R. terrae*. Los microorganismos agrupados en este género se encuentran de manera general muy ampliamente distribuidos en el medio ambiente, de manera particular en suelos, reservorios de agua, ríos, lagos y otros ambientes acuáticos. Como agentes patógenos del hombre y los animales, el más importante de ellos es *R. equi*, anteriormente clasificado como *Corynebacterium equi*, a esta especie como otros miembros de la familia *Nocardiaceae*, se les relaciona con una gran variedad de procesos de biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos (Sanchez *et al.*, 2013).

Las aguas residuales industriales son aquellas que proceden de los procesos tecnológicos y se caracterizan por su generación periódica o continua en grandes volúmenes, así como por su variada composición. La caracterización de las aguas residuales es un aspecto muy importante, ya que permite evaluar el impacto ambiental que producen, de modo que sea posible diseñar el sistema adecuado para su tratamiento y/o aprovechamiento (Pérez *et al.*, 2004).

El principal origen de los HAP en las aguas se debe al derrame e infiltración de petróleo. Las aguas residuales domésticos e industriales suelen contener altos contenidos de HAP particulados y solubles (García, 2005^b).

La razón de realizar la presente investigación se basa en el aumento de la contaminación originada por las descargas de aguas residuales industriales y/o derrames accidentales, de compuestos de difícil biodegradación, como los hidrocarburos, especialmente los aromáticos policíclicos, a los ecosistemas marinos y la falta de estudios encontrados en Panamá sobre biodegradación de los mismos. El objetivo principal de este estudio es evaluar el tratamiento biológico del naftaleno (de la familia de los HAP) en un reactor aerobio en continuo a escala de laboratorio y analizar la eficiencia de la bacteria *Rhodococcus equi*. Todo esto como candidato para su aplicación en sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales industriales.

En el siguiente trabajo de investigación, se presentarán los siguientes capítulos: El marco conceptual; Origen, efectos, transporte y destino de los HAP en el ambiente; Biodegradación en el medio acuático de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos; la eliminación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por procesos biológicos; Metodología, ejecución y puesta en marcha del reactor en continuo a escala de laboratorio para el tratamiento de hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizando la cepa *Rhodococcus equi*; Resultados y Discusión; y Conclusión y Recomendaciones.

ABREVIATURAS GENERALES

| | |
|-----------------------|--|
| AWWA: | American Water Works Association – por sus siglas en inglés (Asociación Americana de Obras de Agua). |
| APHA: | American Public Health Association – por sus siglas en inglés (Asociación Americana de Salud Pública). |
| BIOMA: | Corporación para la Conservación del Medio Ambiente. |
| DBO: | Demanda bioquímica de oxígeno. |
| DGNTI-COPANIT: | Dirección General de Normas y Tecnología Industrial - Comisión Panameña. |
| DQO: | Demanda química de oxígeno. |
| EPA: | Environmental Protection Agency – por sus siglas en inglés (Agencia de Protección Ambiental). |
| HAP: | Hidrocarburo Aromático Policíclicos. |
| HPLC: | High-performance liquid chromatography (Cromatografía de líquidos de alto rendimiento). |
| IDAAN: | Instituto de Acueductos y Alcantarillados Nacionales. |
| ISO: | Organización Internacional para la Estandarización. |
| MPA: | Mejores Prácticas Ambientales. |

| | |
|-----------------|--|
| OMS: | Organización Mundial de la Salud. |
| OD: | Oxígeno disuelto. |
| pH: | Potencial de Hidrógeno. |
| PNO: | Procedimiento Normalizado de Operación. |
| PNUMA: | Programa de Naciones Unidas para el Medioambiente. |
| SENACYT: | Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación. |
| SWAT: | Soil and Water Assesment Tool – por sus siglas en inglés (Herramienta para el Manejo de Suelo y Agua). |
| UFC: | Unidades formadoras de colonias. |
| UNICEF: | Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. |
| UTP: | Universidad Tecnológica de Panamá. |
| WPCF: | Water Pollution Control Federation – por sus siglas en inglés (Federación para el Control de la Contaminación del Agua). |

Unidades de medida

| | |
|------------|---------------------|
| cm: | centímetro. |
| °C: | grados centígrados. |

| | |
|----------------|---|
| hr: | horas. |
| km: | kilómetro. |
| in: | pulgadas. |
| m: | metro. |
| min: | minuto. |
| mm: | milímetro. |
| mg: | miligramo. |
| mg/kg: | miligramo(s) por kilogramo. Corresponde en peso a partes por millón (ppm) por masa. |
| mg/L: | miligramo por litro. |
| ppm: | partes por millón. |
| UFC/mL: | Unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra. |

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Adsorción: propiedad de algunos materiales de fijar en su superficie moléculas orgánicas extraídas de la fase líquida en la que se encuentra.

Agua residual: agua que ha sido usada por una comunidad o industria y que contiene material orgánico o inorgánico disuelto o en suspensión.

Aerobio: organismo que necesita respirar oxígeno para vivir o desarrollarse.

Afluente: agua u otro líquido que ingresa a un reservorio, planta de tratamiento o proceso de tratamiento.

Anaerobio: condición en la cual no hay presencia de aire u oxígeno libre.

Análisis: examen de una sustancia para identificar sus componentes.

Biodegradación: transformación de la materia orgánica en compuestos menos complejos, por acción de microorganismos.

Biorremediación: se describe como la práctica de utilizar una variedad de sistemas que emplean organismos vivos o sus componentes para remover (extraer), degradar (biodegradar) o transformar (biotransformar) compuestos orgánicos tóxicos, en productos metabólicos menos tóxicos o inocuos.

Biotransformación: es la transformación de los xenobióticos en el organismo, resultando en otros productos.

Blanco: muestra de control de calidad que permite identificar posibles fuentes de contaminación en muestras para análisis. Esta contaminación puede ser

causada durante el proceso de recolección de datos incluyendo muestreo, preservación, transporte y análisis.

Cometabolismo: es la transformación de un compuesto, llamado cosustrato, en presencia obligada de un sustrato durante el crecimiento o por células en reposo en ausencia del sustrato de crecimiento es parte fundamental de la eliminación biológica de compuestos xenobióticos en el ambiente.

Concentración: es la proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolvente, donde el soluto es la sustancia que se disuelve, el disolvente la sustancia que disuelve al soluto.

Contaminante recalcitrante: aquel que por tener una estructura muy estable químicamente, se resisten al ataque de los microorganismos o de cualquier mecanismo de degradación sea biológico o químico.

Cromatografía: es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

Cromatografía de líquidos: técnica analítica ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la adsorción selectiva de los constituyentes de una mezcla.

Degradación: se refiere a varias reacciones en que las moléculas orgánicas pierden uno o varios átomos de carbono, o donde las moléculas complejas se descomponen en otras más simples.

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅): cantidad de oxígeno requerida para la oxidación aeróbica biológica de los sólidos orgánicos del agua.

Demanda química de oxígeno (DQO): cantidad de oxígeno requerida para oxidar a la materia orgánica sea o no biodegradable, con la excepción de compuestos aromáticos como piridina, benceno o tolueno.

Eficiencia del tratamiento: relación entre la masa o concentración removida y la masa o concentración aplicada, en un proceso o planta de tratamiento y para un parámetro específico.

Efluente: líquido que sale de una planta de tratamiento de aguas residuales.

Genotoxicidad: capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos.

Genotóxico: son agentes físicos o productos químicos capaces de alterar la información genética celular.

Hidrocarburo: compuestos orgánicos formados únicamente por átomos de carbono e hidrogeno.

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos: clase importante de contaminantes o xenobióticos que persisten en suelos, sedimentos y material particulado suspendido en el aire.

Intoxicación: es el conjunto de efectos nocivos producidos en un organismo vivo por un agente químico.

Intoxicación aguda: se produce cuando hay una exposición de corta duración y el agente químico es absorbido rápidamente, en una o varias dosis en un período no mayor de 24 horas, apareciendo los efectos de inmediatos.

Intoxicación crónica: cuadro clínico que se presenta luego de exposición repetida a dosis bajas de plaguicidas por periodos de tiempo prolongados.

Límites máximos permisibles: valores límites de contaminación determinados para cada parámetro y que son de obligatorio cumplimiento. Se expresa en miligramos de residuo por kilogramo del producto.

Muestra: parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella con ciertos métodos para someterla a estudio, análisis o experimentación.

Persistencia: se refiere a la capacidad de un compuesto para sostenerse inalterado en un medio a lo largo del tiempo. A mayor persistencia, mayor posibilidad de ingresar en la cadena alimentaria.

Recalcitrante: sustancia que no es biodegradable bajo condiciones ambientales naturales.

Sedimentación: es el proceso por el cual el material sólido, transportado por una corriente de agua, se deposita en el fondo del río, embalse, canal artificial, o dispositivo construido especialmente para tal fin.

Sustrato: es una sustancia sólida o medio el cual se le aplica otra sustancia y a la que dicha segunda sustancia se adhiere.

Tratamiento biológico: procesos de tratamiento que intensifica la acción de los microorganismos para estabilizar la materia orgánica presente.

Volatilización: cambio de estado de sólido al estado gaseoso sin pasar por el estado líquido, también llamado sublimación.

Xenobiótico: es toda sustancia extraña o ajena a las que proceden de los compuestos o metabolismo de los organismos vivos.

CAPÍTULO I. MARCO CONCEPTUAL

1.1. Antecedentes del problema

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se encuentran entre los contaminantes más importantes en el medio marino, que se producen a partir de diferentes recursos. Los HAP son un gran grupo de compuestos orgánicos con dos o más anillos aromáticos fusionados (Eghtesadi *et al.*, 2013). Ellos tienen una solubilidad relativamente baja en agua, pero son altamente lipofílicos (WHO, 2010).

La Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. ha identificado 16 compuestos de HAP como los contaminantes prioritarios, entre ellos se encuentra el naftaleno y Fenantreno. (Salinas *et al.*, 2012).

Entre algunas de las fuentes que generan los altos índices de contaminación por petróleo, están el uso de plaguicidas y la contaminación generada por la acumulación excesiva de contaminantes derivados del petróleo *i.e.* benceno, óxidos de azufre, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), entre otros, que se acumulan en el suelo, ríos y lagos, que no son tratados en forma adecuada para evitar su contaminación o facilitar su degradación (Sánchez *et al.*, 2013).

Dada la amplia distribución de materia orgánica (carbón, madera, vegetación en general, combustibles fósiles, tabaco, alimentos), así como los procesos de combustión de la misma, los HAP son ubicuos, es decir se encuentran de forma generalizada en el medio ambiente. En general se distinguen dos tipos de

fuentes como responsables de la presencia de HAP en el ambiente. Las fuentes naturales ocurren por medio de combustión natural de materia orgánica que comportan emisión al aire de HAP son las erupciones de los volcanes y los incendios forestales debidos a causas naturales. Los petróleos y en general los combustibles fósiles contienen de forma natural HAP en bajas concentraciones (alrededor del 1%), dependiendo en gran parte del origen del crudo. Las fuentes antropogénicas hacen referencia a todas las formas en las que se originan HAP que sean dependientes de la actividad humana. La amplia utilización de procesos de combustión de materia orgánica durante el último siglo ha hecho que la producción de HAP sea un fenómeno habitual en nuestra sociedad. Los combustibles fósiles (de materia orgánica) son de uso frecuente y abundante, sobre todo en tres ámbitos: en muchas actividades industriales, en las calefacciones domésticas, y en todo tipo de vehículos de transporte. Otros tipos de fuentes antropogénica serían el humo del tabaco y los alimentos cocinados a la parrilla, en que la cocción se produce a altas temperaturas y en contacto directo con la llama (Agudo, 2010).

Los HAP son conocidos por los problemas que generan en la salud y el ambiente. Algunos estudios hechos en animales han demostrado que producen problemas hematológicos, como, anemia aplástica, pancitopenia, reducción de los leucocitos en la sangre y depresión en la médula ósea y problemas en el sistema reproductivo (WHO, 2010).

Los efectos que generan los HAP en el ser humano afectan el sistema nervioso central y pueden ser agudos y crónicos. La intoxicación aguda por

estos compuestos produce cefalea, náuseas, mareo, desorientación, confusión e inquietud. La exposición aguda a dosis altas puede incluso provocar pérdida de consciencia y depresión respiratoria. Uno de los efectos agudos más conocidos es la irritación respiratoria (tos y dolor de garganta). También se han observado síntomas cardiovasculares, como palpitaciones y mareos. Los síntomas neurológicos de la exposición crónica pueden ser: cambios de conducta, depresión, alteraciones del estado de ánimo y cambios de la personalidad y de la función intelectual. También se sabe que la exposición crónica produce o contribuye a producir neuropatía distal en algunos pacientes (Finklea *et al.*, 2011).

La persistencia de los HAP es de la preocupación ambiental, ya que son activamente carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos, amenazando la biota marina (Bharti *et al.*, 2014). La protección del medio marino constituye una preocupación creciente en el ámbito científico y social. El estudio continuo de las condiciones ambientales marinas, es generalmente, una de las tareas que todos los países deben cumplir para poder prevenir y adoptar las medidas necesarias para reducir la contaminación (Soriano, 2009). Alrededor del 0,1 al 0,2% de la producción mundial de petróleo acaba vertido al mar, el porcentaje puede parecer no muy grande, pero son casi 3 millones de toneladas las que acaban contaminando las aguas cada año, provocando daños en el ecosistema marino (Echarri, 2007).

Se han propuesto muchos enfoques para destruir estos contaminantes tales como el depósito en vertederos, microextracción, extracción con disolvente, la

incineración de alta temperatura, y varios tipos de descomposición química; sin embargo, estas tecnologías son caras y pueden dar lugar a una descomposición incompleta de los contaminantes (Medina-Bellver *et al.*, 2005).

La biodegradación se considera que es la ruta principal para la eliminación de estos contaminantes desde el medio ambiente; sin embargo, la biodegradación es a menudo limitada debido a su naturaleza altamente hidrofóbico y la adsorción a los sedimentos que presentan un problema importante que afecta a las estrategias de biorremediación (Bharti *et al.*, 2014). El proceso de biorremediación juega un rol importante, se define como el uso de microorganismos para desintoxicar o eliminar los contaminantes debido a sus diversas capacidades metabólicas, es un método de evolución de la eliminación y la degradación de muchos contaminantes ambientales incluyendo los productos de la industria del petróleo (Medina-Bellver *et al.*, 2005). Además se considera que la biorremediación es no invasiva y rentable (April *et al.*, 2000).

En los últimos 20 años se ha publicado mucho sobre la capacidad de los microorganismos para su uso en la degradación de hidrocarburos, especialmente *n*-alcanos como fuentes de carbono y energía. Estos microorganismos pertenecen a *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp, *Mycobacterium* sp y *Rhodococcus* sp. (Balachandran *et al.*, 2012).

El estudio de la diversidad microbiana indígena es fundamental para la comprensión de las funciones desempeñadas por los microorganismos en los hábitats contaminados por el petróleo y sus derivados, los cuales pueden ser

utilizados por diversos microorganismos como fuente de carbono y energía. Un gran número de sustratos y metabolitos presentes en suelos afectados por el petróleo, ya que proporcionan las condiciones para el desarrollo de una comunidad microbiana compleja (Wetler-Tonini, *et al.*, 2011)

Según Martínková *et al.* (2009) la biorremediación utilizando diversas cepas de bacterias del género *Rhodococcus* ha demostrado ser una opción prometedora para la limpieza de los sitios contaminados. Los grandes genomas de *Rhodococcus*, sus vías catabólicas redundantes y versátiles, su capacidad de absorción y metabolizar compuestos hidrofóbicos, para formar biopelículas, de persistir en condiciones adversas y la disponibilidad de herramientas recientemente desarrolladas para la ingeniería genética en *Rhodococcus* las convierten en microorganismos industriales adecuados para biotransformaciones y la biodegradación de muchos compuestos orgánicos.

La diversidad metabólica que presentan los microorganismos del género *Rhodococcus* los hace ser candidatos ideales para su utilización en bioprocesos, con un gran potencial tanto en aplicaciones industriales como ambientales (Ellis *et al.*, 2001). El género *Rhodococcus* fue muy bien definido por los estudios taxonómicos y de sistemática realizados por Goodfellow y Anderson en 1977. Se reconocen nueve especies, indicando a *R. rhodochrous*, como especie, e incluyen a *R. bronchialis*, *R. coprophilus*, *R. corallinus*, *R. equi*, *R. erythropolis*, *R. ruber*, *R. rubropertinctus* y *R. terrae*. Los microorganismos agrupados en este género se encuentran de manera general muy ampliamente distribuidos en el medio ambiente, de manera particular en suelos, reservorios de agua, ríos, lagos

y otros ambientes acuáticos. Como agentes patógenos del hombre y los animales, el más importante de ellos es *R. equi*, anteriormente clasificado como *Corynebacterium equi*, a esta especie como otros miembros de la familia *Nocardiaceae*, se les relaciona con una gran variedad de procesos de biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos (Sanchez *et al.*, 2013).

Cuando se comparan procesos aerobios con anaerobios se suele enfatizar que existe una marcada preferencia por el uso de procedimientos anaerobios debido fundamentalmente a la economía de energía lograda, dado que los costos de operación de los sistemas aerobios son cada vez más elevados; sin embargo, la comparación debe hacerse en forma más completa. Por ejemplo, debe tenerse en cuenta la presencia de compuestos tóxicos (como el fenol) o de los llamados recalcitrantes o xenobióticos, que son aquellos cuya biodegradabilidad es muy dificultosa (Merli y Ricciuti, 2009).

1.2. Justificación

Aguas residuales como las de la industria de refinería de petróleo contienen hidrocarburos que son altamente tóxicos y de gran peligro para las comunidades cercanas y el ambiente. Por lo tanto, existe la necesidad de aplicar un tratamiento eficaz que degrade los hidrocarburos antes de la descarga. Un proceso natural, considerado efectivo y no dañino al ambiente es el empleo de microorganismos para la degradación de estos compuestos (Hamza *et al.*, 2012).

Los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad) así como de los compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. El petróleo y los hidrocarburos se encuentran naturalmente presentes en el suelo, lo que ha permitido a muchos microorganismos acostumbrarse a su presencia y utilizarlos para sobrevivir. La biodegradación de hidrocarburos en diferentes ecosistemas (suelo y agua) requiere de la presencia de microorganismos (bacterias, hongos, algas) que, a través de la actividad bioquímica, oxiden los hidrocarburos. Algunas especies de microorganismos pueden metabolizar un número limitado de hidrocarburos, de manera que la presencia de poblaciones mixtas con diferentes capacidades metabólicas, es necesaria para degradar mezclas complejas de hidrocarburos como el crudo (Domínguez *et al.*, 2013).

Los primeros estudios que son considerados pioneros fueron realizados por ZoBell (1946) en ambientes marinos, a partir de ese momento se han aislado numerosas cepas bacterianas de ambientes marinos costeros capaces de degradar diferentes hidrocarburos.

La capacidad de degradación de compuestos que contienen anillos aromáticos está ampliamente distribuida en la naturaleza, y de hecho, se han aislado numerosas especies de bacterias y hongos degradadores de compuestos aromáticos conteniendo entre 2 y 5 anillos (Correa *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2002).

En su gran mayoría las bacterias degradadoras de hidrocarburos se encuentran en el grupo de gram negativas. La degradación de hidrocarburos se lleva a cabo principalmente por bacterias, seguidas por los hongos, levaduras y algas, entre otros. En un estudio comparativo de poblaciones Song *et al.* (1986), observaron que las bacterias participaron en el 82% de la degradación de n-hexadecano y los hongos con un 13%. En algunos estudios citados por Leahy y Colwell, (1990) se reporta la degradación de hidrocarburos por algas.

En la última década, debido al desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular se han descrito más especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos, aislados de ecosistemas terrestres, marinos y de agua de producción petrolera, entre otros (Alazard *et al.*, 2002; Van Hamme *et al.*, 2003).

El tratamiento aeróbico de efluentes es un proceso biológico degradativo, en donde un agua residual, urbana o industrial, se somete a aireación durante un periodo de tiempo, reduciéndose el contenido de materia orgánica, formando a su vez un lodo floculento (Pozo, 2009).

El estudio de la cinética de tratamiento biológico aeróbico conduce a determinar la velocidad a la cual los microorganismos degradan un residuo específico y por lo tanto, suministran la información básica necesaria para desarrollar el tamaño de los reactores biológicos aeróbicos (Pozo, 2009).

Estudios recientes, realizados por Grey *et al.* (2013) en áreas cercanas al Canal de Panamá, Bahía de Manzanillo (Figura 1.1) encontraron y aislaron microorganismos degradadores de hidrocarburos los cuales se identificaron de

acuerdo a los principios generales de la clasificación microbiana, usando medios selectivos y macro - y el examen microscópico de los caracteres morfológicos.

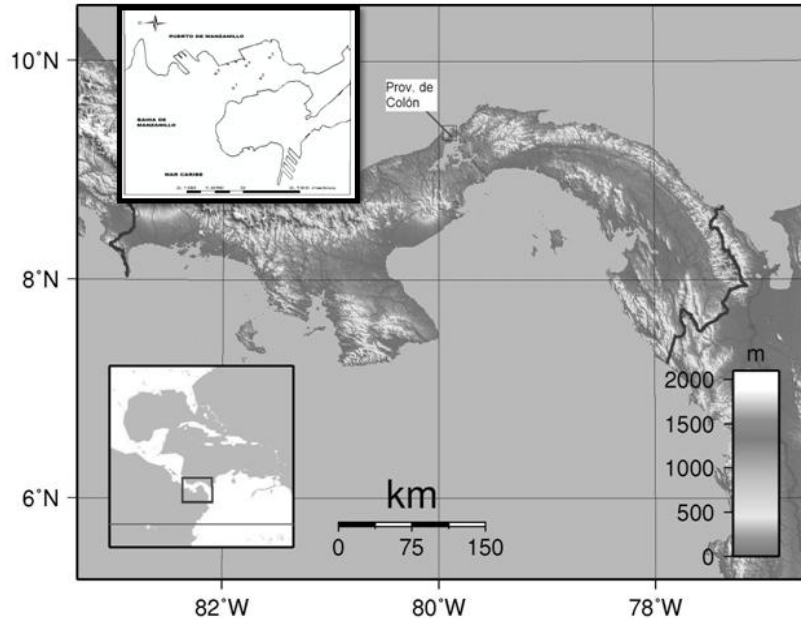


Figura 1.1. Bahía de Manzanillo, sitio donde se detectaron y fueron aisladas las cepas utilizadas en este estudio (Grey *et al.*, 2014).

Las bacterias, extraídas de los puntos mostrados en la Figura 1.1, fueron identificadas a través del sistema API CORYNE, como *Rhodococcus equi* y *Corynebacterium propinquum*.

1.3. Planteamiento del Problema

En las revisiones bibliográficas realizadas, no fueron encontrados registros o investigaciones específicas sobre el comportamiento de la bacteria *Rhodococcus equi* como agente biológico utilizado en la degradación de HAP presentes en aguas contaminadas por los derrames de petróleo o en las aguas

residuales de las industrias de refinería, y con este estudio se busca así poder determinar científicamente, su eficiencia de degradación, de forma tal que sirva como herramienta para el tratamiento biológico y remediación de sitios o tratamiento de aguas residuales de difícil biodegradación con hidrocarburos como el naftaleno.

1.4. Objetivos: General y específicos

1.4.1. Objetivos Generales

Evaluar la eficiencia de degradar aguas de difícil tratamiento, que contienen naftaleno, de la cepa *Rhodococcus equi* en un reactor aerobio en continuo y semicontinuo a escala de laboratorio.

1.4.2. Objetivos Específicos

- 1.4.2.1.** Conocer la fuente y los efectos a la salud y el ambiente de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.
- 1.4.2.2.** Analizar la biodegradación en el medio acuático de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.
- 1.4.2.3.** Analizar la eliminación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por procesos biológicos.
- 1.4.2.4.** Evaluar la eficiencia de degradar DQO y naftaleno, de la cepa *Rhodococcus equi*.

1.5. Tipo de investigación

El estudio fue cuantitativo y cualitativo, ya que se realizaron determinaciones en laboratorios de las características físicas, químicas y biológicas.

El enfoque cualitativo evalúa el desarrollo natural de los sucesos, utilizando la recolección de datos sin medición numérica para descubrir preguntas de investigación en el proceso de investigación, mientras que el enfoque cuantitativo fragmenta los datos en partes para responder al planteamiento del problema, donde los análisis se interpretan a la luz de las predicciones iniciales (hipótesis) y de estudios previos (teoría), donde la interpretación constituye una explicación de cómo los resultados encajan en el conocimiento existente (Hernández *et al*, 2007).

1.6. Formulación de Hipótesis

- ✓ Hipótesis Positiva: La cepa *Rhodococcus equi* posee la capacidad de degradar compuestos de difícil tratamiento, como el naftaleno, en un reactor aerobio.
- ✗ Hipótesis Nula: La cepa *Rhodococcus equi* no posee la capacidad de degradar compuestos de difícil tratamiento, como el naftaleno, en un reactor aerobio.

CAPÍTULO II. ORIGEN, EFECTOS, TRANSPORTE Y DESTINO DE LOS HAP EN EL AMBIENTE

El hecho de estar compuestos fundamentalmente por carbono e hidrógeno es el origen del nombre “hidrocarburos”. Por otra parte, el olor característico del benceno hace que por extensión, todos los compuestos derivados del anillo bencénico se denominen “aromáticos”. Finalmente, el hecho de que la mayoría de estos compuestos posean varios anillos les otorga su carácter de policíclicos” (Agudo, 2009).

Las propiedades físico químicas de los distintos HAP son diferentes, y los tiempos de residencia y vidas medias en distintos compartimentos en el medio y los organismos son distintos. En términos generales son volátiles y relativamente persistentes lo que les hace susceptibles al transporte atmosférico a larga distancia, son poco solubles en agua y solubles en solventes orgánicos y son también fuertemente lipofílicos, pero en la medida que son transformados por el metabolismo de los organismos no se acumulan en las redes tróficas (CNRCOP, 2004).

2.1. Principales Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Los HAP se encuentran generalmente como mezclas complejas, no como compuestos simples. Existen más de 100 clases diferentes de HAP. En el medio ambiente se encuentran como compuestos volátiles (en la fase gaseosa) o unidos a partículas. Como sustancias químicas puras, los HAP existen generalmente como sólidos incoloros, blancos o verdes amarillosos pálidos y tienen un olor leve y agradable (Agudo, 2009).

La Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (US-EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Europea (UE), han declarado 16 de estos hidrocarburos aromáticos policíclicos como contaminantes prioritarios (Nadia *et al.*, 2004). Estos compuestos incluyen: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, benzo(g,h,i)perileno y dibenzo(a,h)antraceno (Figura 2.1).




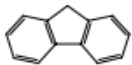
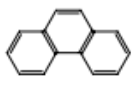
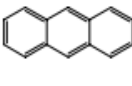
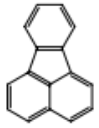

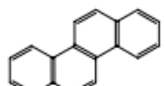
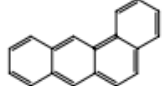
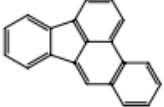
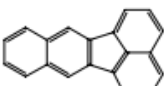
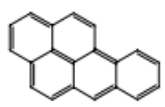
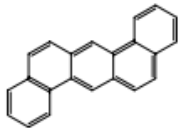
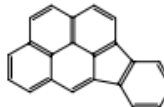

| | | | |
|---|---|--|---|
| NAFTALENO | ACENAFTENO | ACENAFTILENO | FLUORENO |
|  |  |  |  |
| FENANTRENO | ANTRACENO | FLUORANTENO | PIRENO |
|  |  |  |  |
| CRISENO | BENZO(A)-ANTRACENO | BENZO(B)-FLUORANTENO | BENZO(K)-FLUORANTENO |
|  |  |  |  |
| BENZO(A)-PIRENO | DIBENZO(A,H)-ANTRACENO | INDENO(1,2,3-C,D)-PIRENO | BENZO(G,H,I)-PERILENO |
|  |  |  |  |

Figura 2.1. Los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos considerados por la EPA, OMS y UE como contaminantes prioritarios (Agudo, 2009)

En la Tabla 1, se recogen algunos de los HAP más comunes (Agudo, 2009).

Se han incluido estos HAP por diversas razones:

- Hay más información disponible sobre ellos que sobre los otros HAP.

- Se sospecha que son más dañinos y exhiben efectos nocivos que son representativos de los otros HAP.
- Existe una mayor posibilidad de exposición a estos HAP.
- De todos los HAP analizados, éstos son los que suelen presentar una mayor concentración.

Tabla 2.1. Principales hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), con sus respectivos números y nombres CAS.

| Principales hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) | | |
|---|-------------|-----------------------------|
| Nombre común | Número CAS* | Nombre CAS* |
| Acenafteno | 83-32-0 | Acenaftileno |
| Acenaftileno | 208-96-9 | 1,2-Dihidro-acenaftileno |
| Antantreno | 191-26-4 | Dibenzo[d,e,f,m,n,o]criseno |
| Antraceno | 120-12-7 | Antraceno |
| Benzo[a]antraceno | 56-55-3 | Benzo[a]antraceno |
| Benzo[a]pireno | 50-32-8 | Benzo[a]pireno |
| Benzo[e]pireno | 192-91-2 | Benzo[e]pireno |
| Benzo[b]fluoranteno | 205-99-2 | Benzo[e]acefenantrileno |
| Benzo[g,h,i]perileno | 191-22-4 | Benzo[g,h,i]perileno |
| Benzo[j]fluoranteno | 205-82-3 | Benzo[j]fluoranteno |
| Benzo[k]fluoranteno | 207-08-9 | Benzo[k]fluoranteno |
| Ciclopenta[c,d]pireno | 27208-37-3 | Ciclopenta[c,d]pireno |
| Criseno | 218-01-09 | Criseno |
| Dibenzo[a,h]antraceno | 53-70-03 | Dibenzo[a,h]antraceno |
| Fluoranteno | 206-44-0 | Fluoranteno |
| Fluoreno | 86-73-7 | 9H-fluoreno |
| Fenantreno | 85-01-8 | Fenantreno |
| Indeno[1,2,3-c,d]pireno | 193-39-5 | Indeno[1,2,3-c,d] pireno |
| Naftaleno | 91-20-3 | Naftaleno |
| Pireno | 129-00-0 | Pireno |

(*) CAS: el numero registrado CAS es una identificación numérica única para compuestos químicos, polímeros, secuencias biológicas, preparados y aleaciones. Llamado también CAS RN (en inglés *CAS registry number*). CAS es el acrónimo de *Chemical Abstracts Service*, una división de la Sociedad Americana de Química, que asigna estos identificadores a cada compuesto químico que ha sido descrito en la literatura.

Fuente: Agudo (2009).

2.2. Origen y Formación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

2.2.1. Formación y generación

Los HAP pueden aparecer en el medio de varias maneras: mediante diagénesis a temperatura baja o moderada de la materia orgánica sedimentaria dando lugar a los combustibles fósiles y mediante la biosíntesis directa originada por microbios y plantas (García^a, 2005; García^b, 2005).

Sin embargo, si no hay suficiente oxígeno se lleva a cabo la pirolisis, donde la combustión es incompleta y parte del combustible no reacciona completamente con el oxígeno y se forman otros subproductos tales como monóxido de carbono y HAP (Agudo, 2009).

La formación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos se verá más favorecida cuanto menor sea la disponibilidad de oxígeno en el ambiente para completar la combustión y la cantidad de estos, dependerá también de la temperatura a la cual se lleve a cabo la combustión y de la naturaleza del material orgánico que sufra dicha reacción (García^a, 2005; García^b, 2005).

2.2.2 Fuentes de emisión y exposición

Las emisiones de HAP como resultado de las actividades humanas se pueden dividir en fuentes de combustión estacionaria y fuentes de combustión móvil. Las principales fuentes fijas que emiten HAP son instalaciones de generación de calor y energía eléctrica, calefacción con carbón y madera, quemadores de gas, incineración de residuos orgánicos municipales e industriales, quemas intencionales e incendios forestales, y diversos procesos industriales (coquización, craqueo del petróleo, fundiciones, producción de asfaltos, etc.).

Las fuentes móviles son aquellas en donde se queman combustibles fósiles utilizados en medios de transporte terrestre, marítimo y aéreo. La cantidad de HAP que se emite en cada proceso depende en gran medida de los materiales, de la tecnología y de las condiciones de combustión (Cabal, 2009).

El origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el medio ambiente es muy diverso, aunque básicamente se pueden diferenciar tres fuentes distintas (Neff, 1979):

- **Origen pirogénico**, procedente de la combustión incompleta de la materia orgánica, reciente o fósil, bien por causas naturales (incendios de bosques, erupciones volcánicas, etc.) o fuentes antropogénicas (CNR COP, 2004) como lo son:

- La fabricación de carbón. Esta fuente ha disminuido en la última década como resultado de la aplicación de nuevas tecnologías y la clausura de instalaciones antiguas.

- La producción de aluminio, especialmente los ánodos de carbón, hierro y acero y los agentes ligantes que se usan en las arenas de moldeado en fundiciones.

- Calefacción doméstica y residencial. Las emisiones de estufas de madera son 25-1000 veces mayores que las estufas de carbón. En áreas donde esta forma de calefacción es común puede ser la fuente principal de HAP. Especialmente en invierno.

- Cocina. Se pueden producir HAP durante la combustión incompleta de combustibles, del aceite de cocina y de los alimentos cocinados.

-Tráfico. Los motores de diesel o gasolina emiten distintos HAP. Las tasas de emisión dependen del combustible, el tipo de vehículo, las condiciones en que se encuentre el motor y las condiciones de prueba y, puede variar de unos nanogramos por kilómetro a más de 1000 mg/km. Las emisiones de HAP desde vehículos se reducen drásticamente con la instalación de convertidores catalíticos.

-Centrales térmicas de carbón. En zonas contaminadas los niveles de HAP pueden ser mayores en el ambiente que en los gases en la chimenea.

-Incineración de desechos. Las emisiones de HAP en gases de incineradoras de varios países son del orden de $<10 \text{ mg/m}^3$

-La combustión de tabaco puede ser una fuente importante de exposición para las personas

- **Origen petrogénico**, producido por vertidos accidentales o intencionados de derivados del petróleo. Se caracterizan por ser mezclas complejas formadas por compuestos con cadenas alquílicas de hasta 5 ó 6 átomos de carbono, que predominan sobre sus homólogos no sustituidos.

- **Origen diagenético** de la materia orgánica sedimentaria, la cual puede sufrir una serie de procesos geoquímicos naturales, como son la descarboxilación, aromatización, desfuncionalización, etc., para convertirse en HAP de origen natural. Entre éstos se encuentran ciertos derivados del criseno y del piceno, así como el reteno y el perileno, aunque estos dos últimos también pueden tener un origen pirolítico.

2.3 Efectos en la salud.

La absorción de los hidrocarburos aromáticos tiene lugar por inhalación, ingestión y, en cantidades pequeñas, por vía cutánea. Históricamente fueron los primeros agentes reconocidos como causantes de tumores malignos en humanos (Vives *et al.*, 2001).

Según Rodríguez (2004), las personas pueden estar expuestas a los HAP:

- Comiendo carnes preparadas en la parrilla o que se han quemado; comiendo pan, hortalizas, frutas, cereales, harina, o carnes contaminadas; o comiendo alimentos procesados o en escabeche.
- Tomando agua o leche de vaca contaminada. Las madres que lactan y que habitan cerca de sitios de residuos peligrosos pueden pasar los HAPs a los niños a través de la leche materna.
- Respirando aire contaminado si trabajan en plantas que producen coque, alquitrán y asfalto; plantas donde se ahuman productos o simplemente, en lugares donde se queman basuras.
- Respirando aire con HAPs del humo de cigarrillos, humo de madera, emisiones del tubo de escape de automóviles, o humo de la combustión de productos agrícolas.
- A través de contacto con aire, agua o tierra cerca de sitios de residuos peligrosos.

Para la población general, las principales vías de exposición a los HAP son los alimentos y el aire de los espacios interiores y del medio ambiente. El uso de

fuego directo para calentar y cocinar puede aumentar la exposición a los HAP, especialmente en países en desarrollo. En los lugares con una elevada contaminación debida a los recubrimientos de alquitrán empleados en las tuberías de agua, la ingesta de HAP por el agua de consumo podría igualar e incluso superar la procedente de los alimentos (OMS, 2003).

Los hidrocarburos aromáticos se metabolizan mediante la biooxidación del anillo. Pueden causar efectos agudos y crónicos en el sistema nervioso central. La intoxicación aguda por estos compuestos produce cefalea, náuseas, mareo, desorientación, confusión e inquietud, sin embargo en dosis altas puede llegar a provocar pérdida de consciencia y depresión respiratoria. Uno de los efectos agudos más conocidos es la irritación respiratoria (tos y dolor de garganta).

También se han observado síntomas cardiovasculares, como palpitaciones y mareos. Los síntomas neurológicos de la exposición crónica pueden ser: cambios de conducta, depresión, alteraciones del estado de ánimo y cambios de la personalidad y de la función intelectual. También se sabe que la exposición crónica produce o contribuye a producir neuropatía distal en algunos pacientes (Enciclopedia de la Salud, S/F).

Estudios en animales también han demostrado que los HAP pueden producir efectos nocivos a la piel, fluidos corporales, y a la habilidad para combatir infecciones después de exposiciones ya sea de corta o larga duración, también ciertas personas que han respirado o tocado mezclas de HAP y otros compuestos químicos por largo tiempo han contraído cáncer. Ciertos HAP han

producido cáncer en animales de laboratorio que respiraron aire con HAP (cáncer al pulmón), comieron alimentos con HAPs (cáncer al estómago), o se les aplicó HAP en la piel (cáncer a la piel) (ATSDR, 1996).

La genotoxicidad depende de dos características de los HAP. En primer lugar su estructura química: algunos compuestos como el Benzopireno tienen una región de su molécula con capacidad de captar electrones, que les permite interactuar con moléculas complejas como el ADN. Por otra parte, la mayoría de los HAP no tienen esta propiedad de forma natural, sino que quienes la tienen son los productos derivados de ellos durante el metabolismo. Entre alguno de los cáncer que se asocian a la exposición de HAP, están el cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, entre otros tumores (Agudo, 2009).

En la Tabla 2.2 se presenta que no todos los HAP han mostrado poseer efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutagénicos y muchas veces el efecto se atribuye a la presencia conjunta de más de un compuesto de la familia y de algunos de sus derivados, principalmente los nitroderivados.

Tabla 1.2. Datos relativos a los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos HAP.

| HAP | Carcinogenicidad | Genotoxicidad | Mutagenicidad |
|---|------------------|---------------|---------------|
| Fenantreno | I | L | + |
| Antraceno | N | N | - |
| Pireno | N | L | + |
| Benzo(a)antraceno | S | S | + |
| Benzo(e)pireno | I | L | + |
| Benzo(a)pireno | S | S | + |
| Dibenzo(a)antraceno | S | S | + |
| (S= Suficiente; I=Insuficiente; N= no carcinogénico; L=limitados.) Mutagenicidad (Test de Ames): +(positivo); -(negativos);?(inconcluso) | | | |

Fuente: Mastarde *et al.* (2005).

2.4 Efectos en el ambiente.

El acelerado crecimiento de la población mundial ha dado como resultado una mayor demanda de combustibles fósiles (hidrocarburos). Aunque muchos de estos compuestos se utilizan para generar energía, un alto porcentaje se libera al ambiente en los procesos de extracción, refinado, transporte y almacenamiento, lo que representa un riesgo potencial para los ecosistemas (SEMPLE *et al.*, 2001).

Después que ocurre un derrame o fuga de hidrocarburos, el comportamiento en el ambiente está dado por las características del tipo de sustancia vertida y las propiedades de las matrices ambientales involucradas. Así, por ejemplo, una vez que ha ocurrido la descarga o derrame de petróleo u otro hidrocarburo se comienzan a producir diversos procesos físicos, químicos y biológicos que determinan el grado de daño que el hidrocarburo causa al ambiente (Castro, 2007).

Los HAP pasan al aire principalmente por incendios forestales, emisiones volcánicas, combustión de carbón y del escape de automóviles, en el aire se encuentran adheridos a partículas de polvo., ya que ciertas partículas de HAP del suelo o de aguas superficiales pueden evaporarse con facilidad, estos pueden degradarse en un período de días a semanas al reaccionar con luz solar o con otras sustancias químicas en el aire (Castro, 2007).

Los derrames de hidrocarburos de petróleo son una de las principales fuentes de contaminación de suelos y aguas ya que ocasionan perturbaciones en los ecosistemas al afectar su estructura y bioprocesos. Este tipo de contingencias

ambientales originan efectos directos sobre la biota, ya que el petróleo contiene compuestos químicos tóxicos que producen daños a plantas, animales y humanos pero principalmente sobre las poblaciones de microorganismos, los cuales representan parte importante del ecosistema y son claves para los procesos biogeoquímicos (Vasudevan *et al.*, 2001).

Los HAP también pasan al agua a través de desechos de plantas industriales y de plantas de tratamiento de aguas residuales que llegan a poseer altas concentraciones de los derivados más peligrosos de los hidrocarburos. La mayoría de los HAP no se disuelven con facilidad en agua.

En el agua, los hidrocarburos se esparcen rápidamente, debido a la existencia de una importante diferencia de densidades entre ambos líquidos, llegando a ocupar extensas áreas, y dificultando por lo tanto sus posibilidades de limpieza. Se crea una capa de unos pocos micrones de espesor lo que imposibilita la interacción entre la flora y la fauna marina con la atmósfera, obstruyendo así el ciclo natural de vida (García, 2005^a; García, 2005^b).

En el suelo, es probable que los HAP se adhieran firmemente a partículas; ciertos HAP se trasladan a través del suelo y contaminan el agua subterránea (Castro, 2007).

El derrame de hidrocarburos de petróleo al suelo trae consigo impactos importantes en la actividad de los microorganismos, y afecta la funcionalidad del ecosistema (Zamora, *et al.*, 2012).

Según un estudio realizado por la Academia de Ciencias de los E.E.U.U, las actividades navales son responsables del 33% de los derrames de petróleo en el ambiente marino, las instalaciones terrestres y descargas urbanas del 37% y sólo un 12% de la contaminación marina por hidrocarburos procede de los siniestros de petroleros, el resto se debe a operaciones rutinarias (López de Uralde, 1998).

Cuando una sustancia es emitida al ambiente puede ocurrir uno o más de los siguientes eventos (Castro, 2007):

- Movimiento en agua, sedimento suspendido, etc.
- Transformación física Volatilidad, lluvia, etc.
- Transformación química Fotólisis, hidrólisis y oxidación/reducción.
- Transformación biológica Biodegradación y atenuación natural.
- Acumulación en uno o más medios, incluyendo el medio originalmente contaminado.

La probabilidad de que efectos biológicos adversos ocurran en respuesta a la exposición a los HAP en un sitio en particular depende de la sensibilidad del individuo especies y los puntos finales examinados. Además, la biodisponibilidad de los HAP se ve influenciada por varios factores, incluidas las propiedades fisicoquímicas de la HAP, factores geoquímicas, y los factores biológicos (Environment Canada, 1999).

CAPITULO III. BIODEGRADACIÓN EN EL MEDIO ACUÁTICO DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Las costas soportan una importante actividad urbana e industrial por lo que se ven continuamente amenazadas por diversos procesos contaminantes, figurando entre los más preocupantes, aunque no los únicos, las mareas negras por vertidos de hidrocarburos (Soriano, 2009). Las descargas accidentales de productos derivados del petróleo son motivo de especial preocupación en el ambiente (Das y Chandran, 2011).

Los HAP llegan al medio ambiente marino por vía atmosférica y acuática. Cuando estos compuestos son emitidos al aire, algunos están en fase gaseosa, otros adsorbidos a partículas, mientras que los semivolátiles están en parte, en forma gaseosa y en parte adsorbida a partículas, dependiendo de la temperatura y la concentración de éstas. Posteriormente se transfieren desde la atmósfera al suelo o al agua superficial tanto por deposición seca como por sedimentación de las partículas y, dependiendo de la temperatura, se puede producir reemisión desde el suelo. La movilidad de estos compuestos en el suelo está determinada por el transporte acuático (Soriano, 2009).

Los HAP son poco solubles en el agua y se adsorben fuertemente a las partículas, aunque los compuestos de bajo peso molecular (con 3 o menos anillos) son más solubles que los de alto peso molecular (4 o más anillos). Por tanto, la movilidad de los HAP en corrientes de agua está muy determinada por el transporte de partículas, y como resultado final las partículas se sedimentan en el mar (Soriano, 2009).

Según Soriano, (2009) los HAPs unidos a partículas son menos degradables y solubles en agua. Debido a la baja tasa de degradación, la menor volatilidad y la fuerte adsorción a partículas, los que poseen un elevado peso molecular tienden a acumularse en los sedimentos. Además los HAPs debido a su elevada hidrofobicidad, presentan una alta afinidad por las partículas, por ello los sedimentos son el depósito final de una gran parte de los hidrocarburos que llegan al mar.

Actualmente, los métodos mecánicos y químicos que generalmente se utilizan para eliminar los hidrocarburos de zonas contaminadas tienen una eficacia limitada y pueden ser costosos (Das *et al.*, 2011). Por lo tanto, la biorremediación mediante el uso de microorganismos juega un papel importante en la eliminación de los HAP en los ecosistemas terrestres y acuáticos, siendo la degradación microbiana, como en la mayoría de los compuestos orgánicos, el principal proceso de descontaminación natural (Domínguez *et al.*, 2002).

El proceso de biorremediación se define como el uso de microorganismos para desintoxicar o eliminar los contaminantes debido a sus diversas capacidades metabólicas, es un método de evolución de la eliminación y la degradación de muchos contaminantes ambientales incluyendo los productos de la industria del petróleo (Medina-Bellver *et al.*, 2005). Además se considera que la biorremediación es no invasiva y rentable (Das *et al.*, 2011).

Los primeros estudios que son considerados pioneros fueron realizados por ZoBell (1946) en ambientes marinos, a partir de ese momento se han aislado

numerosas cepas bacterianas de ambientes marinos costeros capaces de degradar diferentes hidrocarburos.

En los últimos 20 años se han publicado mucho sobre la capacidad de los microorganismos para su uso en la degradación de hidrocarburos, especialmente *n*-alcanos como fuentes de carbono y energía. Estos microorganismos pertenecen a *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp, *Mycobacterium* sp y *Rhodococcus* sp. (Balachandran *et al*, 2012).

En su gran mayoría las bacterias degradadoras de hidrocarburos se encuentran en el grupo de gram negativas. La degradación de hidrocarburos se lleva a cabo principalmente por bacterias, seguidas por los hongos, levaduras y algas, entre otros (Tabla 3.1). En un estudio comparativo de poblaciones, observaron que las bacterias participaron en el 82% de la degradación de *n*-hexadecano y los hongos con un 13%. En algunos estudios se reporta la degradación de hidrocarburos por algas (Domínguez, *et al.*, 2013).

Tabla 3.1. Géneros de especies que degradan hidrocarburos

| Bacterias | | Hongos |
|-----------------|----------------|----------------|
| Achromobacter | Micrococcus | Aspergillus |
| Acinetobacter | Neisseria | Aurogebasidium |
| Arthobacter | Nocardia | Candida |
| Aeromonas | Pseudomonas | Corollospora |
| Alcaligenes | Rhodococcus | Dendryphiella |
| Bacillus | Serratia | Fusarium |
| Brevibacter | Spharicus | Lulworthia |
| Corynebacterium | Streptomyces | Penicillium |
| Enterobacter | Sporobolomyces | Rhodotorula |
| Listonella | Xanthomonas | Variscosporina |

Fuente: Atlas y Bartha (1983); Song *et al* (1986); Leahy y Colwell

Estudios recientes, realizados por Grey *et al.* (2013) en áreas cercanas al Canal de Panamá (Bahía de Manzanillo) encontraron y aislaron microorganismos degradadores de hidrocarburos los cuales se identificaron de acuerdo a los principios generales de la clasificación microbiana, usando medios selectivos y macro - y el examen microscópico de los caracteres morfológicos. Las bacterias fueron identificadas a través del sistema API 20, y se identificaron como *Rhodococcus equi* y *Corynebacterium propinquum*.

Se realizó el aislamiento e identificación de dichos microorganismos degradadores de hidrocarburos, mediante el enriquecimiento selectivo descrito por Hernández *et al.* (1991), con un medio mineral y como fuente de carbono un HAP (naftaleno, fenantreno, pireno) y tolueno (Grey *et al.*, 2013).

Según Martínková *et al.* (2009) la biorremediación utilizando diversas cepas de bacterias del género *Rhodococcus* han demostrado ser una opción prometedora para la limpieza de los sitios contaminados.

La biodegradación microbiana ha sido ampliamente estudiada en las últimas dos décadas como un medio para eliminar los HAP, especialmente el Naftaleno en aguas residuales aceitosas contaminadas (Gomes *et al.*, 2009).

3.1. La deshalogenación de compuestos orgánicos.

Los compuestos orgánicos halogenados constituyen uno de los grupos más grandes y diversos de sustancias químicas ambientales. Aunque algunos de estos productos químicos son generados por procesos naturales bióticos y abióticos en los océanos y la atmósfera, el uso generalizado de la química a

base de halógeno en los procesos químicos a escala industrial durante los últimos 100 años ha introducido muchos halocarbonos artificiales adicionales en el medio ambiente (Jain *et al.*, 2005).

Estos productos químicos son con frecuencia químicamente estables y los átomos de halógeno sustituyentes hacen con frecuencia que sean altamente resistentes a la degradación microbiana (Evers y Craig, 1991).

Los esfuerzos de investigación se han centrado en los mecanismos de deshalogenación de compuestos orgánicos halogenados sintéticos debido a que estos productos químicos son resistentes a la degradación (recalcitrantes), son lipofílicos, y tienden a bioacumularse en la cadena alimentaria. Los microorganismos deben ser capaces de separar el enlace carbono-halógeno de compuestos halogenados. Sin embargo, esto requiere un período de retraso para la inducción de enzimas, llamadas deshalogenasas, que hidrolizan el enlace carbono-halógeno (Bitton, 1994).

Según Bitton, 1994 algunos mecanismos de deshalogenación son los siguientes (Figura 3.1):

a) Deshalogenación reductora: es la sustitución de un átomo de Cl con un átomo de H. La deshalogenación reductiva de compuestos orgánicos halogenados se produce en condiciones anaerobias, particularmente bajo condiciones metanogénicas, y requiere la inducción de enzimas deshalogenadoras.

b) Deshalogenación hidrolítica: es la sustitución de un halógeno por un grupo hidroxilo.

Compuestos aromáticos

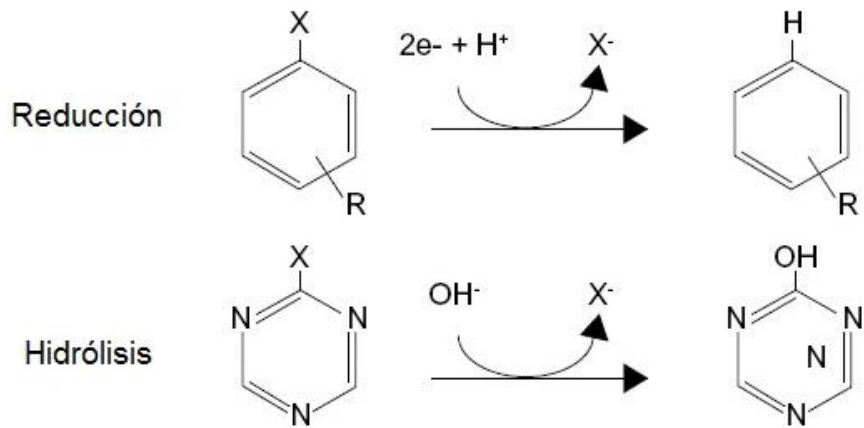


Figura 3.1. Mecanismos de deshalogenación.

Fuente: Sims *et al.*, 1991.

El género *Rhodococcus* es un grupo muy diverso de bacterias que posee la capacidad de degradar un gran número de compuestos orgánicos, incluyendo algunos de los compuestos más difíciles con respecto a la obstinación y la toxicidad. Logran esto a través de su capacidad para adquirir una notable gama de diversos genes catabólicos y su fisiología celular robusta (Larkin *et al.*, 2005).

Los compuestos orgánicos halogenados son comúnmente producidos por la industria y en la naturaleza y las bacterias adoptan varias estrategias enzimáticas diferentes para eliminar el átomo de haluro. La deshalogenación hidrolítica es común, sin embargo, el s-triazina hidrolasa (TrzA) de la especie *Rhodococcus corallinus* tiene un rango de sustrato limitada y estos compuestos pueden ser más comúnmente atacados por oxigenasas P450. Por el contrario, la *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 halidohidrolasa 1-cloroalcano DHAA

(RrDHL) exhibe una amplia especificidad para atacar muchos haloalcanos y halogenuros de alquilo secundarios (Larkin *et al.*, 2005).

3.2. Cometabolismo.

El cometabolismo se define como la transformación de un compuesto llamado cosustrato, en presencia obligada de un sustrato durante el crecimiento o por células en reposo en ausencia del sustrato de crecimiento. Varios compuestos sintéticos y orgánicos, que son tanto de importancia ambiental como toxicológica son degradados por cometabolismo. Este proceso es parte fundamental de la eliminación biológica de compuestos xenobióticos en el ambiente (García *et al.*, 2008).

Según García *et al.*, 2008 el cosustrato o cometabolito no aporta energía, carbono o algún otro nutriente y en consecuencia es incapaz de soportar la replicación celular. El sustrato de crecimiento actúa como un donador de electrones que proporciona poder reductor y energía para el crecimiento y el mantenimiento celular. Se debe aclarar que la presencia del cosustrato no induce la actividad de las enzimas involucradas en su transformación, ya que se trata de una transformación colateral a la degradación del sustrato el cual sí induce la actividad enzimática.

Los primeros estudios hechos sobre el cometabolismo fueron realizados por Leadbetter y Foster en los 50s. Ellos observaron que la bacteria *Pseudomona methanica* oxidaba al etano pero no podía ocuparlo como fuente de carbono. Subsecuentemente se observó que esta bacteria, al crecer en un medio con

metano, podía transformar diferentes hidrocarburos. Este fenómeno fue designado por Foster en 1962 como “Co-oxidación” (García *et al.*, 2008).

Por otro lado, en 1963 Jensen observó que *Pseudomonas* era capaz de crecer en monocloroacetato y deshalogenar tricloroacetato, sin usar a éste último como fuente de carbono para el crecimiento. Con estos resultados Jensen generalizó el término co-oxidación para incluir otro tipo de reacciones, como las deshalogenaciones, y lo llamó “co-metabolismo” (García *et al.*, 2008).

El cometabolismo se ha demostrado en cultivos puros y mixtos para una amplia gama de compuestos (insecticidas, herbicidas, surfactantes, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, y otros productos químicos industriales), se ha sugerido que se produce en la naturaleza. Hay evidencia de la ocurrencia del cometabolismo en aguas residuales (Bitton, 1994).

Para muchos HAP, especialmente aquellos con cuatro o más anillos aromáticos, el cometabolismo puede ser la única vía para su degradación (Allen *et al.*, 1999).

3.2.1. Cometabolismo de compuestos xenobióticos en el ambiente.

Los avances en la síntesis química han conducido a la producción a gran escala de diferentes compuestos orgánicos, que tienen un destino muy variable en el ambiente. La mayoría de estos compuestos son parecidos a algún compuesto natural, de modo que pueden ser degradados por el metabolismo microbiano. Otros compuestos sintéticos tienen estructuras moleculares o secuencias de enlaces químicos no reconocibles por los microorganismos, éstos

son los llamados xenobióticos. Estos compuestos pueden ser parcialmente metabolizados o resistentes a la biodegradación, es decir, recalcitrantes (García *et al.*, 2008).

Los compuestos xenobióticos que usualmente son resistentes a la degradación por especies biológicas individuales, pueden mineralizarse por secuencias catabólicas complementarias, que se llevan a cabo entre múltiples especies microbianas, en donde la transformación inicial es por cometabolismo (Fritsche, 1985).

Los compuestos finales de la transformación cometabólica pueden ser muy variados dando como resultado especies menos peligrosas, o bien, más susceptibles a la degradación biológica. Sin embargo, puede ocurrir la formación de compuestos que se acumularán en el ambiente si no son intermediarios de otras rutas catabólicas, o si no están presentes microorganismos capaces de utilizarlos como cosustrato (Alexander, 1999).

El cometabolismo de xenobióticos en ambientes naturales ocurre a tasas lentas, porque las poblaciones microbianas son pequeñas y no se incrementan en respuesta a la introducción de esos compuestos en el ambiente. Adicionalmente, en ambientes naturales, no es fácil de determinar la ocurrencia del cometabolismo debido a las diversas reacciones catabólicas que tienen lugar en los microorganismos interrelacionados y la dificultad para comprar los efectos positivos que puede ejercer unos compuestos sobre el consumo de otro (García *et al.*, 2008).

Los hidrocarburos son los contaminantes mayoritarios debido a su utilización masiva como combustibles y solventes, entre otros usos. Algunos hidrocarburos que son transformados por cometabolismo entre los más sencillos se pueden mencionar a los trimetilalcanos, componentes de la gasolina, que son degradados por cometabolismo, aunque existen bacterias especializadas que pueden utilizarlos como sustratos (Solano-Serena *et al*, 2001).

Bacterias, cianobacterias, algas y hongos, son capaces de degradar hidrocarburos policíclicos de bajo (dos o tres anillos) o alto peso molecular (cuatro o más anillos) como naftaleno, acenafteno, antraceno, fluoranteno, pireno y criseno y usarlos como única fuente de carbono y benzo(a) pireno por cometabolismo (Yanine, 2010).

3.3. Regulación genética de la biodegradación de xenobióticos.

Las sustancias xenobióticas se definen como compuestos orgánicos o minerales que son introducidos en el ambiente por actividades del hombre a concentraciones que provocan efectos indeseables (Frioni, 1999).

Los genes que regulan el catabolismo de muchos xenobióticos son plásmidos cargo. Los plásmidos catabólicos (o plásmidos de degradación) son elementos extracromosómicos que controlan la transformación de compuestos xenobióticos. Se han identificado número limitado de tipos de bacterias, principalmente en el género *Pseudomonas*. Estos plásmidos catabólicos pueden perderse cuando los microorganismos no se mantienen en el sustrato específico para la enzima codificada (pWWO). Este plásmido codifica 117-kb para la

degradación de tolueno y xilenos, y para su propia replicación y transferencia. Las cepas microbianas multiplasmidas se han construido para la biodegradación de hidrocarburos en el petróleo crudo. Estas cepas son capaces de degradar tolueno, xilenos, alcanfor, octano, y naftaleno. Los plásmidos de degradación se han construido para la biodegradación de xenobióticos tóxicos muy persistentes, es decir, los compuestos clorados. Sin embargo, el uso de estos nuevos plásmidos que llevan microorganismos bajo condiciones de campo queda por investigar (Bitton, 1994).

La contaminación del suelo y el agua con xenobióticos es un problema de creciente magnitud. La limpieza in situ puede incluir el método de biorremediación, la cual se puede definir como: a) un método de monitorear el progreso natural de la degradación para asegurarse de que el contaminante disminuye con el tiempo de muestreo (bioatenuación), b) la estimulación intencional de las bacterias que degradan xenobióticos residentes por aceptores de electrones, el agua, la adición de nutrientes, o donantes de electrones (bioestimulación), o c) la adición de bacterias de crecidas en laboratorio que tienen capacidades de degradación apropiadas (bioaumentación) (Widada *et al.*, 2002).

Puesto que las bacterias son generalmente los agentes en la mayoría de los procesos de biorremediación, la evaluación de un sitio contaminado antes de biorremediación a menudo implica la detección y el recuento de la cantidad y actividad de las bacterias que degradan-xenobióticos. Tales estudios requieren

técnicas de enumeración que producen resultados precisos con rapidez y seguridad (Widada *et al.*, 2002).

Los ecologistas genéticos trabajan hacia la mejora de las capacidades de las comunidades microbianas naturales a nivel del gen a través de la amplificación de genes y aumento de la expresión. El aumento de la actividad de las comunidades microbianas naturales daría lugar a una mayor degradación de contaminantes orgánicos tóxicos y a la biotransformación de metales tóxicos a los tipos que son menos tóxicos, así como menos disponible para la biota. Este enfoque parece ser menos problemático que el basado en la introducción de microorganismos genéticamente modificados en el medio ambiente (Bitton, 1994).

Hay ciertas ventajas para el enfoque genético ecológico. En primer lugar, los genes controlan funciones específicas, mientras que las células enteras llevan a cabo una multitud de funciones muchas de las cuales son de utilidad para un objetivo particular. Además, los genes que controlan una función específica (la degradación de un compuesto xenobiótico) se pueden amplificar a través de manipulaciones genéticas. Desde entonces varios plásmidos catabólicos han reportado que la biodegradación de un xenobiótico dado se puede aumentar mediante el impulso de la transferencia de genes a través de la manipulación del medio ambiente (Bitton, 1994).

3.4. Biotransformación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en las plantas de tratamiento de aguas residuales.

La biotransformación es la alteración de los compuestos orgánicos por una acción microbiana, a veces por consorcios de microorganismos. La transformación biológica de un xenobiótico puede resultar en la mineralización, la acumulación, o la polimerización del compuesto con compuestos de origen natural (Bitton, 1994).

Las aguas residuales son aquellas cuya calidad original se ha degradado en alguna medida, como consecuencia de su utilización en diferentes acciones y procesos (Pérez *et al.*, 2004).

Estas aguas contienen, como carga contaminante, materia orgánica de origen biológico, compuestos tóxicos, microorganismos patógenos, exceso de nutrientes, hidrocarburos, entre otros. Por tal razón, antes de su disposición final deben recibir el tratamiento adecuado capaz de modificar, al límite, sus condiciones físicas, microbiológicas y químicas, a fin de evitar problemas de contaminación (Pérez *et al.*, 2004).

Las aguas residuales industriales son aquellas que proceden de los procesos tecnológicos y se caracterizan por su generación periódica o continua en grandes volúmenes, así como por su variada composición. La caracterización de las aguas residuales es un aspecto muy importante, ya que permite evaluar el impacto ambiental que producen, de modo que sea posible diseñar el sistema adecuado para su tratamiento y/o aprovechamiento (Pérez *et al.*, 2004).

La biotransformación es la ruta principal para la eliminación de xenobióticos, como los HAPs, de un organismo (Jørgensen, 2005). Las aguas residuales que contienen hidrocarburos de petróleo son altamente tóxicas y de gran peligro para las comunidades cercanas. Por lo tanto, es necesario aplicarles algún tratamiento de biodegradación antes de su descarga (Hamza *et al.*,2012).

El agua residual se puede tratar por métodos fisicoquímicos o biológicos. Es preferible el tratamiento biológico ya que es rentable, eficiente y amigable con el medio ambiente. La biotransformación implica el uso de microorganismos para transformar los contaminantes nocivos en productos inocuos. Las bacterias y los hongos se utilizan a menudo para la descomposición bioquímica de las aguas residuales y transformarlos en productos finales estables. De esta manera se forman más microorganismos, o lodos, y una parte de los residuos se convierte en dióxido de carbono, agua y otros productos finales. Esto se logra mediante la mejora de las condiciones (pH, nutrientes y aireación) de los microorganismos indígenas para llevar a cabo el proceso de biorremediación (Hamza *et al.*,2012).

La tasa de degradación de hidrocarburos en las plantas de tratamiento de aguas residuales depende de: la velocidad de aireación, la disponibilidad de nutrientes, pH entre otros. La demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) son los parámetros más significantes empleados para informar de la composición o extensión de la contaminación de las aguas residuales de la refinería (Hamza *et al.*,2012).

La biodegradación tiene una ventaja sobre otros tratamientos métodos, ya que puede destruir de manera eficiente los hidrocarburos presentes contaminantes y no permite que el contaminante se acumule (Gargouri *et al.*, 2011).

La especie *Rhodococcus* son candidatos especiales para la mejora de biorremediación de sitios contaminados y han demostrado ser de enorme utilidad para una amplia gama de biotransformaciones (Larkin *et al.*, 2005).

CAPITULO IV. LA ELIMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR PROCESOS BIOLÓGICOS.

La biorremediación o saneamiento biológico es una tecnología basada en procesos naturales que utiliza la capacidad los microorganismos, tales como bacterias y hongos, para transformar compuestos químicos con la finalidad de disminuir o eliminar su condición de contaminante (Ortega, 2010).

Arroyo *et al* (2002), hace énfasis en que el fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia. Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Figura 4.1).

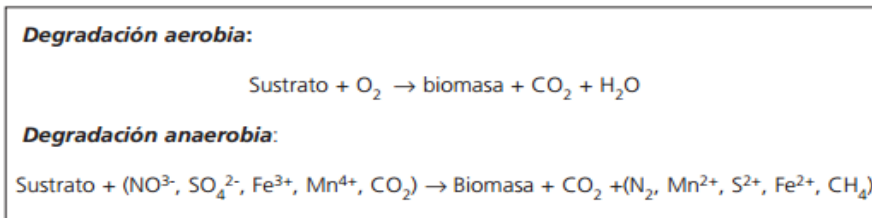


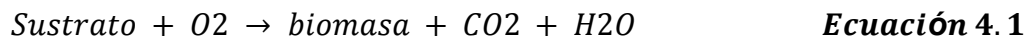
Figura 4.1 Esquema de reacciones (ecuaciones)

4.1. Procesos aerobios.

La degradación más rápida y completa de la mayoría de los contaminantes orgánicos se produce en condiciones aeróbicas (Das *et al.*, 2011). La biodegradación aeróbica de los hidrocarburos y el petróleo crudo es un largo proceso conocido y bien estudiado. Sin embargo, la capacidad de los microorganismos anaerobios para oxidar y utilizar el aceite crudo como un sustrato orgánico complejo bajo condiciones aeróbicas fue descubierto recientemente. Estos microorganismos descomponen la mayoría de los compuestos orgánicos en dióxido de carbono, agua y materia mineral, tales como sulfato, nitrato y otros compuestos inorgánicos. No producen sulfuro de hidrógeno o metano como productos de reacción. La vía aeróbica avanza más rápidamente y más eficientemente, ya que las reacciones aeróbicas requieren menos energía libre para la iniciación y producen más energía por reacción (Malatova, 2005).

Los hidrocarburos se descomponen por una serie de reacciones mediadas por enzimas. El oxígeno sirve como un aceptor de electrones externo, mientras que un componente orgánico de las funciones de sustancias contaminantes como el donante de electrones o fuente de energía (Malatova, 2005). En la

siguiente ecuación se describe el proceso de degradación aerobia (Arroyo y Quezada 2002).



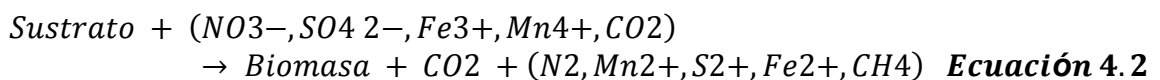
El oxígeno generalmente es el mejor aceptor de electrones, es decir, el que produce la mayor energía libre en una reacción completa. En consecuencia, para un mismo sustrato orgánico, los microorganismos que emplean el oxígeno como agente oxidante pueden generar mayor energía que aquellos que emplean nitratos, sulfatos ú otros aceptores de electrones alternativos, logrando de esta forma crecer a mayor velocidad, lo que implica un mayor consumo del sustrato. Por lo tanto la biorremediación aerobia es típicamente más eficiente que la biorremediación de contaminantes orgánicos en forma anaerobia (Gómez *et al.*, 2008).

4.2. Procesos anaerobios

En contraste con el hecho de que el metabolismo aérobico microbiano de los hidrocarburos ha sido ampliamente investigado, lo mismo no puede decirse sobre el metabolismo anaeróbico de los hidrocarburos (Malatova, 2005). Muchos estudios sobre la biodegradación anaeróbica de los hidrocarburos en los hábitats naturales, se iniciaron en microcosmos y cultivos de enriquecimiento para determinar si o no los procesos de biorremediación son posibles en los sedimentos profundos, petróleo contaminado anóxico o contaminado con combustible y acuíferos (Widdel y Rabus, 2001).

El rol de las bacterias que participan en estos procesos en condiciones anóxicas/anaeróbicas durante la biodegradación no se entienden completamente. El oxígeno no está disponible en todos los ambientes donde se producen los hidrocarburos (por ejemplo, en los sedimentos profundos, suelos inundados, lagunas eutróficas, aguas estancadas y las aguas del océano y en yacimientos de petróleo) (Malatova, 2005).

No fue hasta finales de 1980 que se encontraron nuevos grupos de microorganismos que usan los hidrocarburos saturados y aromáticos como sustratos de crecimiento en condiciones estrictamente anóxicas. Estos microorganismos utilizan el nitrato, hierro férrico o sulfato como aceptores de electrones para la respiración anaerobia, crecer en cocultivos microbiano con otros anaerobios o crecer por anoxigénica fotosíntesis (Widdel *et al.*, 2001). A continuación (Ecuación 1) se describe el proceso de degradación anaeróbica.



Los estudios han confirmado que estos microorganismos activan compuestos orgánicos por mecanismos bioquímicos especiales que difieren completamente de los empleados en el metabolismo aeróbico de hidrocarburos (Malatova, 2005).

No hay duda de que la degradación de petróleo y productos refinados es mucho más rápido bajo condiciones óxicas (presencia de oxígeno) que bajo condiciones anóxicas (sin presencia de oxígeno). Además, los microorganismos

aeróbicos parecen degradar una gama más amplia de compuestos de hidrocarburos de microorganismos anaerobios (Widdel y Rabus, 2001).

Los procesos de biorremediación aeróbicos son muy eficaces en el tratamiento de la contaminación de hidrocarburos, sin embargo, a menudo son caros. Por esta razón la biodegradación anaeróbica proporciona rentable y ventajoso en la tecnología de biorremediación in situ que puede ser utilizado para la descontaminación de suelo, sedimento, y el agua subterránea contaminada con hidrocarburos de petróleo (Malatova, 2005).

La degradación anaeróbica de hidrocarburos por microorganismos también ocurre, no obstante, es muy baja y su significación ecológica puede ser menor (Atlas y Bartha, 2002).

Debido a que los procesos anaeróbicos son por lo general más lento y menos eficiente que la degradación en condiciones aeróbicas, esta aplicación sólo es apropiada en lugares con acceso limitado de aire, o que no puede ser aireado fácilmente (Heider *et al.*, 1998).

4.3. Utilización de bacterias nativas en la biodegradación de hidrocarburos

La degradación de hidrocarburos es un fenómeno que se da en forma natural en el medio ambiente. En los sitios donde hay contaminación crónica con hidrocarburos están aumentadas las poblaciones bacterianas que se alimentan de ellos, porque son productos naturales y por ende biodegradables (Nievas *et al.*, 2006).

La biodegradación de hidrocarburos por poblaciones nativas de microorganismos representa uno de los mecanismos primarios por el cual los hidrocarburos contaminantes son eliminados del ambiente. Las tasas de degradación bajo condiciones óptimas de laboratorio se encuentran entre 2.500 – 100.000 g/m³/día, bajo condiciones de campo (in situ) están en un orden de magnitud bajo, en el rango de 0,001-60 g/m³/día (Chirinos *et al.*, 2010).

Los mecanismos bioquímicos de la degradación de compuestos orgánicos son complejos y dependen de las condiciones fisicoquímicas del medio, del tipo de sustrato y del microorganismo. Dichos mecanismos no están totalmente estudiados y sólo se ha investigado la degradación de algunos compuestos específicos. Cada especie de microorganismos tiene una capacidad específica para degradar hidrocarburos: solo ataca algunos compuestos específicos y en un grado determinado (Ercoli, 1998).

4.3.1. Factores que influyen en la concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación del contaminante

El crecimiento de un microorganismo o el tamaño y productividad de una comunidad están limitados por factores biológicos y ambientales.

Existen además factores muy importantes como contenido de materia orgánica, nivel de humedad, pH, aireación y contenido de nutrimentos (Vecchioli *et al.*, 1990).

–Contenido de nutrientes: El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes

químicos se encuentren disponibles para su asimilación y sintetización. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno.

- pH del agua: afecta significativamente en la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8.

- Temperatura: generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45 °C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C.

- Estructura química del hidrocarburo: la inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular. Siendo los parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica.

CAPITULO V. METODOLOGÍA, EJECUCIÓN Y PUESTA EN MARCHA DEL REACTOR EN CONTINUO A ESCALA DE LABORATORIO PARA EL TRATAMIENTO DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.

5.1. Diseño de investigación

El diseño de esta investigación fue de tipo experimental.

5.2. Diseño Experimental

En el diseño experimental utilizado para esta investigación (Figura 5.1), se utilizó un tanque con un volumen útil de 22 litros que contenía el efluente de agua artificial de refinería (Chang *et al.*, 2014) con una bomba sumergible para mantener el movimiento y aumentar la solubilidad del medio en especial del Naftaleno; este se conectó por medio de una manguera con una llave dosificadora con caudal de 12,6 mL/min (18,14 L/día), a otro tanque con dos compartimientos, uno el reactor con dimensiones de 39,5 cm de altura, 20 cm de ancho y 20 cm de largo, donde su volumen útil es de 14 litros, también se colocaron una bomba sumergible y 4 aireadores para la oxigenación del medio y de esta manera mantener las bacterias con oxígeno, luego del tiempo de retención, el medio paso a la sección del sedimentador la cual tiene un volumen útil de 8 litros, al finalizar el tratamiento el efluente salió hacia un tanque con un volumen de 22,3 litros para facilitar la recolección de las muestras.

Se utilizó una bomba peristáltica la cual recirculaba lodo del sedimentador al reactor a razón de 7 mL/min.

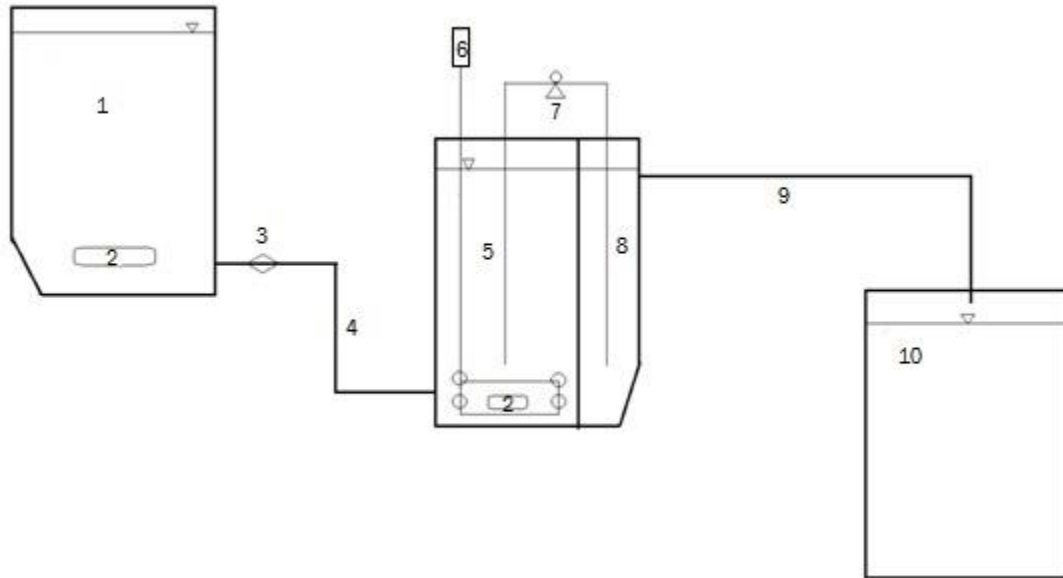


Figura 5.1. Esquema del diseño experimental utilizado en la investigación. Descripción: 1. Tanque de afluente, 2. Bomba sumergible, 3. Llave reguladora de caudal 4. Tubo de entrada de caudal 5. Reactor, 6. Bomba Aireadora, 7. Bomba de recirculación, 8. Sedimentador, 9. Tubo de salida de efluente, 10. Tanque del efluente.

La construcción e instalación del sistema se realizó en el Laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería Civil (Figura 5.2).



Figura 5.2. Construcción e instalación del Sistema.

5.3. Agua residual artificial

La composición del agua artificial residual se preparó de acuerdo a Chang *et al.* (2014) con los siguientes compuestos, Glucosa 1,5 g/L, Disfotato de potasio (K_2HPO_4) 3,46 g/L, Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 1,36 g/L y Cloruro de Amonio (NH_4Cl) 2,10 g/L (Figura 5.3) (Chang *et al.*, 2014).

Al medio preparado se le agregó entre 0,55g– 0,66g de Naftaleno. El DQO (Demanda Química de Oxígeno) correspondiente a este medio se encuentra en el rango de 1300mg/L y 1250 mg/L.



Figura 5.3. Reactivos que componen el agua residual artificial.

5.4. Cepa bacteriana *Rhodococcus equi*

Se seleccionaron las colonias bacterianas degradadoras de naftaleno, todos los aislamientos fueron examinados por reacción de tinción de Gram para diferenciar entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas

La bacteria *Rhodococcus equi* que se muestra en la (Figura 5.4) fue aislada de *muestras de sedimentos marinos por su capacidad de utilizar el naftaleno como única fuente de carbono y energía para el crecimiento* (Grey *et al.*, 2013).

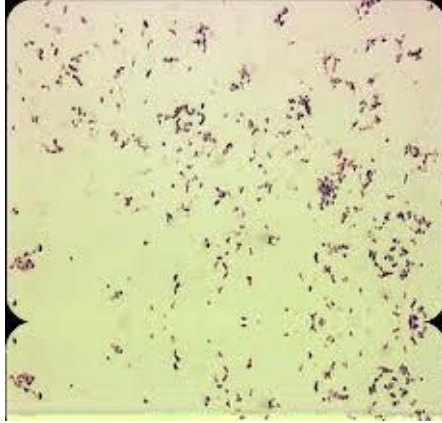


Figura 5.4. Cepa degradadora de Naftaleno identificada a través del método API CORYNE, como *Rhodococcus equi*.
Fuente: Grey *et al.*, (2013).

5.5. Control de operaciones y puesta en marcha

El medio era añadido al tanque por un caudal constante gracias a la gravedad del sistema. Durante el periodo de estudio, el pH del sistema se mantuvo entre 6,5 y 7,03, y la temperatura varió entre 23 y 26 °C. El medio nutritivo adoptado en esta investigación fue similar al descrito por Chang, et al (2014).

La investigación contó con dos fases o escenarios a estudiar, los cuales solo variaron en el tiempo de retención.

Escenario 1

La duración del estudio de este escenario tuvo una duración de doce (12) días, de pruebas y mediciones, y el sistema funciono de la siguiente manera, el efluente entro al reactor a razón de 12,6 mL/min, al llegar a un nivel de 8 litros se le añadieron 15 mL de la bacteria *Rhodococcus equi* como se muestra en la Figura 5.5 , la cual se tenía aislada, el tiempo de retención hidráulico (TRH) de esta fase fue de un día (24 h), se hicieron mediciones de pH, temperatura (°C), Sólidos disueltos totales (SDT, mg/L), con el multiparámetro y se tomaron

muestras para pruebas para DQO (Método 8000- HACH DR/2400) al efluente, además en el reactor y en la salida del sistema se midieron parámetros de pH, temperatura (°C), SDT(mg/L), también se tomaron muestras para las pruebas de DQO, DBO₅, Sólidos Volátiles, y para la siembra en placas petri para contabilizar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL).

Escenario 2

El programa de muestro y estudio de este escenario tuvo una duración de diez (10) días, el cual se diferenció del escenario 1, por el tiempo de retención hidráulico, el cual se estableció fuera de 2 días, en este periodo además de las pruebas que se hicieron en el escenario 1, también se tomaron muestras del reactor y de la salida, para la medición por medio de la Cromatografía líquida la eficiencia de la bacteria a la hora de degradar el hidrocarburo en este caso el Naftaleno.

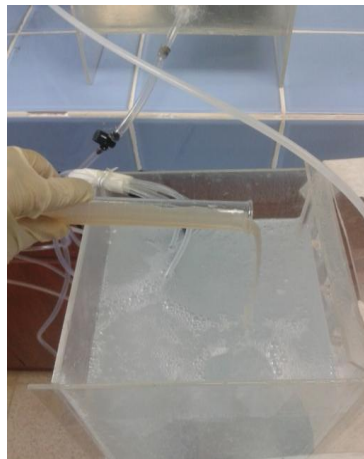


Figura 5.5. Adición de 15 mL de bacterias en 8 litros de agua artificial en la sección del reactor.

5.6. Medición de parámetros físicos, químicos, biológicos y medición del Naftaleno.

5.6.1. Parámetros físicos-químicos

pH.

Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo sólo puede crecer en un rango estrecho de pH fuera del cual mueren rápidamente, este rango está entre 6,0 a 7,0, los rangos de pH tolerables varían o son distintos para diferentes microorganismos. Con esta prueba se buscó cuantificar la concentración de iones hidrógeno del agua artificial de refinería en el efluente, el reactor y a la salida del sistema.

Se extrajeron por triplicado muestras de 25 mL, del efluente, el reactor y de la salida, haciendo un total de nueve (9) muestras cada 24 horas (Escenario 1) o 48 horas (Escenario 2), se utilizó un pHmetro para la medición de este parámetro (Figura 5.6), se estandarizó el instrumento, sumergiendo el electrodo en una solución amortiguadora con un pH aproximado al pH de la muestra, luego se enjuago y seco el electrodo y se sumergió el electrodo en cada una de las muestras tomando así el valor del pH de cada una.



Figura 5.6. Medición del pH de las muestras del efluente, reactor y la salida, con un pHmetro.

Temperatura y Sólidos totales Disueltos.

Con ayuda de un multiparámetro (Figura 5.7) se midieron en triplicado la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y los Sólidos totales Disueltos (mg/L) del efluente, el reactor y la salida (Figura 5.8).



Figura 5.7 Multiparámetro.

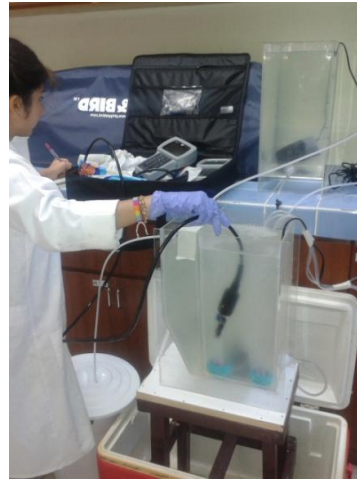


Figura 5.8. Medición de la Temperatura y los STD.

Sólidos Suspendedos.

Mediante la utilización de un equipo espectrofotométrico, se determinó la concentración de material en suspensión en las muestras de agua artificial que dan origen a los sólidos suspendidos.

Se utilizó un espectrofotómetro (Figura 5.9), se introdujo el número de programa (630) para Sólidos Suspendidos y se ajustó la longitud de onda a 810 nm, se extrajeron muestras del reactor y a la salida del sistema, en una celda 25 mL y se utilizó otra celda de 25 mL para el blanco que en este caso se utilizó agua destilada.

Se colocó la celda en blanco en el equipo y se tapó para evitar el paso de la luz, se presionó ZERO y el equipo envió el mensaje de “0. mg/L SUSP.SOLIDS”,

luego se colocaron cada una de las celdas que contenían las muestras y se leyó la cantidad de Sólidos Suspendidos que cada una tenía.



Figura 5.9 Espectrofotómetro para la medición de Sólidos Suspendidos.

Sólidos Totales, fijos y volátiles.

Los sólidos pueden afectar la calidad del agua en gran medida, el término sólidos totales se refiere al material que queda en el recipiente después de la evaporación de la muestra y su subsiguiente secado en un horno a una temperatura definida.

Para calcular la cantidad de sólidos en el agua se tomaron muestras de 50 mL del reactor y la salida, y se colocaron en capsulas de porcelana con un peso inicial y sin muestra, luego agregada la muestra se llevo al horno por 24 horas con temperatura de secado entre 103-105 °C, la diferencia del peso inicial de la capsula menos el peso después del secado nos dará el valor de los sólidos totales de cada muestra, luego se lleva la misma capsula a otro horno con temperatura de 180°C o más y la diferencia de peso de la capsula menos el segundo secado en horno nos dio el valor de los Sólidos fijos.

$$\text{Sólidos Totales (mg/L)} = \frac{(A-B) \times 1000}{\text{mL de muestra}} \quad \textbf{Ecuación 5.1}$$

A= Peso de la cápsula más sólidos totales en mg

B= Peso de la cápsula en mg

$$\text{Sólidos Fijos (mg/l)} = \frac{(A-B) \times 1000}{\text{mL de muestra}} \quad \textbf{Ecuación 5.2}$$

A= Peso de la cápsula más sólidos disueltos o filtrables en mg

B= Peso de la cápsula en mg

ST= Sólidos totales

SF= Sólidos fijos

$$\text{Sólidos Volátiles} = \text{Sólidos Totales} - \text{Sólidos Fijos} \quad \textbf{Ecuación 5.3}$$

5.6.2. Parámetros bioquímicos

Kiely, (1999) afirma que el contenido orgánico de un efluente de agua residual o curso de agua se determina empleando algunos de los siguientes ensayos:

- DBO₅: Demanda bioquímica de oxígeno.
- DQO: Demanda química de oxígeno.
- COT: Carbono orgánico total.

Cuando un residuo orgánico se vierte a un curso de agua, el contenido orgánico del efluente experimenta la siguiente reacción bioquímica, es decir ayudada por microorganismos:

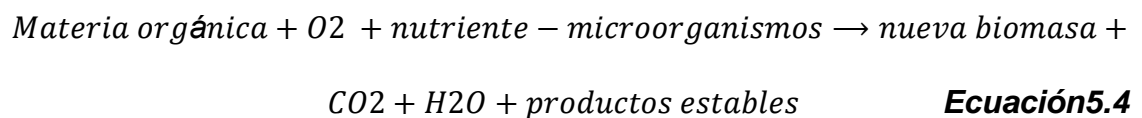


Tabla 5.1. Comparación de DQO, DBO₅ y COT.

| Parámetro | DQO | DBO ₅ | COT |
|---------------------------|---|---|---|
| Oxidante usado | K ₂ Cr ₂ O ₇ , Mn ₂ (SO ₄) ₃ . | Oxidación por microorganismos. | -O ₂ -K ₂ S ₂ O ₈ -Calor -Combinación de los compuestos anteriores con varios catalizadores |
| Uso adecuado | Monitoreo rápido y frecuente de la eficiencia de la planta de tratamiento y calidad del agua. | Modelado de procesos de la planta de tratamiento y los efectos de los compuestos orgánicos en el contenido de oxígeno disuelto de las aguas receptoras. | Mide la cantidad de carbono orgánico total en las muestras. |
| Duración de prueba | 1-1/2 a 3 horas. | 5 días (para la prueba de DBO ₅ estándar). | Varios minutos a horas. |
| Precisión | De 5 - 10% de desviación estándar relativa; puede ser mayor cuando las muestras contienen sólidos en suspensión; la homogeneización de la muestra puede ser importante. | Desviación estándar relativa 15%; no se considera de alta precisión. | De 5 - 10% de desviación estándar relativa; puede ser mayor cuando las muestras contienen sólidos en suspensión; la homogeneización de la muestra puede ser importante. |

| | | | |
|---|---|--|--|
| <p style="text-align: center;">Ventajas</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Se correlaciona con la DBO₅ en materia de residuos con el entorno natural constante cuando los residuos con una composición constante. -Los materiales tóxicos no afectan el oxidante. -Los cambios en el valor de DQO entre el afluente y efluente puede paralela DBO₅ contenido y suplementos resultados de DBO₅ -Corto tiempo de análisis | <p style="text-align: center;">Modelo más de cercano al ambiente natural cuando se utiliza de manera adecuada.</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Se correlaciona con DBO₅ sobre los residuos con composición constante, pero no tan cercano como DQO. -Tiempo de análisis corto. |
| <p style="text-align: center;">Desventajas</p> | <ul style="list-style-type: none"> -Interferencia de iones de cloruro. -Algunos compuestos orgánicos no se oxidan completamente | <ul style="list-style-type: none"> -Materiales tóxicos matan a los microorganismos. -Los microorganismos no se oxidan todos los materiales presentes en los residuos. -Largo período de prueba. | <ul style="list-style-type: none"> -Requiere un equipo costoso. -Algunos compuestos orgánicos no se oxidan completamente. -Mide el Carbón Orgánico Total pero no la Demanda de oxígeno. |

Fuente: Boyles (1997)

Demanda química de Oxígeno (DQO).

La prueba de Demanda Química de Oxígeno (DQO) se basa en la oxidación química de la materia orgánica e inorgánica.

Desde el punto de vista operacional, una de las principales ventajas que tiene la prueba de DQO es que se puede contemplar en dos horas y media, comparado con los cinco o más días empleados para la prueba de DBO_5 , ayudando así a reducir el tiempo de espera de resultados (Crites y Tchobanoglous, 2000).

Para la determinación de la DQO en los escenarios 1 y 2 se utilizaron cuatro (4) viales en rango de 0-15000, uno con 0,2 mL del efluente, otro con 0,2 mL de muestra del reactor, otro con 0,2 mL de muestra de la salida y el último con 0,2 mL de agua destilada para el blanco. Una vez el digestor llegó a una temperatura de 150°C se colocan los viales por un periodo de 2 horas (Figura 5.10), se dejaron enfriar, para después ser leídos con el espectrofotómetro. Luego se procedió a seleccionar el programa Hach del mismo, utilizando el código de 435 DQO que representa el rango alto (20 - 1 500 mg/L y 200 - 15 000 mg/L); de esta manera, da inicio a la medición en el espectrofotómetro (Figura 5.11).



Figura 5.10. Muestras de DQO, colocadas en el digestor

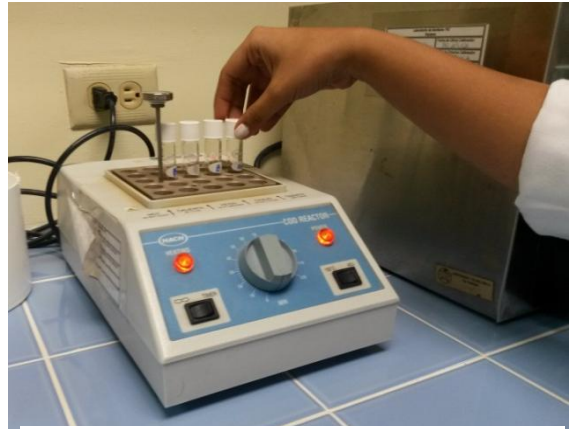


Figura 5.11. Muestras de DQO, colocadas en el Hach para ser leídas

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5).

Con esta prueba de busco determinar la cantidad de oxígeno que requieren las bacterias para degradar la materia orgánica presentes en las muestras del agua artificial de refinería utilizadas en esta investigación.

En ausencia de un conocimiento previo del DBO_5 de la muestra se hicieron diluciones de, para poder elegir las más convenientes.

Se puso a airear agua destilada alrededor de una hora, luego se tomaron 18 botellas de DBO_5 , se le añadió del agua aireada hasta la mitad, a cada par de botellas se le agrego 0.1, 0.5, 0.8 y 1 de la muestra del reactor y 0.1, 0.5, 0.8 y 1 de la muestra de la salida, y dejando un par de botellas como blanco. Al finalizar la diluciones se rellenaron las botellas con agua aireada y se taparon dejando un poco de exceso de agua para evitar el escape del oxígeno, el duplicado de cada una se llevo a la incubadora ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 5 días. Las botellas que no se incubaron se les fijo el oxígeno con 1mL de sulfato de manganesos y álcali-yoduro y se les

agrego 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (Figura 5.12), se agitó la botella dejando una mezcla homogénea, luego se transfirió 200 mL del contenido de la botella de DBO₅ a un Erlenmeyer y se tituló con solución de tiosulfato de sodio 0,025N.

Al pasar los 5 días de los duplicados en la incubadora, se les fijo el oxígeno y se titularon, y el valor del DBO₅ se obtuvo con la siguiente ecuación.

(Ecuación 5.5)

$$\text{mg/l de DBO}_5 = \frac{\text{Oxígeno Disuelto Inicial} - \text{Oxígeno Disuelto Final}}{\text{Fracción Decimal de Dilución}}$$



Figura 5.12. Pruebas de DBO₅.

Unidades Formadoras de Colonias

Consistió en sembrar un volumen determinado de muestra sobre el medio de cultivo sólido en este caso Agar nutritivo (Figura 5.13), para estimar el número de viables contando el número de colonias que se forman puesto que cada una de estas deriva de una célula aislada.

Se utilizaron placas petri divididas en 3 secciones, en cada una se sembró 20 μ L de muestra del reactor en el escenario 1 en diluciones que llegaron hasta la 10^{-10} , para que su conteo fuese más exacto (Figura 5.14); sin embargo, en el escenario 2 se hicieron siembras tanto del reactor como de la salida para su comparación en cuanto a UFC.



Figura 5.13. Siembra de muestras en placas petri.

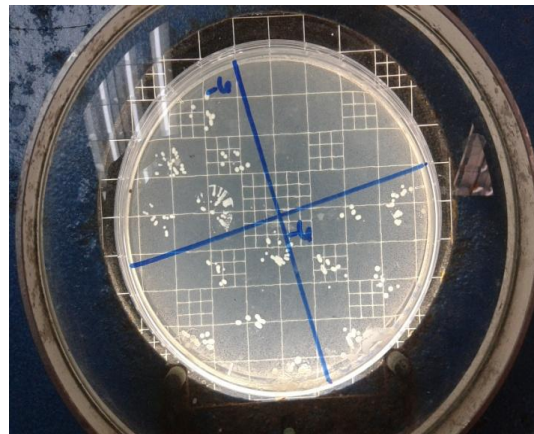


Figura 5.14. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias.

5.6.4 Medición del Naftaleno

Se tomaron dos muestras del sistema, la primera del reactor y la segunda muestra de la salida, cada una de 2 mL y se colocaron en viales, a cada vial se le agregó 1 mL de hexano grado reactivo para la extracción del naftaleno. La fase hexánica fue analizada mediante cromatografía líquida.

Para la determinación cromatográfica del naftaleno, se utilizó un Cromatógrafo Líquido marca Agilent Technologies, modelo 1260, con bomba cuaternaria, inyector manual y detector de arreglo de diodos (Figura 5.15).

Diez microlitros (10 μ L) de la muestra fueron inyectados y analizados bajo las siguientes condiciones: Columna C-18 (150 mm, 4.6 mm x 5 μ m), determinación a una longitud de onda de hasta 254nm (Figura 5.16), flujo de la fase móvil 1,5 mL/min, desarrollo en gradiente con Agua - Acetonitrilo (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Gradiente de la fase Móvil

| Tiempo(min) | Agua | Acetonitrilo |
|-------------|------|--------------|
| 0 | 40% | 60% |
| 2.5 | 40% | 60% |
| 8 | 20% | 80% |
| 10 | 0% | 100% |
| 12 | 0% | 100% |

* Post run de 5 minutos.



Figura 5.15. Cromatógrafo Agilent Technologies, modelo 1260.

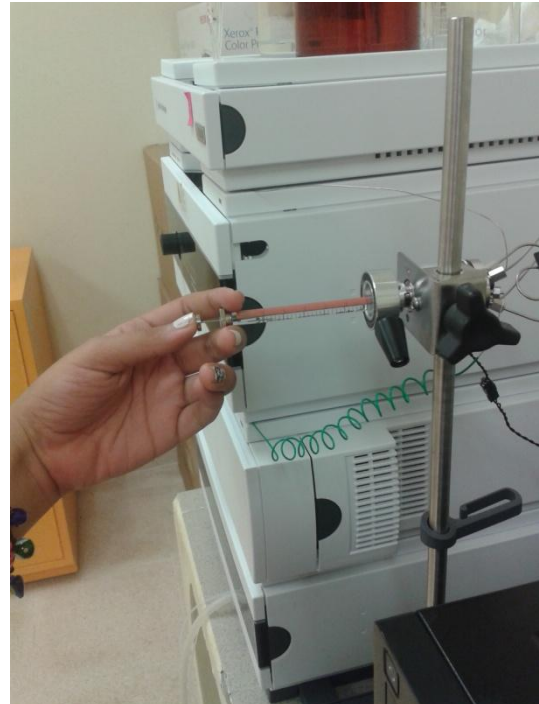


Figura 5.16. Inyección de muestras en el cromatógrafo.

5.7. Laboratorio de Análisis

La siembra y la verificación de la pureza de la cepa bacteriana a usar, en este caso, la Bacteria *Rhodococcus equi*, se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Panamá (Grey *et al.*, 2013).

La instalación, puesta en marcha y los análisis a las muestras en su mayoría fueron realizadas en el Laboratorio de Sanitaria de la facultad de Ingeniería Civil, las extracciones de cromatografía se realizaron en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias y Tecnología, ambos ubicados en la Universidad Tecnológica de Panamá.

CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

6.1. Resultados

6.1.1. Resultados Escenario 1.

6.1.1.1. Resultados de entrada.

Después de aplicar la metodología antes descrita para los dos escenarios que se estudiaron, los resultados de las mediciones fueron los siguientes.

En el Escenario 1, se realizaron un total de 14 mediciones (Tabla 6.1), los cuales en total tuvieron una duración de 336 horas, la duración de cada periodo fue de 24 horas con un caudal continuo.

Tabla 6.1. Periodos de medición del Escenario 1.

| Periodo | Horas |
|---------|---------|
| 1 | 0-24 |
| 2 | 24-48 |
| 3 | 48-72 |
| 4 | 72-96 |
| 5 | 96-120 |
| 6 | 120-144 |
| 7 | 144-168 |
| 8 | 168-192 |
| 9 | 192-216 |
| 10 | 216-240 |
| 11 | 240-264 |
| 12 | 264-288 |
| 13 | 288-312 |
| 14 | 312-336 |

En la Tabla 6.2., se presentan los diferentes parámetros y los resultados de las mediciones realizadas. Entre los parámetros medidos se encuentran la Temperatura, pH, Sólidos Totales Disueltos y el DQO del cual solo se muestran dos valores ya que el afluente fue preparado en el tiempo cero (0) y a las ciento sesenta y ocho (168) horas.

Tabla 6.2. Medición de parámetros de entrada en el Escenario 1.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/L) | Sólidos totales disueltos (mg/L) |
|----------------|------------------|------|------------|----------------------------------|
| 0 | 26,56 | 7,03 | 1300 | 6,855 |
| | 26,58 | 7,02 | | 6,860 |
| | 26,58 | 7,01 | | 6,860 |
| 24 | 23,69 | 6,96 | | 6,932 |
| | 23,11 | 7,01 | | 6,933 |
| | 23,11 | 7,00 | | 6,932 |
| 48 | 24,24 | 7,00 | | 6,945 |
| | 24,24 | 7,10 | | 6,941 |
| | 24,15 | 7,12 | | 6,942 |
| 72 | 26,71 | 6,71 | | 6,948 |
| | 26,72 | 6,72 | | 6,944 |
| | 26,72 | 6,72 | | 6,943 |
| 96 | 26,50 | 6,50 | | 7,012 |
| | 26,51 | 6,53 | | 7,013 |
| | 26,50 | 6,51 | | 7,015 |
| 120 | 28,18 | 6,36 | | 7,027 |
| | 28,22 | 6,37 | | 7,032 |
| | 28,23 | 6,37 | | 7,028 |
| 144 | 26,16 | 6,35 | | 6,761 |
| | 26,26 | 6,33 | | 6,758 |
| | 26,29 | 6,33 | | 6,757 |
| 168 | 24,98 | 6,34 | 1340 | 7,269 |
| | 24,98 | 6,39 | | 7,271 |
| | 24,96 | 6,38 | | 7,268 |
| 192 | 26,60 | 6,33 | | 7,280 |
| | 26,61 | 6,36 | | 7,277 |
| | 26,60 | 6,36 | | 7,279 |
| 216 | 27,33 | 6,37 | | 7,292 |
| | 27,37 | 6,35 | | 7,290 |
| | 27,37 | 6,35 | | 7,291 |
| 240 | 25,32 | 6,88 | | 10,59 |
| | 25,35 | 6,87 | | 10,59 |
| | 25,35 | 6,88 | | 10,59 |
| 264 | 27,73 | 6,86 | | 10,62 |
| | 27,78 | 6,85 | | 10,62 |
| | 27,78 | 6,84 | | 10,62 |

| | | | | |
|-----|-------|------|--|-------|
| 288 | 26,69 | 6,88 | | 12,43 |
| | 26,68 | 6,88 | | 12,43 |
| | 26,68 | 6,88 | | 12,43 |
| 312 | 26,69 | 6,79 | | 12,43 |
| | 26,68 | 6,80 | | 12,43 |
| | 26,68 | 6,80 | | 12,43 |

En el Anexo 6.1.1 se presenta la tabla con los valores promedio de los datos de temperatura, pH y Sólidos Totales Disueltos.

6.1.1.2. Resultados del reactor.

En la Tabla 6.3., se puede apreciar los diferentes parámetros y los resultados de las mediciones que se realizaron en el reactor. Se tomaron muestras para hacer siembras en placas petri para contabilizar las UFC. Se puede observar que el máximo crecimiento de unidades formadoras de colonias fue cuando las condiciones de temperatura promedio se encontraban alrededor de 23,5 °C con un pH promedio de 6,7 (Anexo 6.1.2) en un tiempo de 240 horas (Figuras 6.1, 6.2 y 6.3). Según Escudero *et al.*, 2011 este tipo de bacteria presenta condiciones óptimas de crecimiento en pH cercanos a 7,0 y se caracterizan por su habilidad para cambiar las condiciones de pH del medio.

Se resalta que por el rango del crecimiento bacteriano desde $7,7 \text{ E}+6$ hasta $5,75 \text{ E}+13$ (Anexo 6.1.3), en las gráficas que incluían este parámetro, la escala se trabajó logarítmicamente, de forma de apreciar mejor los cambios (Anexo 6.1.4)

Tabla 6.3. Medición de parámetros del reactor, Escenario 1.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/L) | DBO ₅ (mg/L) | Sólidos suspendidos (mg/L) | Sólidos disueltos (mg/L) | Sólidos totales (mg/L) | Sólidos fijos (mg/L) | Sólidos volátiles (mg/L) | Unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml) |
|----------------|------------------|------|------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|--|
| 0 | 24,33 | 7,03 | 1480 | 950 | 50 | 6,886 | 7640 | 7520 | 120 | 8,10E+06 |
| | 24,29 | 7,04 | | | | 6,820 | | | | 7,75E+06 |
| | 24,38 | 7,05 | | | | 6,852 | | | | 7,70E+06 |
| 24 | 24,25 | 6,98 | 1050 | | 70 | 6,908 | | | | 4,30E+08 |
| | 24,24 | 6,92 | | | | 6,994 | | | | 4,90E+08 |
| | 24,24 | 6,90 | | | | 6,929 | | | | 3,40E+08 |
| 48 | 23,53 | 6,85 | 1160 | 800 | 83 | 6,972 | | | | 2,25E+08 |
| | 23,52 | 6,84 | | | | 6,630 | | | | 2,70E+08 |
| | 23,52 | 6,84 | | | | 6,880 | | | | 2,15E+08 |
| 72 | 24,43 | 6,77 | 1080 | | 78 | 6,919 | | | | 1,00E+09 |
| | 24,44 | 6,77 | | | | 6,884 | | | | 1,00E+09 |
| | 24,44 | 6,77 | | | | 6,908 | | | | 1,00E+09 |
| 96 | 26,30 | 6,71 | 1350 | | 64 | 6,780 | 7100 | 6880 | 220 | 5,25E+09 |
| | 26,33 | 6,71 | | | | 6,790 | | | | 4,50E+09 |
| | 26,34 | 6,74 | | | | 6,800 | | | | 3,85E+09 |
| 120 | 25,12 | 6,87 | 1050 | | 39 | 6,970 | | | | 1,15E+10 |
| | 25,11 | 6,84 | | | | 6,953 | | | | 8,50E+09 |
| | 25,11 | 6,82 | | | | 6,870 | | | | 2,75E+09 |
| 144 | 23,66 | 6,82 | 1190 | | 36 | 6,842 | 7426,6 | 7186 | 240,6 | 1,00E+11 |
| | 23,66 | 6,82 | | | | 6,830 | | | | 1,00E+11 |
| | 23,66 | 6,82 | | | | 6,820 | | | | 1,00E+11 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|-------------------------|----------------------|------|------|----|-------------------------|------|--------|-------|----------------------------------|
| 168 | 23,55 23,55 23,55 | 6,81 6,84 6,82 | 1130 | 800 | 38 | 6,725 6,710 6,752 | 7720 | 7480,7 | 239,3 | 1,00E+12 1,00E+12 1,00E+12 |
| 192 | 23,80 23,81 23,81 | 6,81 6,82 6,85 | 1310 | | 29 | 6,870 6,677 6,888 | | | | 1,00E+12 2,20E+12 1,90E+12 |
| 216 | 23,77 23,78 23,78 | 6,81 6,80 6,80 | 1340 | 740 | 30 | 6,584 6,955 7,040 | 7180 | 6854 | 326 | 5,75E+13 3,00E+13 2,25E+13 |
| 240 | 23,58 23,56 23,56 | 6,73 6,71 6,70 | 1560 | | 30 | 7,135 7,138 7,133 | | | | 6,00E+13 6,00E+13 6,00E+13 |
| 264 | 25,05 25,07 25,07 | 6,72 6,67 6,72 | 1780 | | 28 | 8,092 7,645 7,857 | | | | 2,35E+13 2,15E+13 2,25E+13 |
| 288 | 23,79 23,79 23,79 | 6,77 6,77 6,78 | 1800 | | 48 | 8,435 8,974 9,000 | | | | 1,65E+12 5,50E+11 1,35E+12 |
| 312 | 23,73 23,75 23,74 | 6,72 6,73 6,72 | 1910 | 1466 | 48 | 9,633 9,655 9,630 | | | | 1,55E+12 1,35E+12 1,50E+12 |

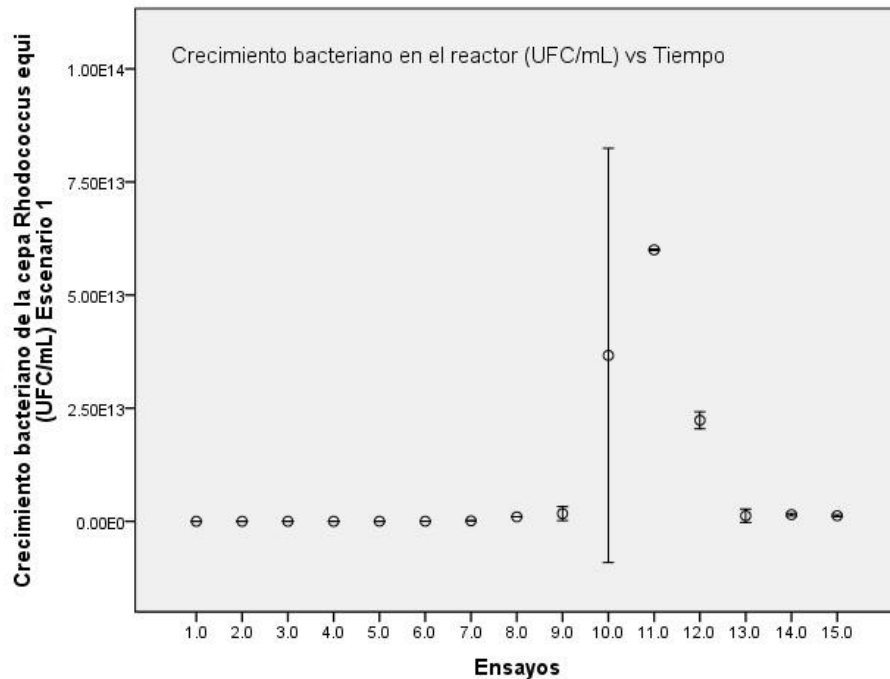


Figura 6.1. Crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* (UFC/mL) en función del tiempo

El crecimiento bacteriano representado en la Figura 6.1 muestra una respuesta positiva a la alimentación del reactor con carga orgánica y naftaleno, obteniendo crecimientos de hasta ocho órdenes de magnitud mayor ($6 \text{ E}+13$) en UFC/mL, en relación a la inoculada ($7,85 \text{ E}+6$). La cual se mantuvo relativamente constante después de llegar a su punto máximo; lo cual evidencia que no hay inhibición en función del tiempo.

La cantidad de oxígeno consumida por las sustancias contaminantes orgánicas e inorgánicas que se encuentran en el agua residual del reactor, se ve refleja en los valores de DQO que se obtuvieron de las muestras del reactor cada 24 horas para el Escenario 1 (Tabla 6.3).

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento microbiano y la supervivencia. el crecimiento microbiano puede ocurrir a temperaturas que varían, desde bajo cero hasta más de 100°C. En base a la temperatura óptima para el crecimiento, los microorganismos se clasifican como termófilos, mesófilos, psicrófilos, o termófilos extremos (Bitton, 1994).

En la Figura 6.2 se puede observar una tendencia de aumento de las unidades formadoras de colonia cuando la temperatura disminuye y viceversa; esto puede deberse a la adaptación de los microorganismos a las condiciones de laboratorio, ya que en la mayor parte del tiempo (de lunes a viernes la temperatura se mantenía en 23° C± 1°C); mientras que los fines de semana podía llegar hasta 26° C.

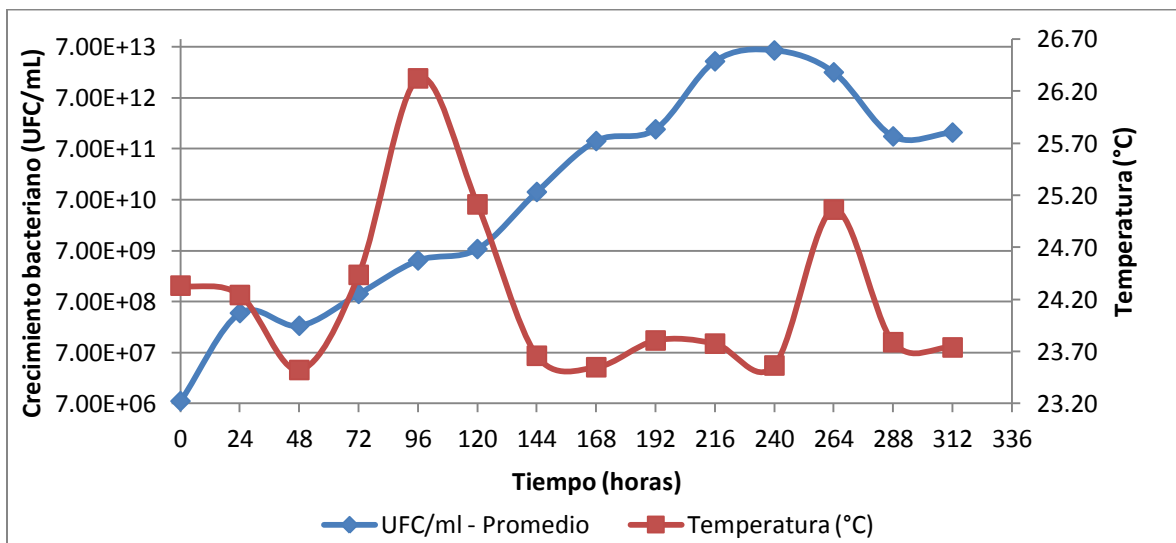


Figura 6.2. Relación de temperatura con el crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. Escenario 1

El tratamiento biológico de las aguas residuales ocurre generalmente en un pH neutro (Kiely, 1999; Metcalf and Eddy, 1991; Mihelcic *et al.* 2011). En general, el pH óptimo para el crecimiento de las bacterias se encuentra alrededor de 7,0, aunque algunos pueden ser acidófilos obligatoriamente. En la Figura 6.3 se observa el comportamiento de la Cepa en cuanto a su crecimiento en función del pH, observando que las mismas van creciendo, y el pH va disminuyendo (*i.e.* a las 250 horas, pH de 6,7 y crecimiento bacteriano $6,3 \text{ E}+13$ en relación al tiempo 0, pH 7,05, crecimiento bacteriano $7,85\text{E}+6$), lo cual ha sido explicado por Bitton (1994) que ha encontrado que generalmente el crecimiento bacteriano produce una disminución del pH del medio, por la liberación de metabolitos ácidos.

El pH afecta la actividad de las enzimas microbianas, las cuales afectan la ionización de los productos químicos y por lo tanto juega un papel en el transporte de nutrientes y productos químicos tóxicos en la célula (Bitton, 1994).

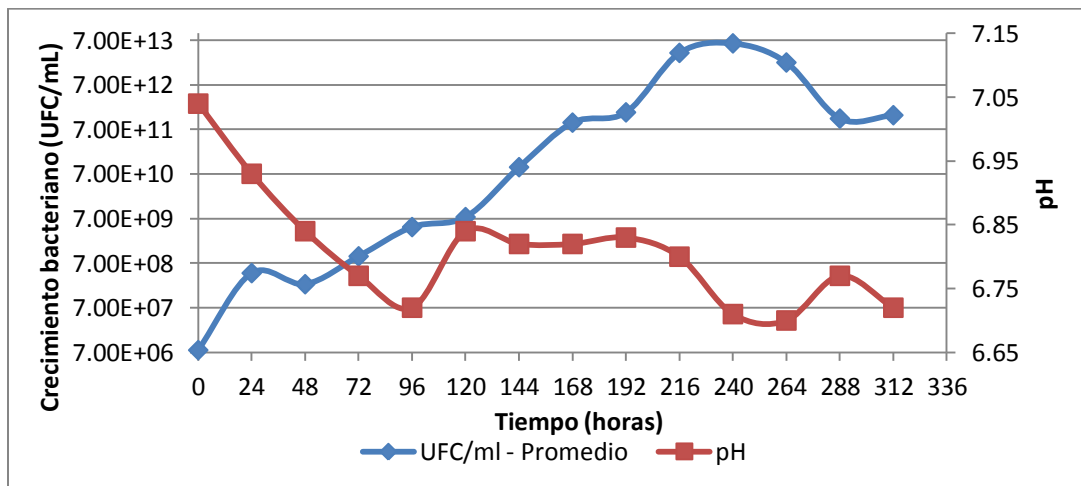


Figura 6.3. Relación pH con el crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. Escenario 1.

En la Figura 6.4 se presenta la relación entre la DQO y el Crecimiento bacteriano en función del tiempo, en el reactor. Después de las 24 primeras horas se observa como a medida que aumenta la DQO, los microorganismos van creciendo, Kiely (1999) lo explica de la siguiente forma: la DQO biodegradable se metaboliza rápidamente y parte de ella se transforma en nuevas células, al mismo tiempo existe una pérdida de biomasa viva denominada pérdida de masa endógena, donde algunos de los microorganismos emplean como alimento su propio material alimenticio almacenado o células ya muerta. En la Figura 6.4 se observa que el mayor crecimiento de la bacteria *Rhodococcus equi* es a las 240 horas, lo cual también se ve influenciado por la recirculación del lodo del reactor (7 mL/min). En el Anexo 6.1.5 se ve la disminución de los Sólidos Suspendedos en relación a la DQO.

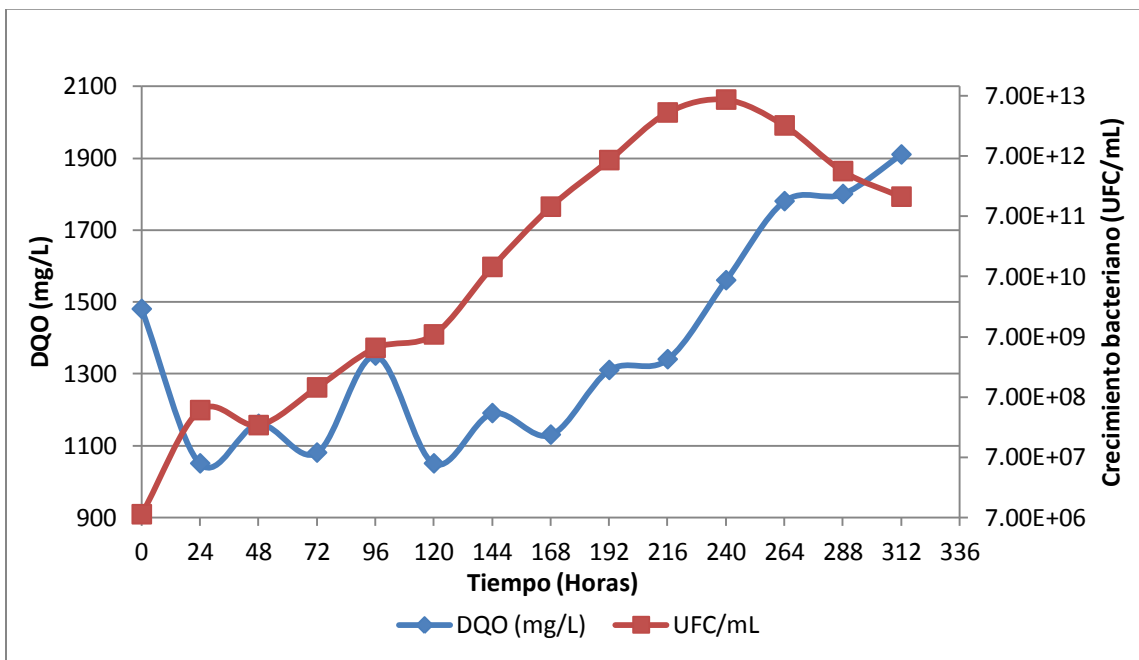


Figura: 6.4. Relación de la DQO con respecto al crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi*. Escenario 1

En la Figura 6.5 se muestra el comportamiento de la DQO en relación a las temperaturas que se midieron en el reactor, se observa que el valor del DQO es alto cuando la temperatura baja, hasta el tiempo de 48 horas; sin embargo, después, en la mayoría del tiempo restante, es directamente proporcional. Esta relación proporcional también se observa en el Anexo 6.1.6 donde a medida que aumenta la DQO, el valor de lo Sólidos Disueltos también se ven en aumento.

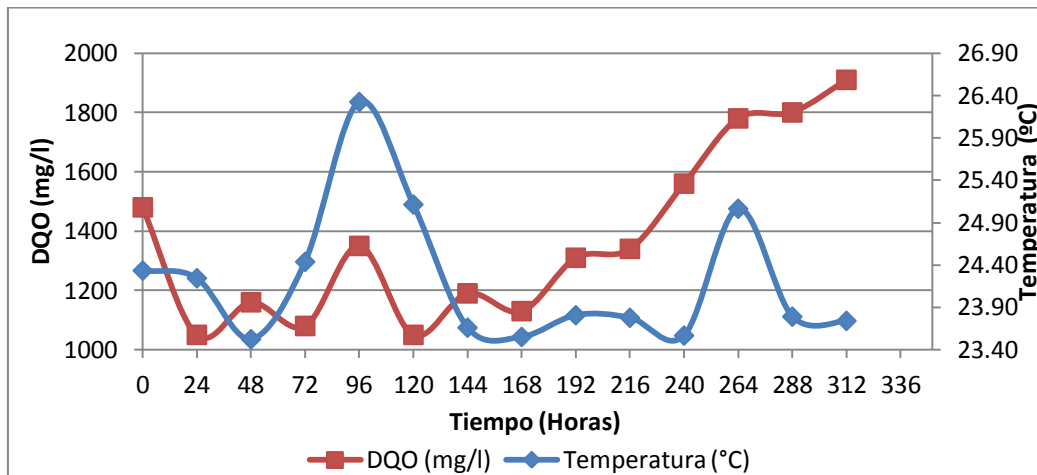


Figura 6.5. Relación de la DQO con respecto la temperatura del Reactor. Escenario 1.

El pH del reactor varió entre 6,7 – 7, la relación de la DQO en cuanto al pH en el reactor se observa en la Figura 6.6 Entre más bajo es el pH, la DQO es mayor (Bolaños *et al.*, 2008).

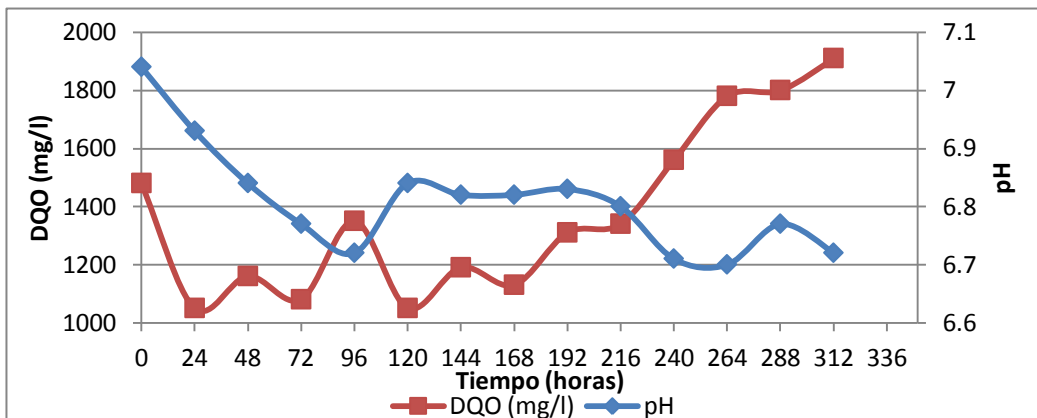


Figura 6.6. Relación del DQO y el pH del reactor. Escenario 1.

La comparación de DQO y DBO₅ nos ayuda a identificar si existen condiciones recalcitrantes en el agua residual a tratar. Una proporción DBO₅/DQO que se aproximen a 1,0 puede identificar un material altamente biodegradable (Mihelcic *et al*, 2011; Kiely, 1999).

En la Tabla 6.4 se muestra la proporción de DBO₅/DQO del reactor, la cual nos indica que el afluente tratado estaba compuesto de material altamente biodegradable.

Tabla 6.4. Proporción DBO₅/DQO del reactor en el Escenario 1.

| Tiempo (horas) | DQO (mg/l) | DBO ₅ (mg/L) | Proporción DBO ₅ /DQO |
|----------------|------------|-------------------------|----------------------------------|
| 0 | 1480 | 950 | 0,64189189 |
| 48 | 1160 | 800 | 0,68965517 |
| 168 | 1130 | 800 | 0,70796460 |
| 216 | 1340 | 740 | 0,55223881 |
| 312 | 1910 | 1466 | 0,76753930 |

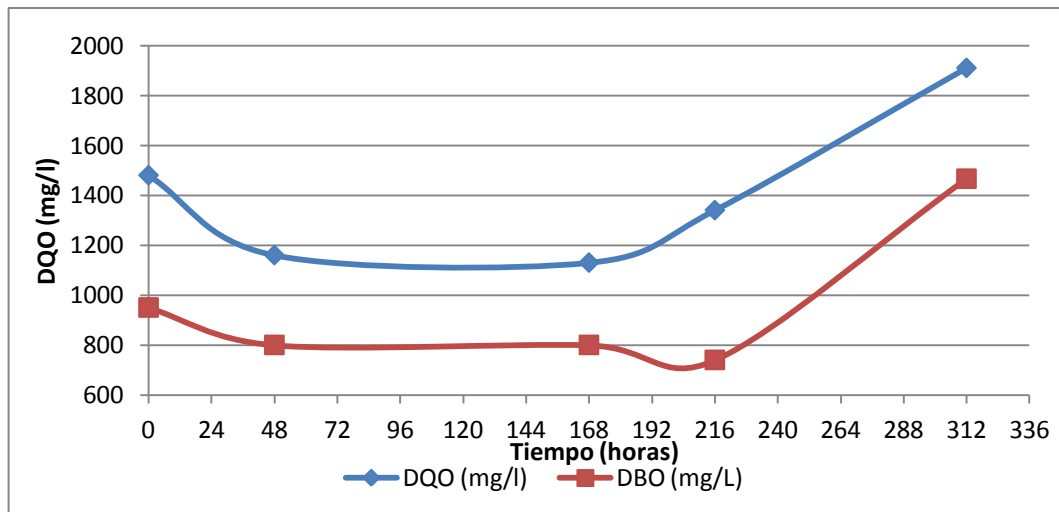


Figura 6.7. Valores de DQO y DBO obtenidos del reactor. Escenario 1.

El valor de la DQO, siempre será más alto que la DBO₅ como se observa en la Figura 6.7, ya que incluye tanto la materia orgánica fácilmente biodegradable (DBO₅), como la de difícil biodegradación (Kiely, 1999; Metcalf and Eddy, 1991). Sin embargo cuando la materia orgánica fácilmente biodegradable ocupa el 100% del agua residual, la DBO₅ puede ser igual a la DQO.

Debido a que es un efluente de refinería artificial el cual contiene tanto materia orgánica fácilmente biodegradable como de difícil biodegradación el valor de la DQO se considera alto, en comparación con la DQO de aguas residuales domésticas, en las cuales los valores pueden estar alrededor de los 400 a 500 mg/L (Kiely, 1999; Metcalf and Eddy, 1991; Zaror, 1999).

6.1.1.3. Resultados de salida.

En la Tabla 6.5 se presentan los valores de los parámetros medidos en la salida del sistema del Escenario 1 que se ensayo en la investigación. En el Anexo 6.1.7 se muestran los promedios de los valores en triplicado de la Temperatura, pH y Sólidos Disueltos Totales.

Tabla 6.5. Medición de parámetros de la salida, Escenario 1.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/L) | DBO ₅ (mg/L) | Sólidos suspendidos (mg/L) | Sólidos disueltos (mg/L) | Sólidos totales (mg/L) | Sólidos fijos (mg/L) | Sólidos volátiles (mg/L) |
|----------------|------------------|------|------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|
| 24 | 22,32 | 6,70 | 1210 | 820 | 86 | 7,061 | 7398 | 6850 | 548 |
| | 22,30 | 6,71 | | | | 7,084 | | | |
| | 22,30 | 6,70 | | | | 7,082 | | | |
| 48 | 23,29 | 6,57 | 870 | 740 | 78 | 6,969 | | | |
| | 23,48 | 6,59 | | | | 7,013 | | | |
| | 23,49 | 6,58 | | | | 7,006 | | | |
| 72 | 25,19 | 6,56 | 1020 | | 63 | 6,956 | 7320 | 6700 | 620 |
| | 25,21 | 6,61 | | | | 6,954 | | | |
| | 25,19 | 6,57 | | | | 6,948 | | | |
| 96 | 24,06 | 6,70 | 990 | | 42 | 6,928 | | | |
| | 24,09 | 6,71 | | | | 6,953 | | | |
| | 24,09 | 6,74 | | | | 6,958 | | | |
| 120 | 22,97 | 6,78 | 1140 | | 47 | 6,961 | | | |
| | 22,96 | 6,78 | | | | 6,963 | | | |
| | 22,96 | 6,77 | | | | 6,972 | | | |
| 144 | 22,88 | 6,78 | 980 | 700 | 35 | 6,954 | | | |
| | 22,87 | 6,78 | | | | 6,951 | | | |
| | 22,88 | 6,79 | | | | 6,952 | | | |
| 168 | 22,57 | 6,77 | 1060 | | 40 | 6,920 | 7760 | 6460 | 1300 |
| | 22,56 | 6,76 | | | | 6,906 | | | |
| | 22,56 | 6,76 | | | | 6,923 | | | |
| 192 | 22,66 | 6,76 | 990 | 520 | 21 | 6,928 | 7740 | 6510 | 1230 |

| | | | | | | | | | |
|-----|-------------------------|----------------------|------|-----|----|-------------------------|------|------|------|
| | 22,68 22,70 | 6,75 6,74 | | | | 6,957 6,969 | | | |
| 216 | 22,65 22,60 22,59 | 6,67 6,68 6,65 | 1150 | | 39 | 7,020 7,022 7,019 | | | |
| 240 | 24,02 24,01 23,98 | 6,51 6,58 6,60 | 1170 | | 29 | 7,078 7,080 7,078 | 7450 | 6200 | 1250 |
| 264 | 22,46 22,45 22,45 | 6,71 6,73 6,74 | 1330 | | 30 | 7,809 7,823 7,848 | | | |
| 288 | 22,94 22,94 22,94 | 6,61 6,62 6,63 | 1640 | | 30 | 8,266 8,266 8,266 | | | |
| 312 | 23,08 23,09 23,11 | 6,59 6,60 6,60 | 1660 | | 27 | 8,551 8,568 8,566 | | | |
| 336 | 22,30 22,31 22,30 | 6,65 6,66 6,66 | 1710 | 966 | 28 | 8,112 8,111 8,115 | | | |

En la DQO obtenida del efluente se puede observar que al igual que en el reactor el valor de la DQO es mayor cuando los valores de la temperatura estuvieron alrededor de los 22 °C y los 23°C, sin embargo los valores de DQO menores fueron obtenidos con temperaturas ubicadas entre los 23,5°C y los 25,5°C (Figura 6.8).

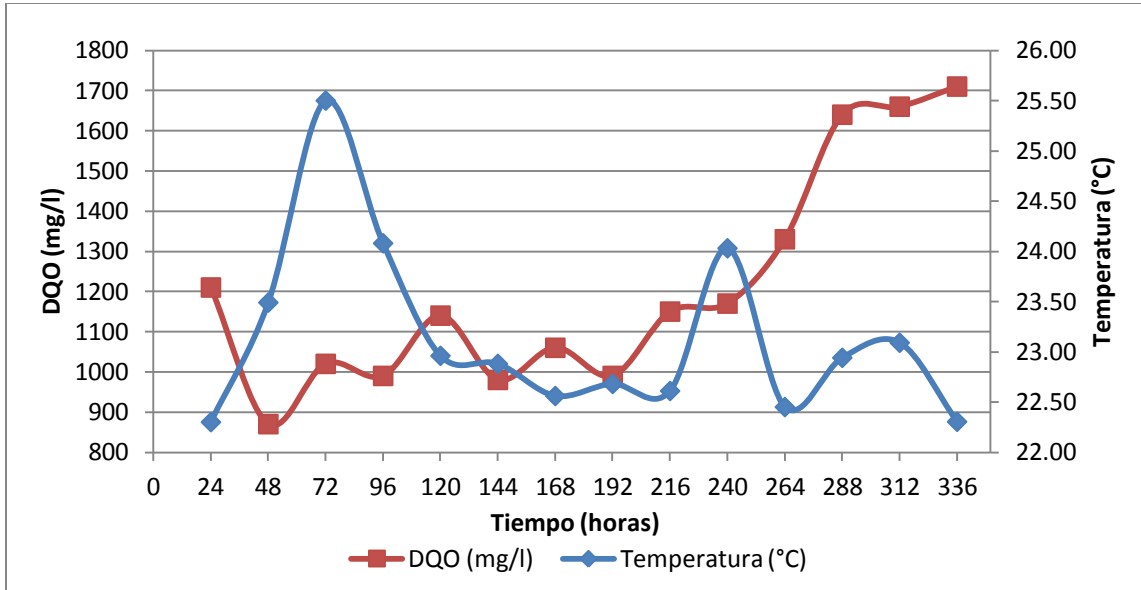


Figura 6.8. Valor del DQO a la salida del sistema en relación a la temperatura.

Escenario 1.

En la Figura 6.9 se observan los valores máximos de pH de $6,74 \pm 0,04$, entre las 96 y las 216 horas y valores de DQO más bajos ($1052 \text{ mg/L} \pm 78$). Mientras que los valores de DQO más altos ($1670 \text{ mg/L} \pm 36$) se obtuvieron entre las 288 y 336 horas a pH de $6,63 \pm 0,03$.

El aumento de la DQO también puede deberse a la disminución en los Sólidos Suspendidos (Anexo 6.1.8), sin embargo se ve el aumento de los Sólidos Disueltos (Anexo 6.1.9)

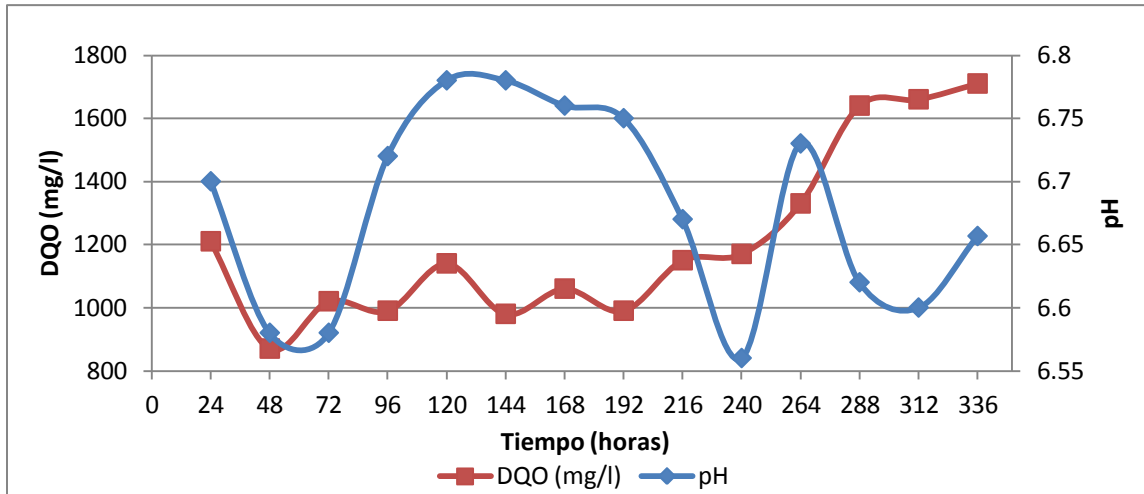


Figura 6.9. Valores de DQO en la salida al sistema en relación al pH del efluente. Escenario 1.

En la Figura 6.10 se pueden observar los valores de DQO y DBO₅ obtenidos en la salida del sistema, el mayor valor de DQO y el menor de DBO₅ se obtuvieron a las 240 horas, lo cual puede deberse al aumento de temperatura y la recirculación de lodos, que bajo esas condiciones degradan más fácilmente la materia orgánica de fácil biodegradación; sin embargo, la de difícil biodegradación ocurre más lentamente.

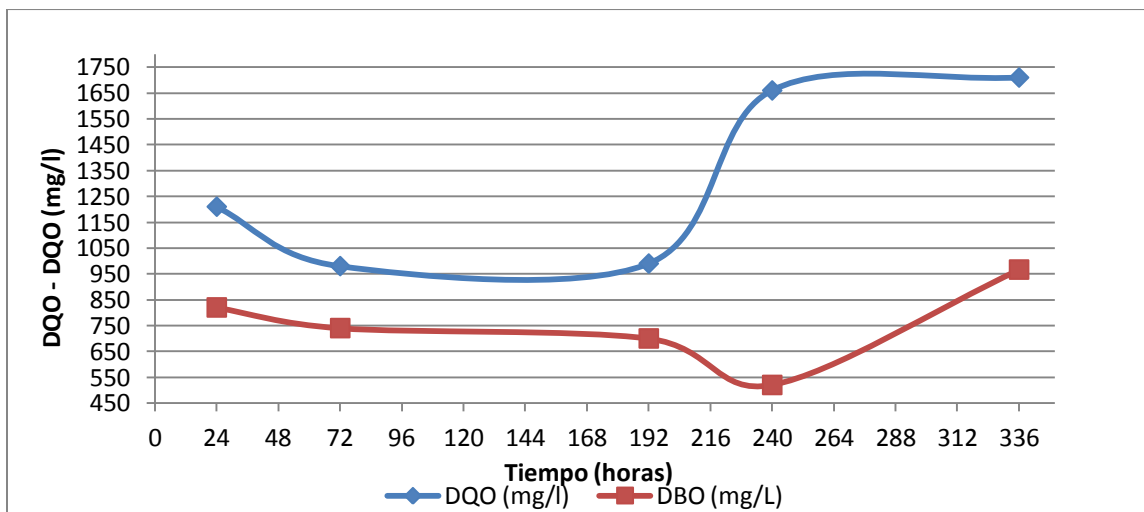


Figura 6.30. Valores DQO y DBO₅ con respecto a la salida. Escenario 1

6.1.1.4. Eficiencia en el Escenario 1.

En la Figura 6.11 y Tabla 6.6 se muestra la diferencia entre la DQO en el reactor y el obtenido en la salida, observando así que las mayores eficiencias de biodegradación (18,24%; 17,14%; 15,56% y 14,74%) se dieron en los Periodos 1, 2, 5 y 11, y los periodos menos eficientes (6,67 %; 7,87 % y 7,78 %) fueron el 6, 12 y 13.

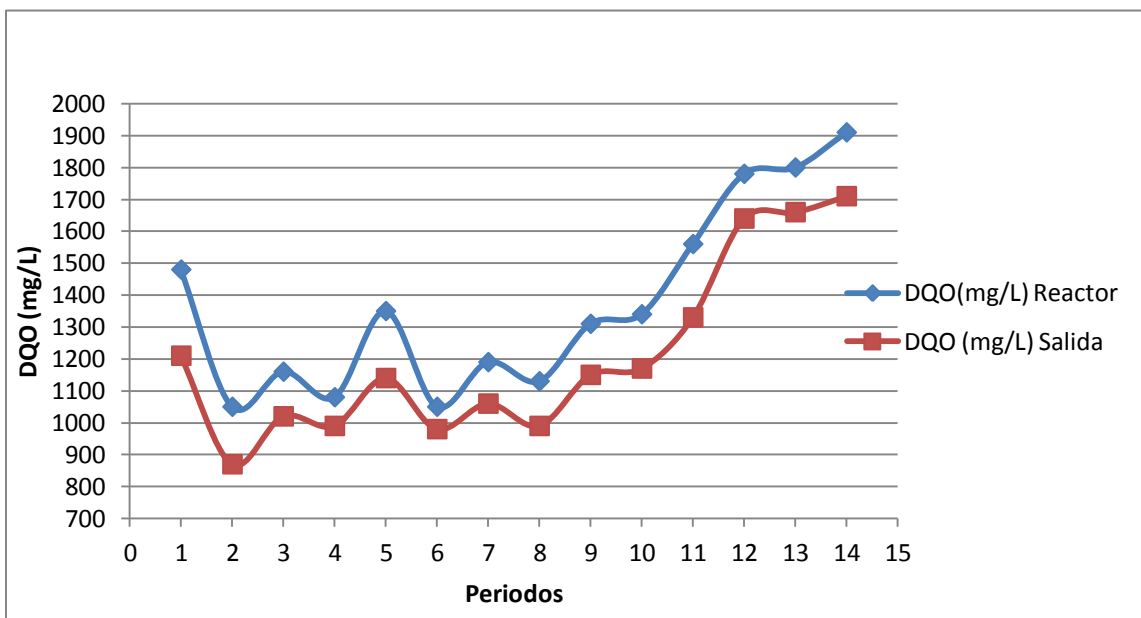


Figura 6.11. Valores de DQO del reactor y la salida del sistema. Escenario 1.

Por otra parte en la Figura 6.12 y Tabla 6.6 se muestran la comparación de los valores de DBO_5 tanto para el reactor como a la salida del sistema transcurridas las 24 horas de tratamiento.

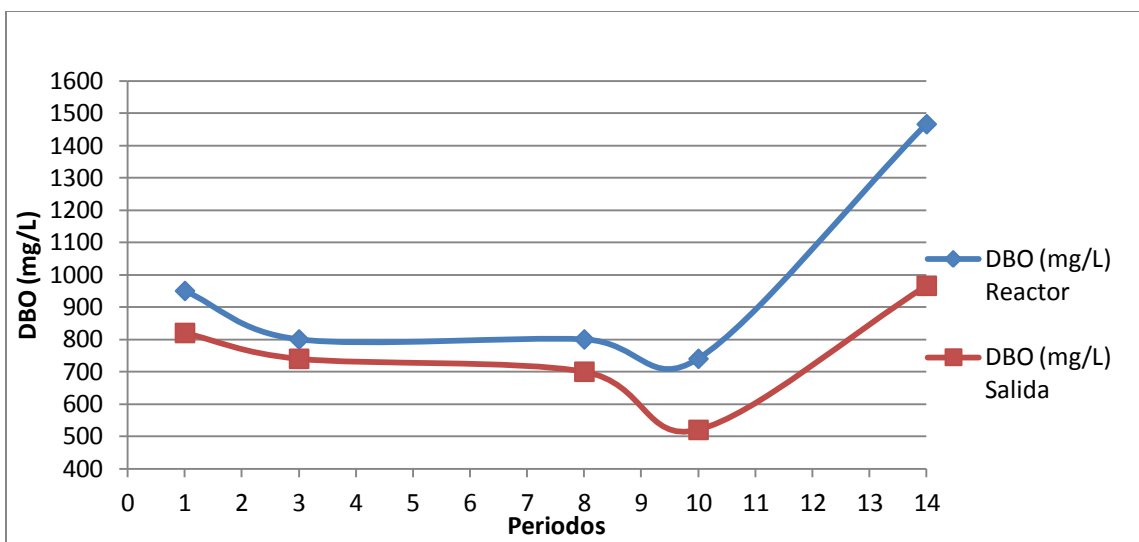


Figura 6.12. Comparación de los valores de DBO₅ del reactor y de la salida para cada periodo de prueba del Escenario 1.

Las mayores eficiencias de biodegradación (27,78%; 34,10%) se dieron en los Periodos 10 y 14, y la menor eficiencia (7,50%) fue en el periodo 3.

Tabla 6.6. Eficiencia en el Escenario 1.

| Periodo | DQO (mg/L) Reactor | DQO (mg/L) Salida (24 horas) | Eficiencia | DBO ₅ (mg/L) Reactor | DBO ₅ (mg/L) Salida (24 horas) | Eficiencia |
|---------|--------------------|------------------------------|------------|---------------------------------|---|------------|
| 1 | 1480 | 1210 | 18,4% | 950 | 820 | 11,33% |
| 2 | 1050 | 870 | 17,14% | | | |
| 3 | 1160 | 1020 | 12,07% | 800 | 740 | 7,50% |
| 4 | 1080 | 990 | 8,33% | | | |
| 5 | 1350 | 1140 | 15,56% | | | |
| 6 | 1050 | 980 | 6,67% | | | |
| 7 | 1190 | 1060 | 10,92% | | | |
| 8 | 1130 | 990 | 12,39% | 800 | 700 | 12,50% |
| 9 | 1310 | 1150 | 12,21% | | | |
| 10 | 1340 | 1170 | 12,69% | 740 | 520 | 27,78% |
| 11 | 1560 | 1330 | 14,74% | | | |
| 12 | 1780 | 1640 | 7,87% | | | |
| 13 | 1800 | 1660 | 7,78% | | | |
| 14 | 1910 | 1710 | 10,47% | 1466 | 966 | 34,10 % |

Se puede observar en los resultados obtenidos que la bacteria aislada, *Rhodococcus equi*, es capaz de bajar la Demanda Química de Oxígeno en presencia del hidrocarburo naftaleno, coincidiendo con los resultados obtenidos por Chang *et al.* (2014) que obtuvieron altas eficiencias de degradación (58%) en presencia de naftaleno, con la diferencia de que trabajaron con consorcios bacterianos.

6.1.2. Resultados Escenario 2.

6.1.2.1. Resultados de entrada.

El Escenario 2, el cual conto con 5 periodos de medición (Tabla 6.7), donde cada uno tuvo un tiempo de retención de 48 horas, arrojó los siguientes valores en las diferentes mediciones y pruebas que se le hicieron en el efluente de entrada (Tabla 6.8) y en el Anexo 6.2.1 se muestran los promedios de los valores de Temperatura, pH y STD.

Tabla 6.7. Periodos de medición del Escenario 2.

| Periodo | Horas |
|---------|---------|
| 1 | 0-48 |
| 2 | 48-96 |
| 3 | 96-144 |
| 4 | 144-192 |
| 5 | 192-240 |

Tabla 6.8. Parámetros de medición de entrada, Escenario 2.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/L) | Sólidos totales disueltos (mg/L) | Sólidos suspendidos(mg/L) |
|----------------|------------------|------|------------|----------------------------------|---------------------------|
| 0 | 22,80 | 7,08 | 1280 | 7,012 | 3 |
| | 22,79 | 7,07 | | 7,020 | |
| | 22,79 | 7,06 | | 6,694 | |
| 48 | 26,00 | 7,02 | | 6,951 | 10 |
| | 26,01 | 7,02 | | 6,949 | |
| | 26,02 | 7,02 | | 6,649 | |
| 96 | 24,43 | 7,08 | | 6,973 | 16 |
| | 24,43 | 7,08 | | 6,954 | |
| | 24,43 | 7,07 | | 6,973 | |
| 144 | 28,5 | 6,98 | 1260 | 6,985 | 9 |
| | 28,56 | 6,98 | | 6,984 | |
| | 28,56 | 6,99 | | 6,984 | |
| 192 | 24,02 | 7,09 | 1250 | 6,959 | 6 |
| | 24,03 | 7,08 | | 6,957 | |
| | 24,03 | 7,10 | | 6,958 | |

6.1.2.2. Resultados del reactor.

En la Tabla 6.9 se observan las mediciones de los parámetros para el reactor en el Escenario 2. El máximo crecimiento de unidades formadoras de colonias se dio en una temperatura y pH promedio de 24,05 °C y 6,85 respectivamente (Anexo 6.2.2) para las 192 horas con un orden de 10^{11} . Según Escudero et al., 2011 este tipo de bacteria presenta condiciones óptimas de crecimiento en pH cercanos a 7,0 y se caracterizan por su habilidad para cambiar las condiciones de pH del medio.

Tabla 6.9. Parámetros de medición del reactor en el Escenario 2.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/L) | DBO ₅ (mg/L) | Sólidos suspendidos (mg/L) | Sólidos disueltos (mg/L) | Sólidos totales (mg/L) | Sólidos fijos (mg/L) | Sólidos volátiles (mg/L) | Unidades formadoras de colonia por ml (UFC/ml) |
|----------------|------------------|------|------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|--|
| 0 | 25,31 | 7,07 | 1045 | 640 | 20 | 6,533 | 7906 | 6698 | 908 | 3,00E+09 |
| | 25,31 | 7,05 | | | | 6,553 | | | | 1,50E+09 |
| | 25,31 | 7,04 | | | | 6,910 | | | | 5,00E+09 |
| 48 | 24,82 | 6,90 | 1010 | 662,5 | 53 | 6,926 | 7822 | 6970 | 852 | 3,00E+09 |
| | 24,82 | 6,89 | | | | 6,931 | | | | 4,50E+09 |
| | 24,82 | 6,90 | | | | 6,943 | | | | 5,00E+09 |
| 96 | 23,89 | 6,76 | 1030 | 655 | 53 | 6,555 | 7222 | 5522 | 1700 | 1,00E+09 |
| | 23,90 | 6,75 | | | | 6,622 | | | | 4,50E+09 |
| | 23,90 | 6,76 | | | | 6,850 | | | | 5,00E+09 |
| 144 | 26,84 | 6,83 | 1180 | 642 | 36 | 6,745 | 6990 | 5460 | 1530 | 4,00E+09 |
| | 26,85 | 6,82 | | | | 6,746 | | | | 1,00E+09 |
| | 26,85 | 6,81 | | | | 6,745 | | | | 3,00E+09 |
| 192 | 24,05 | 6,85 | 1015 | 587 | 27 | 6,859 | 7220 | 5330 | 1890 | 5,00E+11 |
| | 24,04 | 6,83 | | | | 6,866 | | | | 5,00E+10 |
| | 24,06 | 6,86 | | | | 6,882 | | | | 1,00E+11 |

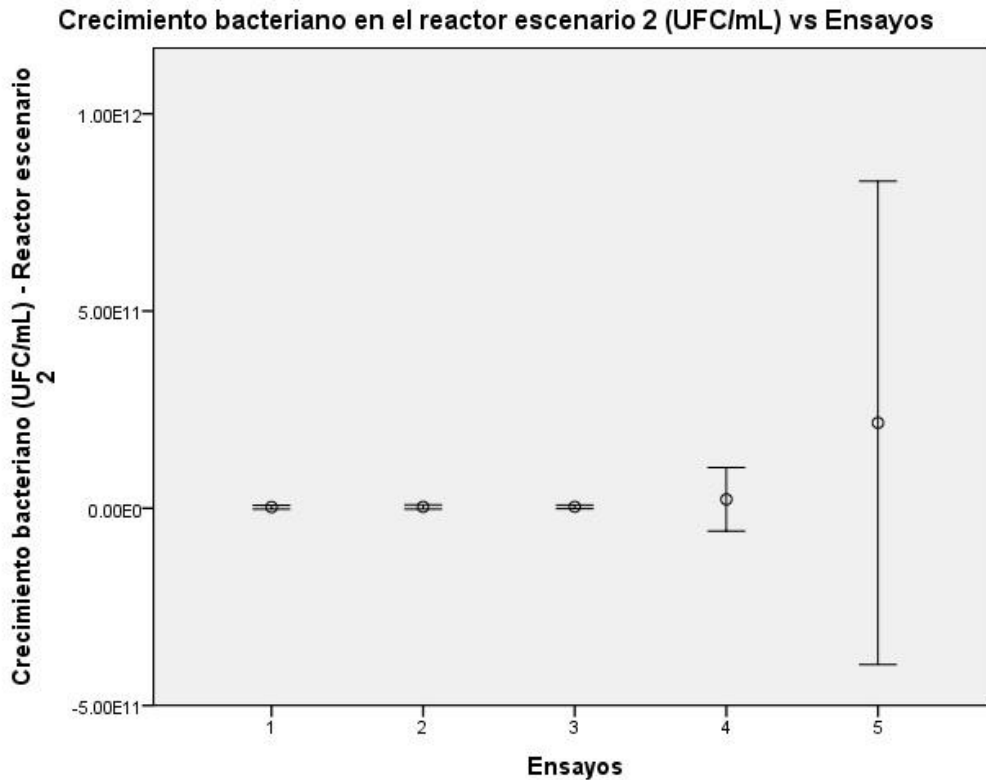


Figura 6.13. Crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. Escenario 2.

En la Figura 6.13 es posible observar que el crecimiento de la cepa es más rápido en el Escenario 2 que en el Escenario 1. Sin embargo, es necesario aclarar que en el Escenario 2, en el tiempo 0, la población se encontraba con un orden de 10^9 mientras que en el Escenario 1 el orden era de 10^6 en el tiempo 0. Por razón del tiempo de retención hidráulico empleado en el escenario 2.

En el Anexo 6.2.3 se muestra el crecimiento bacteriano en una escala logarítmica, para la mejor apreciación de los datos.

Como se mencionó anteriormente la temperatura es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento microbiano y su supervivencia. El crecimiento microbiano puede ocurrir a temperaturas que varían, desde bajo cero hasta más de 100°C. En base a la temperatura óptima para el crecimiento, los microorganismos se clasifican como termófilos, mesófilos, psicrófilos, o termófilos extremos (Bitton, 1994).

En la Figura 6.14 se puede observar de las 0 a 96 horas un período de adaptación, donde la población se mantuvo en el orden de 10^9 , a partir de las 96 horas se evidencia un aumento de la población de tipo exponencial, que para el rango de temperatura (23,9° C a 24,05° C), entre 96 y 192 horas, parece ser independiente al aumento de este Parámetro.

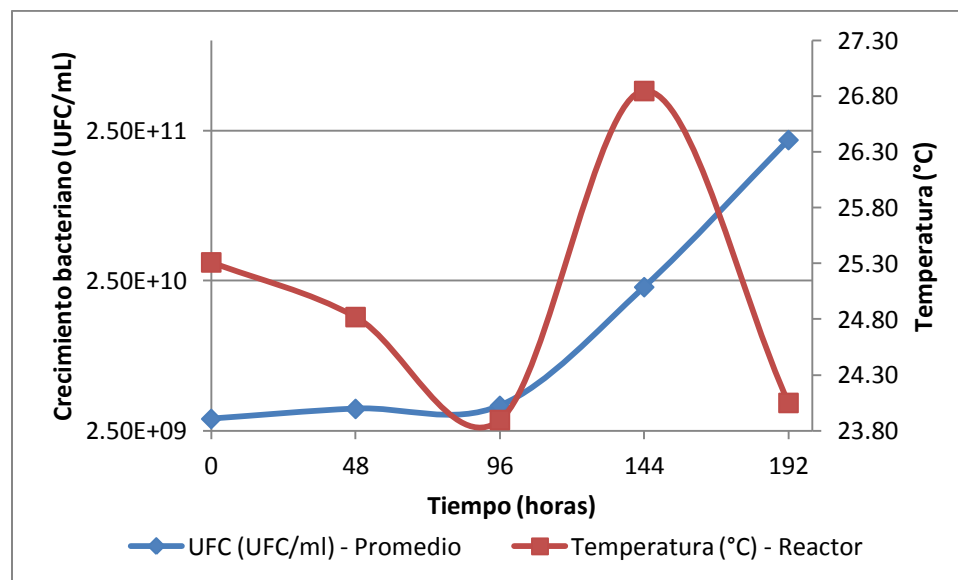


Figura 6.14. Relación temperatura con el crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. Escenario 2.

Como se mencionó en el Escenario 1 el tratamiento biológico de las aguas residuales ocurre generalmente en un pH neutro (Kiely,1999; Metcalf and Eddy, 1991; Mihelcic *et al.* 2011). En general, el pH óptimo para el crecimiento de las bacterias se encuentra alrededor de 7, aunque algunos pueden ser acidófilos obligatoriamente. En la Figura 6.15 se observa el comportamiento de la Cepa en cuanto a su crecimiento en función del pH, observando un período de adaptación entre 0 a 96 horas. A las 96 horas empiezan a crecer ($3,50 \text{ E}+9$ UFC/mL) y aumentan hasta llegar a las 194 horas con una población de ($2,17 \text{ E}+11$ UFC/mL). En la fase de adaptación el pH disminuyó de 7,05 a 6,75 lo cual ha sido explicado por Bitton (1994) que ha encontrado que generalmente el crecimiento bacteriano produce una disminución del pH del medio, por la liberación de metabolitos ácidos. Por otra parte, se observa el aumento constante del pH de las 96 horas en adelante que coincide con el crecimiento bacteriano.

El pH influye en la actividad de las enzimas microbianas, que a su vez afecta a la ionización de los productos químicos y por lo tanto juega un papel en el transporte de nutrientes y productos químicos tóxicos en la célula (Bitton, 1994).

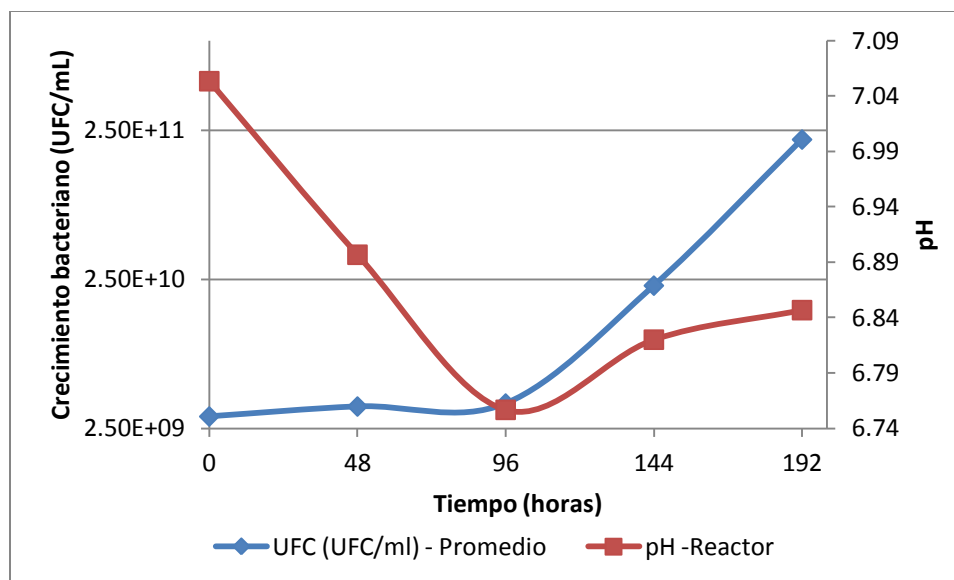


Figura 6.15. Relación pH con el crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. Escenario 2.

Con respecto a la Figura 6.16, la DQO logra metabolizarse, y parte de ella pasa a formar nuevas células, lo cual provoca que la velocidad de crecimiento en las UFC aumente. Por otra parte, existe una pérdida de biomasa viva denominada pérdida de masa endógena, donde algunos de los microorganismos emplean como alimento su propio material alimenticio almacenado o células ya muertas (Kiely, 1999). Debe mencionarse que en el periodo en estudio no se observa la capacidad de carga del sistema; pero si se observa el máximo crecimiento a las 192 horas.

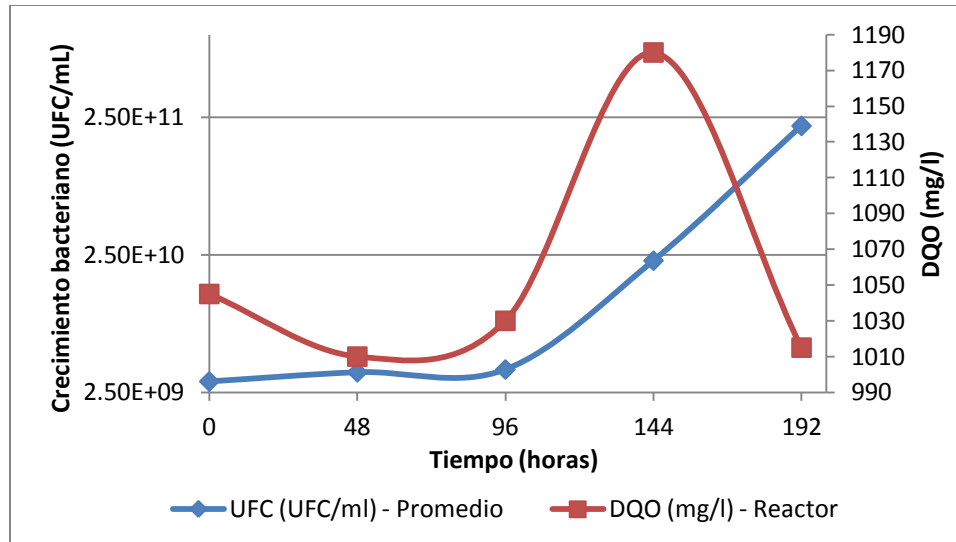


Figura 6.16. Relación DQO con respecto al crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. Escenario 2.

La relación que mantiene la DQO con la Temperatura es directamente proporcional (Figura 6.17). Por lo que se considera que la temperatura es un factor primordial para la eficiencia del tratamiento de las aguas residuales (Bitton, 1994; Kiely, 1999).

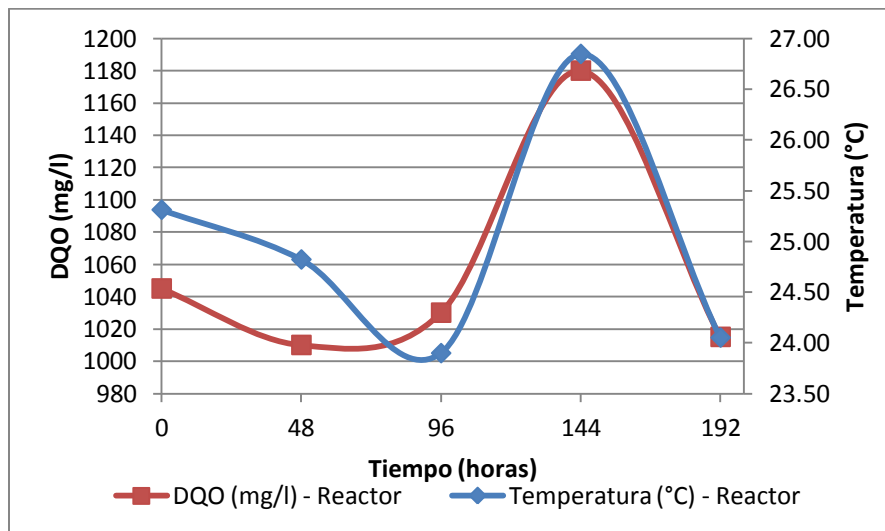


Figura 6.17. Relación DQO con la temperatura en el reactor. Escenario 2.

En el caso de la relación del pH con la DQO, en la Figura 6.18 se observa que 0 a 96 horas la DQO se mantiene en aproximadamente 1050 mg/L, es el período de la fase de adaptación, se observa cómo se baja el pH de 7,05 a 6,78; luego aumenta hasta las 144 horas (1180g mg/L), al llegar a 192 horas hay una disminución de la DQO en el reactor a 1000 mg/L, y un ligero aumento del pH de 6,76 a 6,82. Al igual que la temperatura, este es otro factor que se debe controlar al momento de tratar aguas residuales (Figura 6.18).

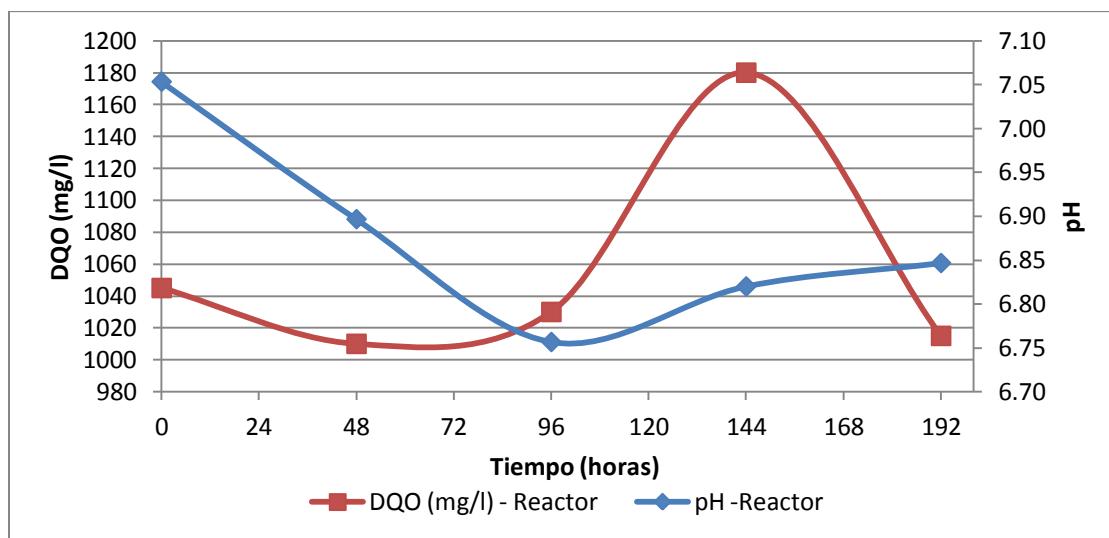


Figura 6.18. Relación DQO con el pH en el reactor. Escenario 2.

En la Figura 6.19 se muestra una comparación entre los valores de DQO y la DBO₅ obtenidos en el reactor. El agua a tratar se caracteriza por tener un material químicamente oxidable, y menos material biológicamente oxidable, lo que relaciona que el valor del DQO será mayor al valor de la DBO₅ (Romero, 1999).

En el Anexo 6.2.4 se puede observar que el valor de la DQO aumenta cuando los Sólidos Disueltos disminuyen y sucesivamente.

En pocas palabras la DQO mide tanto la materia orgánica degradable como la no biodegradable. Mientras que en la DBO_5 solo se mide el material orgánico biodegradable.

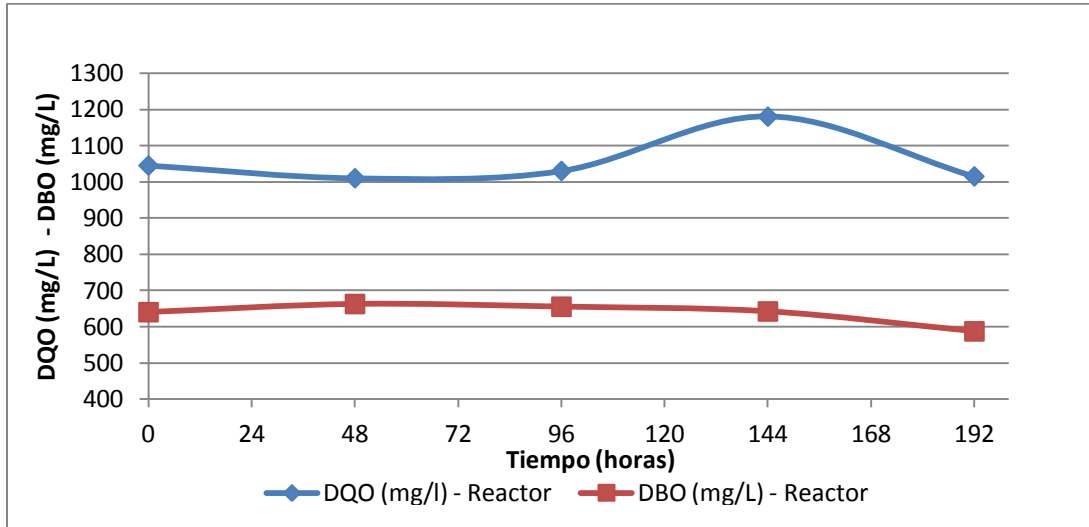


Figura 6.19. Relación entre la DQO y DBO_5 del reactor en el Escenario 2.

La comparación de DQO y DBO_5 nos ayuda a identificar si existen condiciones recalcitrantes en el agua residual a tratar. Una proporción DBO_5/DQO que se aproximen a 1 puede identificar un material altamente biodegradable (Mihelcic *et al*, 2011).

En la Tabla 6.9 se muestra la proporción de DBO_5/DQO del reactor para el Escenario 2, valores mayores a 0,544, estos resultados indican que el agua se puede tratar biológicamente, lo cual ha sido discutido por Kiely (1999) y Mihelcic *et al*. (2011).

Tabla 6.10. Proporción DBO₅/DQO del reactor en el Escenario 2.

| Tiempo (horas) | DQO (mg/L) | DBO ₅ (mg/L) | Relación DBO ₅ /DQO |
|----------------|------------|-------------------------|--------------------------------|
| 0 | 1045 | 640 | 0,61244 |
| 48 | 1010 | 662.5 | 0,65594 |
| 96 | 1030 | 655 | 0,63592 |
| 144 | 1180 | 642 | 0,54407 |
| 192 | 1015 | 587 | 0,57833 |

6.1.2.3. Resultados de salida.

Finalmente en la Tabla 6.11 se observan las mediciones de los parámetros para la salida en el Escenario 2. El máximo crecimiento bacteriano se obtuvo en una temperatura y pH promedio de 19,87°C y 6,83 respectivamente (Anexo 6.2.5) para las 240 horas con un orden de 10¹². Como se explicó anteriormente, este tipo de bacteria presenta condiciones óptimas de crecimiento en pH cercanos a 7,0 y se caracterizan por su habilidad para cambiar las condiciones de pH del medio Escudero *et al.* (2011).

Tabla 6.11. Parámetros de medición de salida. Escenario 2.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/L) | DBO ₅ (mg/L) | Sólidos suspendidos (mg/L) | Sólidos disueltos (mg/L) | Sólidos totales (mg/L) | Sólidos fijos (mg/L) | Sólidos volátiles (mg/L) | Unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL) |
|----------------|------------------|------|------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|--|
| 48 | 24,10 | 6,71 | 820 | 225 | 125 | 7,026 | 7534 | 6966,6 | 567,4 | 2,50E+09 |
| | 24,11 | 6,70 | | | | 6,991 | | | | 2,00E+09 |
| | 24,10 | 6,72 | | | | 7,009 | | | | 1,50E+09 |
| 96 | 23,64 | 6,64 | 650 | 224 | 69 | 6,984 | 7226 | 5538 | 1888 | 2,50E+09 |
| | 23,64 | 6,75 | | | | 6,985 | | | | 2,00E+09 |
| | 23,65 | 6,76 | | | | 6,988 | | | | 1,50E+09 |
| 144 | 25,55 | 6,63 | 840 | 350 | 52 | 6,966 | 7014 | 5138 | 1876 | 4,50E+09 |
| | 25,54 | 6,64 | | | | 6,967 | | | | 2,00E+09 |
| | 25,55 | 6,64 | | | | 6,967 | | | | 5,00E+09 |
| 192 | 23,35 | 6,71 | 750 | 460 | 38 | 6,979 | 7306 | 5424 | 1882 | 8,00E+11 |
| | 23,38 | 6,72 | | | | 6,978 | | | | 6,00E+11 |
| | 23,39 | 6,73 | | | | 6,976 | | | | 9,00E+11 |
| 240 | 19,86 | 6,83 | 710 | 475 | 33 | 6,943 | 7534 | 5648 | 1886 | 8,50E+11 |
| | 19,87 | 6,83 | | | | 6,943 | | | | 1,05E+12 |
| | 19,87 | 6,83 | | | | 6,943 | | | | 9,00E+11 |

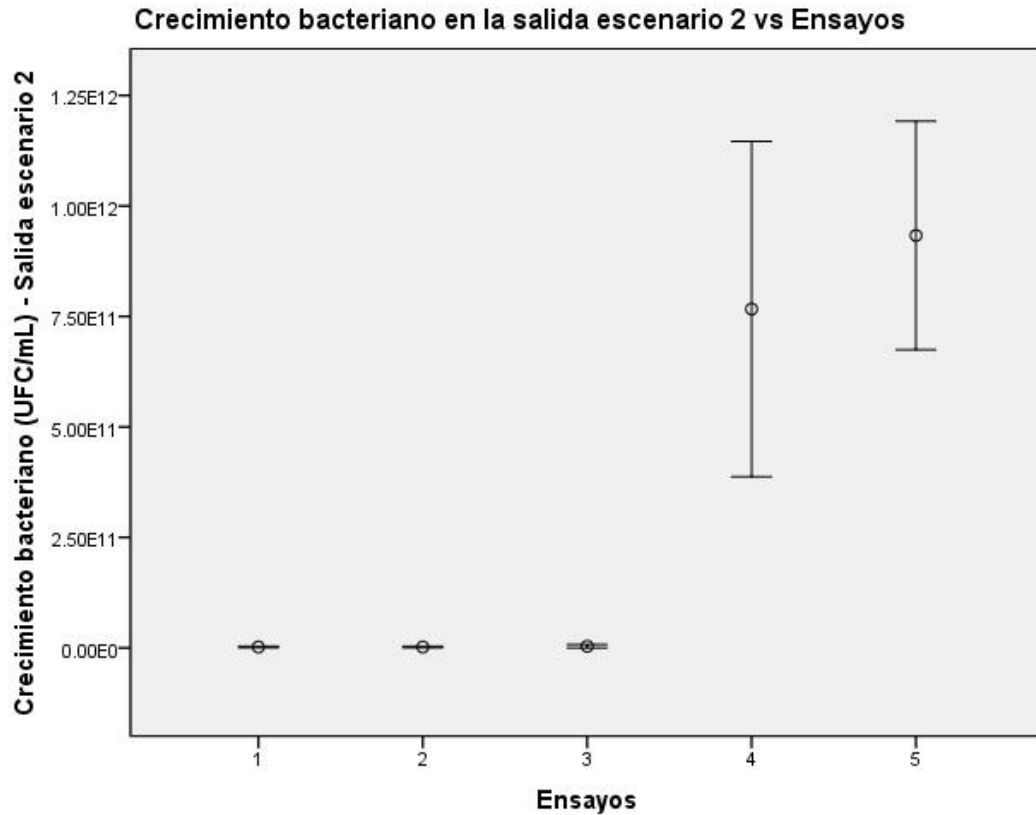


Figura 6.20. Crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi*. Salida - Escenario 2.

En la Figura 6.20 se observa el crecimiento de los microorganismos en la salida en el Escenario 2. El mayor crecimiento fue a las 240 horas con un orden de 10^{12} UFC/mL.

En el Anexo 6.2.6 se muestra el crecimiento bacteriano en una escala logarítmica.

En la Figura 6.21 se puede observar de las 0 a 96 horas un período de adaptación, donde la población se mantuvo en el orden de 10^9 , a partir de las 96 horas se evidencia un aumento de la población de tipo exponencial, para el rango de temperatura (20°C a $25,5^{\circ}\text{C}$), entre 96 y 192 horas, parece ser inversamente proporcional.

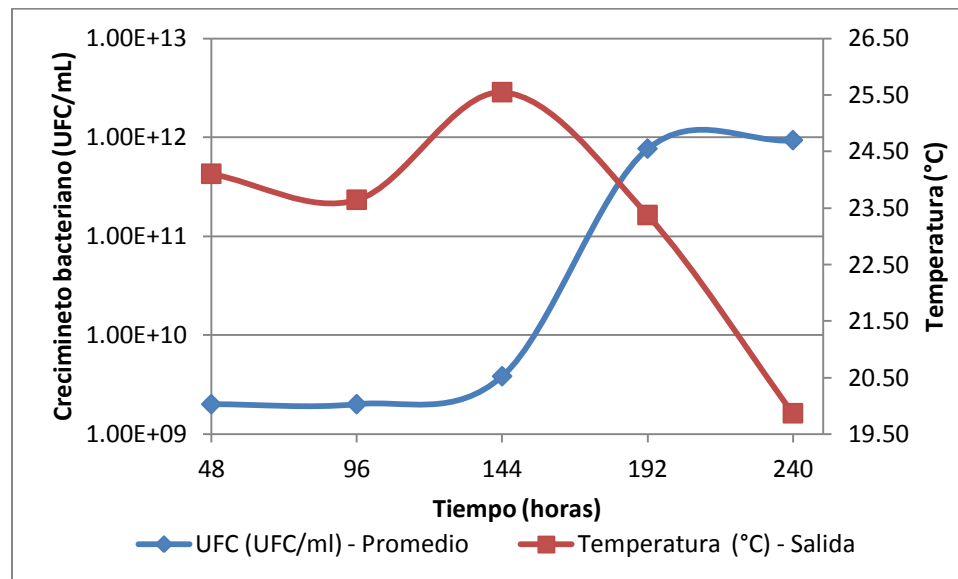


Figura 6.21. Relación temperatura con el crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en el salida. Escenario 2.

El tratamiento biológico de las aguas residuales ocurre generalmente en un pH neutro. En general, el pH óptimo para el crecimiento de las bacterias se encuentra alrededor de 7,0 aunque algunos pueden ser acidófilos obligatoriamente. El crecimiento bacteriano ocurre en una disminución del pH del medio por la liberación de metabolitos ácidos. Por el contrario, algunos microorganismos pueden aumentar el pH de su entorno (Figura 6.22).

El pH afecta a la actividad de las enzimas microbianas que afecta a la ionización de los productos químicos y por lo tanto juega un papel en el transporte de nutrientes y productos químicos tóxicos en la célula (Bitton, 1994).

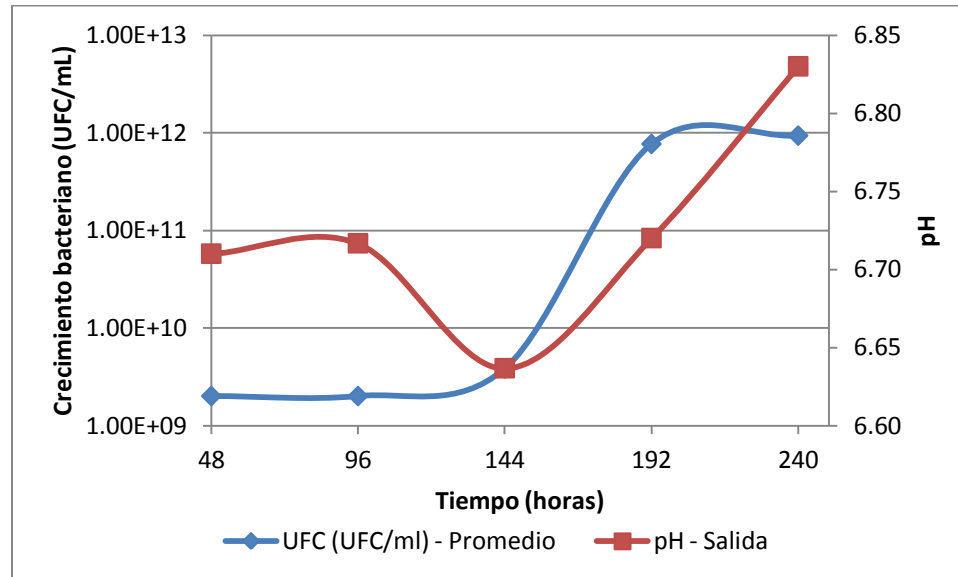


Figura 6.22. Relación pH con el crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi* en la salida. Escenario 2.

Como se puede apreciar en la Figura 6.23 el comportamiento de la DQO afecta directamente a las UFC. Como ya se explicó en los escenarios anteriores, al metabolizarse la DQO esta crea nuevas células, lo cual aumenta la velocidad de crecimiento de las UFC. A su vez, existe una pérdida de biomasa que se denomina fase endógena, donde algunos de los microorganismos emplean como alimento su propio material alimenticio almacenado o células ya muertas (Kiely, 1999).

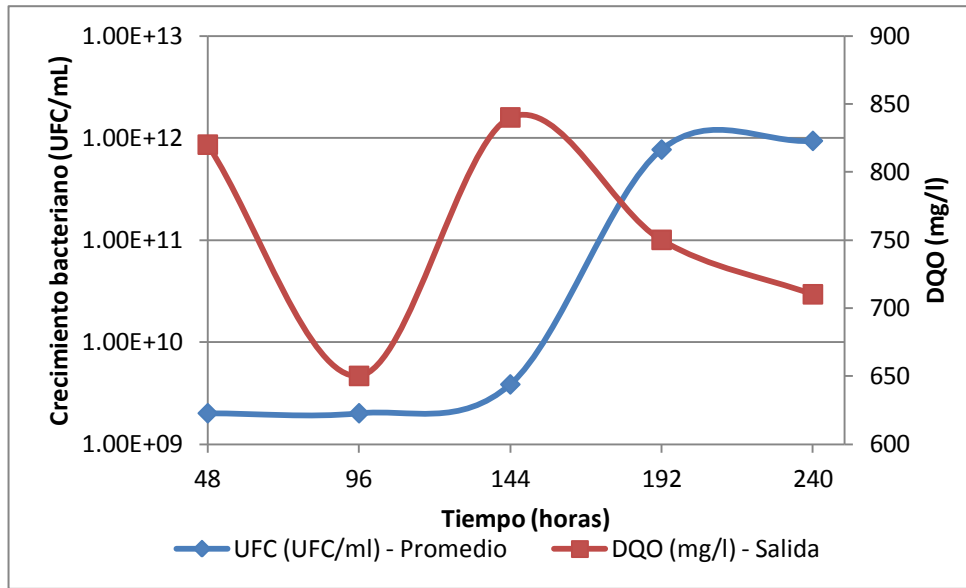


Figura 6.23 Relación DQO con respecto al crecimiento de la cepa *Rhodococcus equi*. Salida - Escenario 2.

En la Figura 6.24 se observa la relación que mantiene la DQO con la Temperatura es directamente proporcional, lo cual concuerda con Kiely (1999) y Mihelcic et al. (2001), la temperatura es un factor primordial para la eficiencia del tratamiento de las aguas residuales.

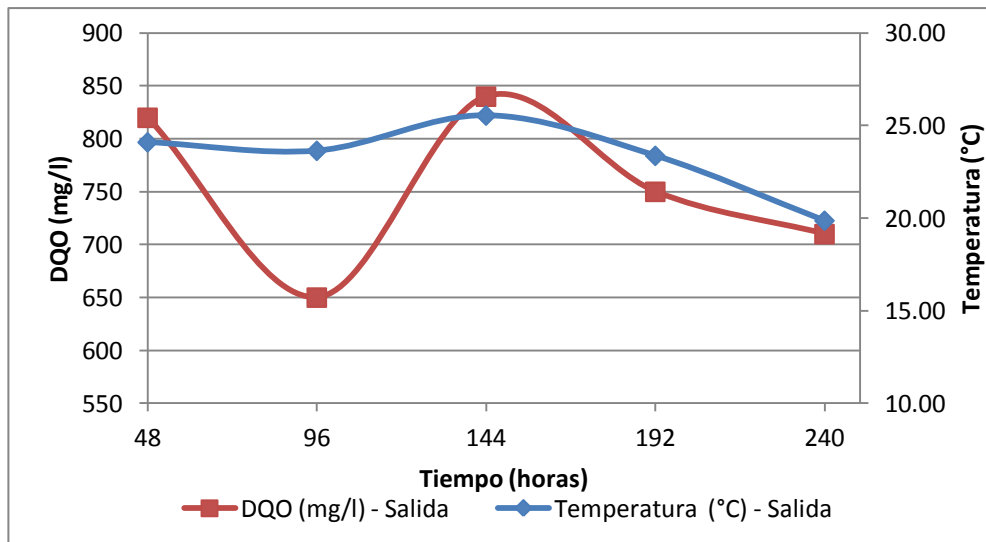


Figura 6.24. Relación DQO con Temperatura en la salida. Escenario 2.

La Figura 6.25 muestra una relación inversamente proporcional. Cuando el pH aumenta la DQO baja y viceversa, por ejemplo a las 96 horas se puede observar que el máximo valor de DQO (840 mg/L), coincide con el mínimo valor de pH (6,64). Al igual que la temperatura, este es otro factor que se debe controlar al momento de tratar aguas residuales (Kiely, 1999; Mihelcic *et al.* 2011).

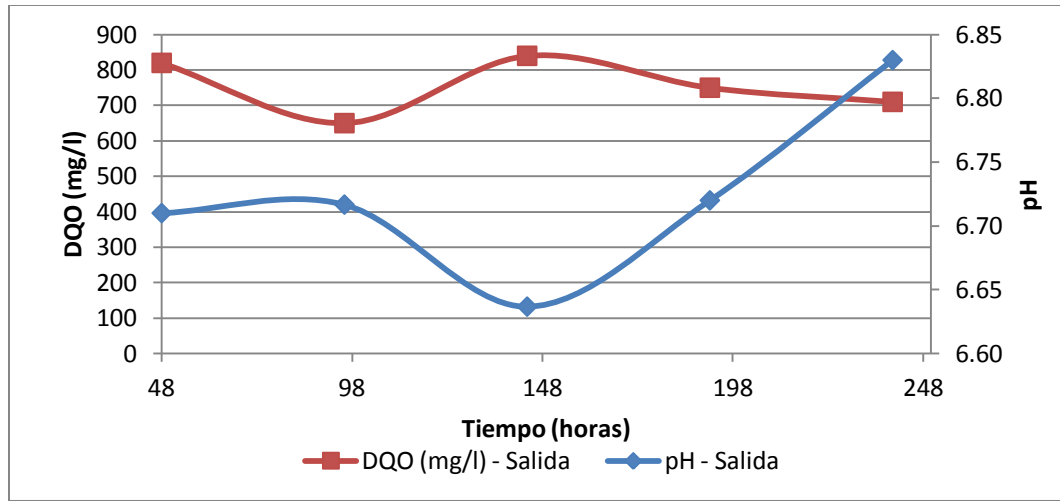


Figura 6.25. Relación DQO con pH en la salida. Escenario 2.

Como se puede observar en la Figura 6.26, el DQO es mayor que la DBO₅. Esto, fue explicado anteriormente, ya que la DQO mide tanto la materia orgánica degradable como la no biodegradable. Mientras que en la DBO₅ solo se mide el material orgánico biodegradable (Kiely 1999).

En los Anexos 6.2.7 y 6.2.8 se pueden apreciar como los valores de los Sólidos Suspendidos y Sólidos Disueltos respectivamente, disminuyen cuando aumenta la DQO.

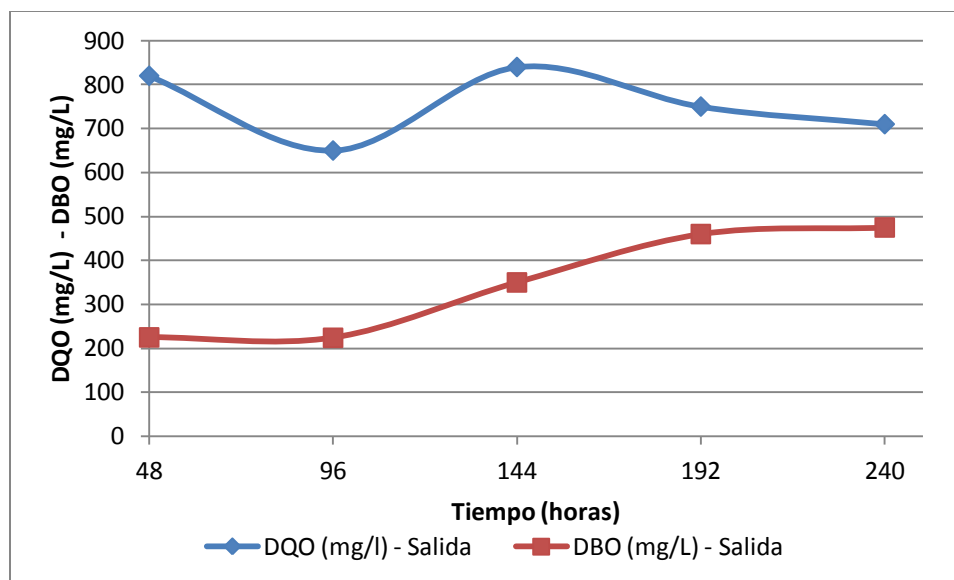


Figura 6.26. Relación DQO con la DBO₅ en la salida. Escenario 2.

En la Tabla 6.13 se muestra la proporción de DBO₅/DQO del reactor para el Escenario 2, la cual indica que el agua residual industrial tratada estaba compuesta de material altamente biodegradable. Según Mihelcic *et al.*, 2011 una proporción DBO₅/DQO que se aproximen a 1 puede identificar un material altamente biodegradable. La comparación de DQO y DBO₅ nos ayuda a identificar si existen condiciones recalcitrantes en el agua residual a tratar.

Tabla 6.13. Proporción DBO₅/DQO de la salida en el Escenario 2.

| Tiempo (horas) | DQO (mg/l) | DBO ₅ (mg/L) | Relación DBO ₅ /DQO |
|----------------|------------|-------------------------|--------------------------------|
| 48 | 820 | 225 | 0.27439024 |
| 96 | 650 | 224 | 0.34461538 |
| 144 | 840 | 350 | 0.41666667 |
| 192 | 750 | 460 | 0.61333333 |
| 240 | 710 | 475 | 0.66901408 |

6.1.2.4. Eficiencia en el Escenario 2.

En el Escenario 2, se hicieron un total de 5 ensayos, los cuales tuvieron una duración de 192 horas, durando cada ensayo 48 horas, en la Tabla 6.14 se muestran los valores de eficiencia del sistema en el Escenario 2, los cuales fueron obtenidos comparando los valores de DQO y DBO₅ tanto de la entrada como la salida para cada uno de los 5 ensayos.

Tabla 6.12. Eficiencia del Escenario 2.

| Ensayo | DQO (mg/l) - Reactor | DQO (mg/l) - Salida | Eficiencia DQO (mg/L) | DBO ₅ (mg/L) - Reactor | DBO ₅ (mg/L) - Salida | Eficiencia DBO ₅ (mg/L) |
|--------|----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 1045 | 820 | 21,53% | 640 | 225 | 64,84% |
| 2 | 1010 | 650 | 35,64% | 662,5 | 224 | 66,19% |
| 3 | 1030 | 840 | 18,45% | 655 | 350 | 46,56% |
| 4 | 1180 | 750 | 36,44% | 642 | 460 | 28,35% |
| 5 | 1015 | 710 | 30,05% | 587 | 475 | 19,80% |

Comparando las Tablas 6.6. (Eficiencia del Escenario 1) y la Tabla 6.12 (Eficiencia del Escenario 2), el sistema es más eficiente cuando aumentamos el tiempo de retención hidráulica, en este caso, en el escenario 2 el TRH fue de 48 horas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la bacteria tiene la capacidad de degradar mucho más cuando se encuentra bajo una temperatura de 23-24 °C y un pH de 6,7-6,9.

6.1.2.5. Relación del reactor y salida.

En las siguientes Figuras 6.27 y 6.28 se muestran la comparación de los valores de DQO y DBO₅ tomados en el reactor y en la salida, en cada uno de los ensayos.

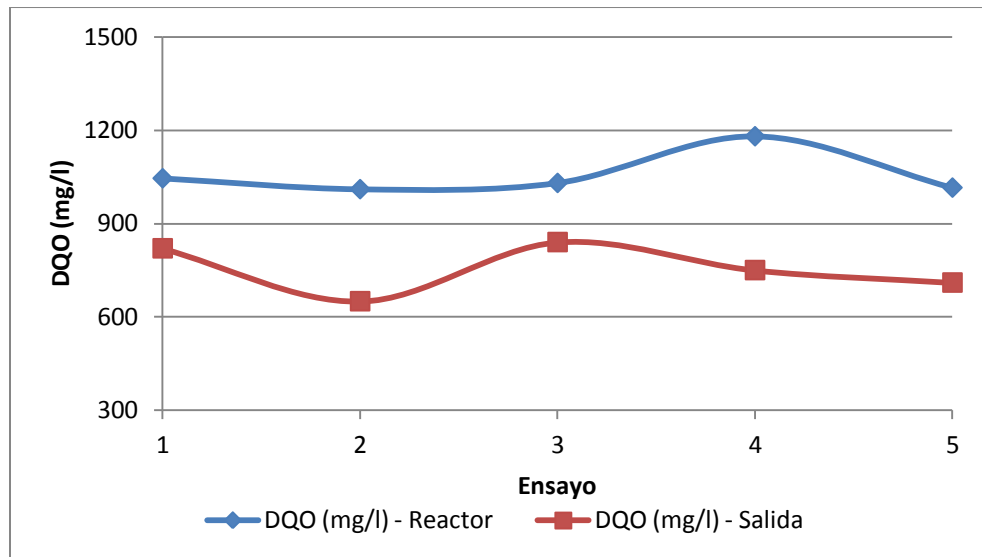


Figura 6.27. Relación DQO con respecto al reactor y la salida. Escenario 2.

Las mayores eficiencias de degradación de la DQO en el Escenario 2, se dieron a las 48 horas (35,64 %) y a las 144 horas (36,44 %), las mismas coinciden con un pH de 6,72 y una temperatura de aproximadamente 23,7 °C.

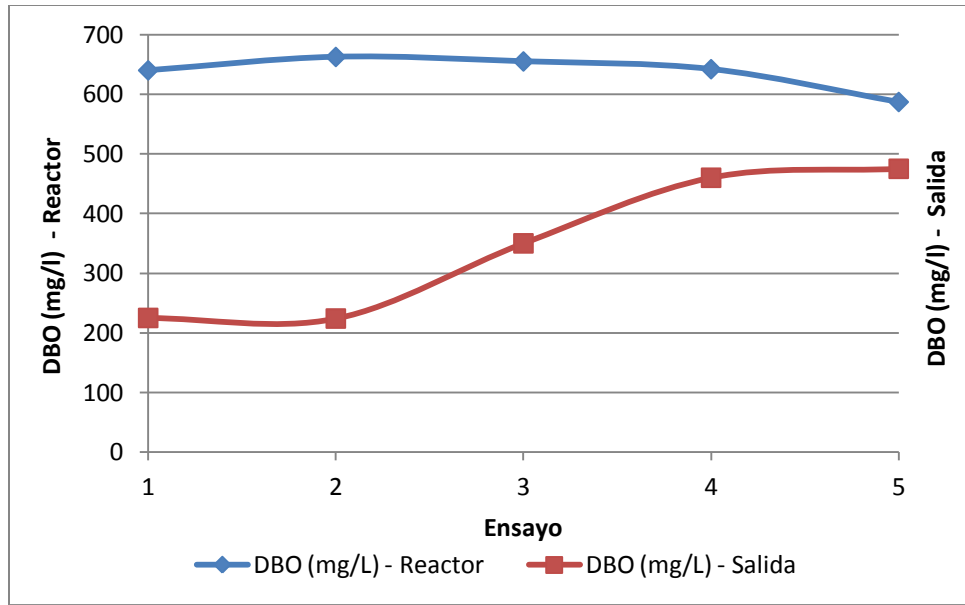


Figura 6.28. Relación DBO₅ con respecto al reactor y la salida. Escenario 2.

En cuanto a las mayores eficiencias de degradación de materia fácilmente biodegradable (66,84 % y 66,19 %) se obtuvieron en el tiempo de 0 horas y a las 48 horas, esto puede estar relacionado con las mayores relaciones de DBO₅/DQO de 0,62 y 0,66, en el reactor; de acuerdo a Kiely (1999) y Mihelcic *et al.* (2011), está comprobado que mientras mayor es la relación DBO₅/DQO mayor es la capacidad de las bacterias de degradarla.

6.1.2.6. Medición del hidrocarburo Aromático Policíclicos en el reactor y la salida en el Escenario N°2

Como se describió en la metodología antes de inyectar las muestras a analizar se inyectaron patrones de Naftaleno y n-Hexano, Naftaleno y el medio artificial para que el equipo pudiese hacer la curva de calibración (Anexo 6.3.1, 6.3.2 y 6.3.3)

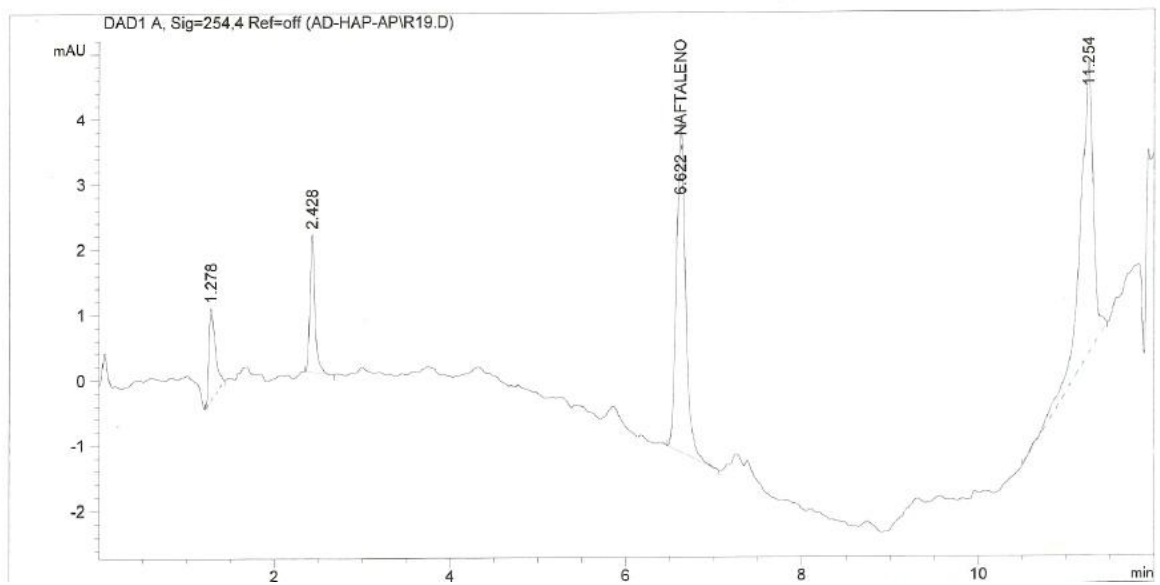


Figura 6.29. Cromatograma de la muestra del reactor al inicio del ensayo 2 a las 48 horas.

En la Figura 6.29, se observa la presencia de Naftaleno a los 6.622 minutos en una muestra tomada del reactor. Esto prueba que la concentración del Naftaleno se redujo de 30 mg/L a 8,43 mg/L, obteniendo una eficiencia de 71,9%, debido a la degradación efectuada por las bacterias *Rhodococcus equi*, pasada las 48 horas para finalizar el segundo ensayo se tomo otra muestra en la salida a las 96 horas (Figura 6.30).

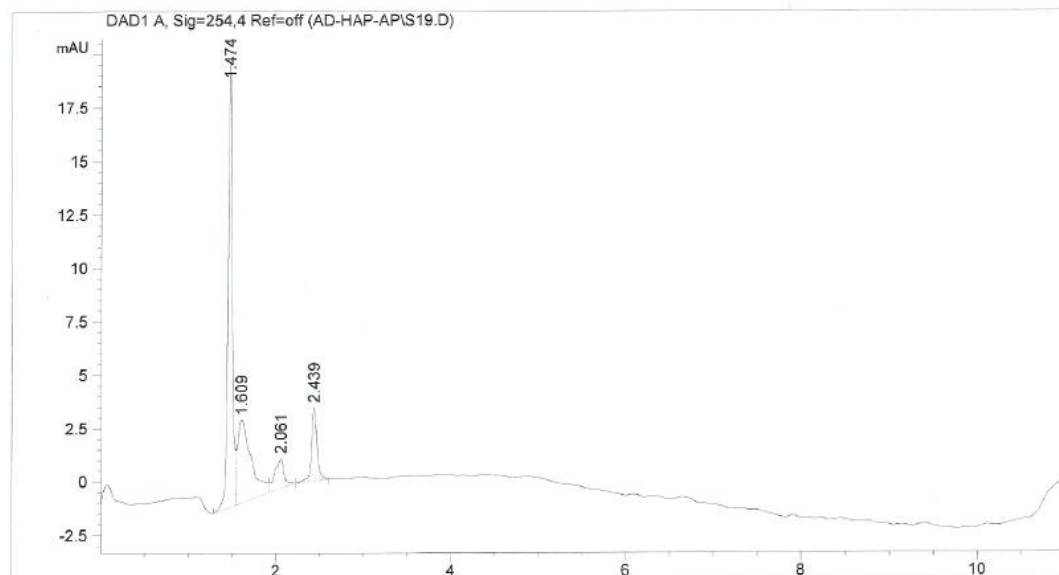


Figura 6.30. Cromatograma de la muestra tomada de la salida al final del ensayo 2 a las 96 horas.

Sin embargo, en la Figura 6.30 no se observa la presencia de Naftaleno. Esta muestra se tomó del tanque de salida, pudiendo observar que el afluente tratado salía del sistema sin naftaleno. Por lo que se puede concluir que a las 96 horas la eficiencia de degradación de naftaleno por la cepa *Rhodococcus equi* es del 100%.

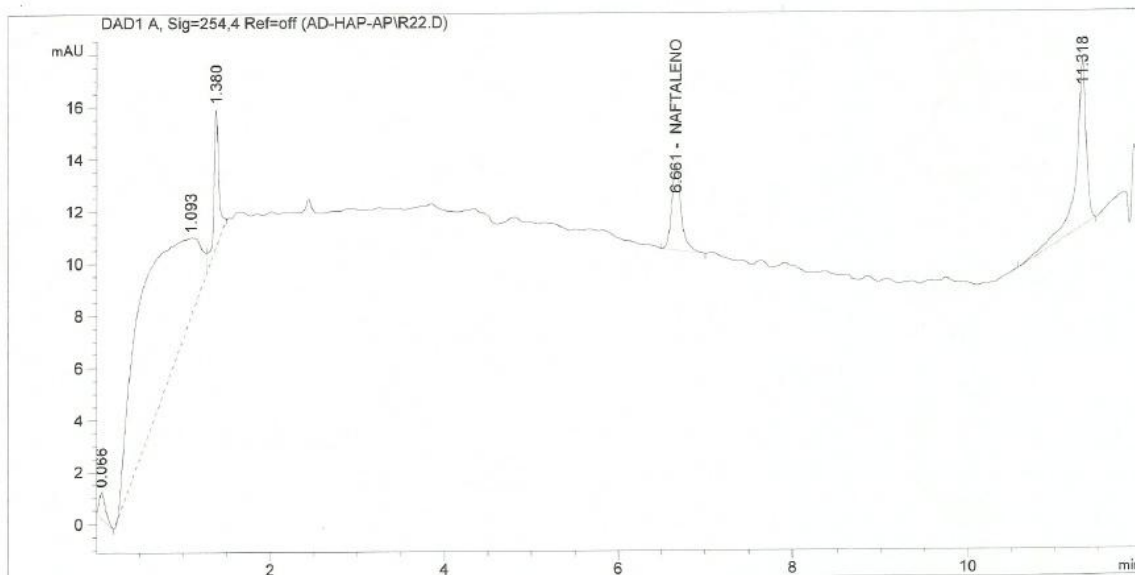


Figura 6.31. Cromatograma de la muestra del reactor tomada al inicio del Ensayo 5 a las 192 horas.

La presencia de Naftaleno en esta muestra del reactor se dio a los 6,661 minutos con una concentración 6,86 mg/L. Ocurrió el mismo fenómeno de degradación que en la muestra del reactor del Ensayo 2 por la presencia de las bacterias *Rhodococcus equi*, viendo así una eficiencia casi del 6% mayor a la anterior.

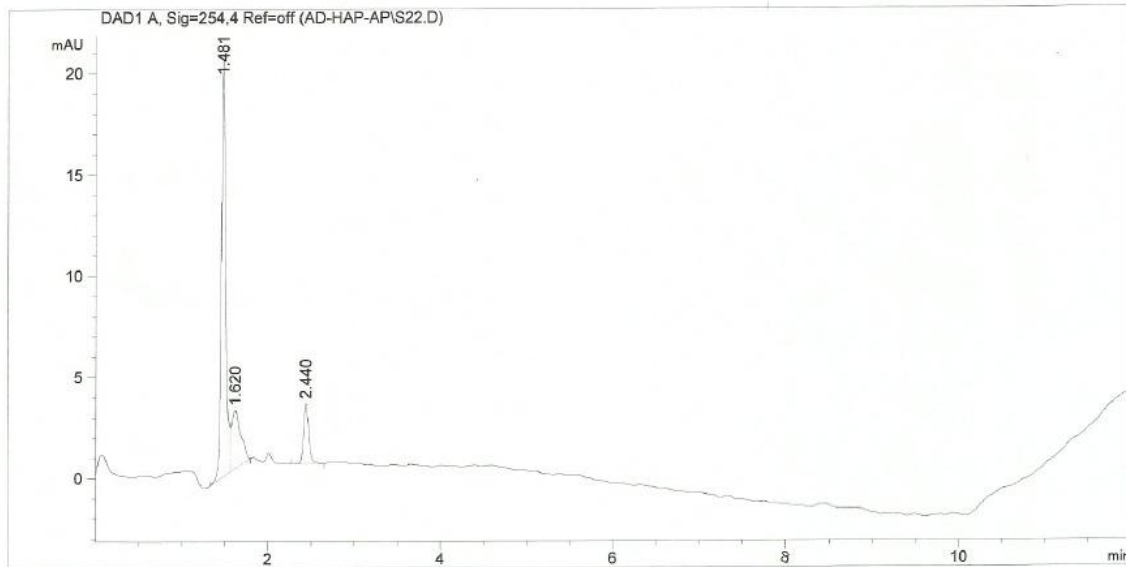


Figura 6.32. Cromatograma de la muestra de salida del ensayo 5 a las 240 horas.

Mientras que en esta muestra de la salida no se presencié ninguna concentración de Naftaleno a los 6,6 minutos; por lo que se puede concluir que a las 240 h la eficiencia de degradación de naftaleno por la cepa *Rhodococcus equi* es del 100%.

6.2. Resumen de la Discusión

La importancia de la temperatura en la velocidad de las reacciones bioquímicas; en este caso este parámetro fue muy difícil de controlar y se mantuvo entre los 23°C y los 26°C. Al igual que la temperatura el pH, fue otro parámetro del cual no se tuvo control, por ello se hicieron mediciones cada 24 horas para el Escenario 1 y 48 horas para el Escenario 2, para así tener en cuenta los cambios bruscos e interpretar si hubiese problemas en el proceso de biodegradación.

Los resultados obtenidos muestran que los valores de pH, fueron adecuados para que se evidencie la capacidad degradadora de hidrocarburos por parte de la cepa bacteriana utilizada en esta investigación.

Se considera que las tasas de crecimiento específico de la especie *Rhodococcus equi* fueron altas y con algunas irregularidades, consideramos que puede ser una consecuencia propia de su metabolismo o quizá están influenciadas por las condiciones del medio (pH, Temperatura, etc.)

El control de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), es uno de los aspectos de importancia en trabajos de biorremediación, ya que el mismo debe mantenerse sobre los 10^6 para garantizar una buena tasa de degradación (Gualoto, 2012). Tomando en consideración dicha fuente, estimamos que nuestros resultados, confirman dicha abundancia, pese que en cada uno de los Escenarios los valores de las UFC fueron mayores que 10^6 ; seguramente debido

a las condiciones especiales con las que se mantuvo la bacteria antes de ser sembrada en el sistema.

En cuanto a la tasa de biodegradación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, en este caso del Naftaleno, los resultados obtenidos con la medición por medio de la cromatografía, afirman que el uso de bacterias nativas, aisladas de un ambiente marino contaminado por Hidrocarburos, pueden ser utilizadas en un sistema de tratamiento de aguas con eficiencias que llegan hasta el 100% de remoción del Naftaleno, estos resultados obtenidos para HAP se confirman con referencias de trabajos experimentales y prácticos de biodegradación de aromáticos con *Rhodococcus* en el Ecuador realizados por, Gualoto y Cabrera (2008).

El hecho de que las eficiencias de biodegradación de DQO y DBO₅, fuesen relativamente más bajas en el Escenario 1 (18.4 % y 34,10 %, respectivamente) que en el Escenario 2 (36,44% y 66,19%), puede deberse a los TRH utilizados para la pruebas, en el Escenario 1 era menor (24 h) que en el Escenario 2 (48 h), como concluyo Abbas *et al.* (2001) al incrementar el TRH se incrementa la eficiencia de remoción del DQO y a la vez aumenta la eficiencia de remoción de la DBO₅, por otra parte Chang *et al.* (2014), estudiaron la degradación de DQO y Naftaleno por medio de un sistema de lodos activados utilizando un consorcio de bacterias, concluyendo que la eficiencia del tratamiento aumenta cuando disminuye el caudal en la entrada y cuando aumenta el tiempo de retención hidráulico. En este estudio no se evaluó la influencia del caudal de entrada.

CAPITULO VII. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES.

Las principales fuentes de hidrocarburos aromáticos son los procesos petroquímicos, en particular la destilación del petróleo crudo y se encuentran principalmente en atmosferas urbanas y en el medio marino debido a los derrames.

Los hidrocarburos aromáticos son más difíciles de degradar y dentro de ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos se degradan en muy baja proporción.

Se analizó el proceso de biodegradación en el medio acuático de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Por otra parte se demostró la capacidad que poseen las cepas bacterianas autóctonas, aisladas de los sedimentos marinos contaminados con petróleo, para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos. Como caso de estudio se analizó la cepa *Rhodococcus equi*, aislada en la Bahía de Manzanillo.

La eficiencia de degradación de la cepa *Rhodococcus equi* en un reactor en continuo se investigó a través de dos escenarios, el primero con un tiempo de retención de 24 horas y el segundo con un tiempo de retención hidráulico de 48 horas. En el escenario 1, se logró observar que el crecimiento de la cepa bacteriana tomó una respuesta positiva a la alimentación del reactor con carga orgánica (en términos de la DQO) y naftaleno obteniendo crecimientos de hasta aproximadamente ocho órdenes de magnitud mayor (6×10^{13}) en UFC/mL, en relación a la inoculada ($7,85 \times 10^6$), esto bajo una temperatura de 23,57 °C y un pH de 6.71. Mientras que en el Escenario 2, se observó un crecimiento mucho

mayor al del Escenario 1. La inoculación fue de $3.00E+9$ UFC/mL y el máximo crecimiento en este escenario fue de $2.17E+11$ UFC/mL.

Se pudo comprobar la eficiencia de degradación de naftaleno de la cepa *Rhodococcus equi*, a la salida del reactor en relación con la entrada al mismo, logrando el 100 % de consumo del hidrocarburo, la máxima eficiencia de degradación en DQO fue 36,44% y en DBO_5 fue 66,19%, esto se da cuando el tiempo de retención hidráulica en el reactor es mayor, como fue el caso de Escenario 2, donde el TRH fue de 48 horas. Mientras que los porcentajes de eficiencias en el Escenario 1 fueron menores en comparación con el Escenario 2. De esta manera se comprueba que al aumentar el tiempo de retención hidráulico, aumenta la eficiencia de la Cepa de realizar su trabajo de degradación en el reactor. Esto comprueba nuestra hipótesis positiva, la cepa *Rhodococcus equi* posee la capacidad de degradar compuestos de difícil tratamiento, como el naftaleno, en un reactor aerobio.

En cuanto a la Demanda Química de Oxígeno (DQO), en ambos escenarios, fue parte fundamental. Porque, al ir aumentando la misma, las células se metabolizan rápidamente, dando como resultado el crecimiento de nuevas células.

Con la cromatografía se pudo detectar, la presencia de Naftaleno en el reactor, mientras que en las muestras de salidas no se detectó. Esto comprueba que el proceso de biodegradación de la cepa fue efectivo.

La *Rhodococcus equi*, cepa bacteriana seleccionada para este estudio, se considera apta para ser utilizada en futuras pruebas y estudios que permitan generar tecnologías de biorremediación apropiadas para el tratamiento de las aguas residuales contaminadas con Hidrocarburos en nuestro país aguas

Recomendaciones

- Comprobar la eficiencia de degradación, de la cepa *Rhodococcus equi*, tomando otros tiempo de retención hidráulica y caudales de entrada.
- Realizar investigaciones con otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, con el objetivo de comprobar la capacidad de degradación de la cepa *Rhodococcus equi*.
- Realizar otros estudios en los cuales se ensaye la eficiencia de degradación de la Cepa, en función de cambios en los parámetros de diseño del reactor en continuo.
- Realizar estudios con una combinación de cepas, para aumentar la Eficiencia de Biodegradación de Naftaleno y otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.
- Continuar con estudios sobre el aislamiento e identificación de especies nativas en sitios contaminados, especialmente por hidrocarburos, como el Canal de Panamá y áreas adyacentes; de forma tal de poder potenciar la capacidad de degradación de la combinación de cepas nativas en sistemas de tratamiento biológico y biorremediación de sitios contaminados.

CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abbas, H.; Seif, H.; Moursi, A. (2001). Sixth International Water Technology Conference, IWTC. "Effect of hydraulic retention time on the activated sludge system". Alexandria, Egypt.
2. Abd-Elsalam, H.; Hafez, E.; Hussain, A.; Ali, A.; El-Hanafy, A. (2009). American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 5 (1): 31-38. "Isolation and identification of three-rings Polyaromatic Hydrocarbons (Anthracene and Phenanthrene) degrading Bacteria" Alexandria, Egypt.
3. Acevedo, F. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the whiterot fungus *Anthracophyllum discolor* Sp4 and nanoclayimmobilized manganese peroxidase. Trabajo de titulación (Tesis Doctoral en Ciencias en Recursos Naturales). Temuco, Chile: Universidad de La Frontera, Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración, Programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales. 2010. 176 p.
4. Agudo, Antonio (2009). Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP): "Acercamiento a su problemática como riesgo laboral". Instituto Catalán de Oncología. Madrid, España. Editorial: UGT Comisión Ejecutiva Confederal.
5. Alazard, D., Suarez, N. C. y Fernández, L. (2002). Curso Internacional de Microbiología Industrial. "Microbiología de pozos petroleros". UAM-Iztapalapa.
6. Alexander M. (1999). Biodegradation and bioremediation. Academic Press. U.S.A.

7. Allen, C.; Boyd, D.; Hempenstall, F.; Larkin, M.; Sharma, N.; (1999). Applied and Environmental Microbiology, 65 (3):1335 – 1339 "Contrasting Effects of a Nonionic Surfactant on the Biotransformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to *cis*-Dihydrodiols by Soil Bacteria" Ireland.
8. APHA, AWWA, WPCF: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15th de., American Public Health Association, Washington D.C., 1980.
9. April, T. M., Foght, J. M., and Currah, R. S. (2000). Canadian Journal of Microbiology, 46 (1): 38–49 "Hydrocarbondegrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada".
10. Arroyo, E.; Quesada, J. 2002. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. GEOCISA. División de Protección Ambiental de Suelos. Recuperado de: www.geocisa.com.
11. Atlas, R.M y Bartha, R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley. España.
12. ATSDR, Agency for Toxic Substances y Disease Registry, (1996). "POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS [PAHs]", División de Toxicología ToxFAQsTM. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=121&tid=25>
13. Balachandran, C.; Duraipandiyan, V.; Balakrishna, K; Ignacimuthu, S. (2012). Division of Microbiology, Entomology Research Institute, India. Bioresource Technology, volumen 112: 83-9. "Petroleum and polycyclic aromatic

- hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil“.
14. Bharti P. David, Chirag M. Ghevariya , Jwalant K. Bhatt , Dushyant R. Dudhagara , Rahul K. Rajpara, (2014), Marina Pollution Bulletin, volumen 79, 123-129, “Enhanced biodegradation of total polycyclic aromatic hydrocarbons (TPAHs) by marine halotolerant *Achromobacter xylosoxidans* using Triton X-100 and β -cyclodextrin – A microcosm approach”.
 15. Bitton, G. Wastewater Microbiology. 1a. ed. New York: Wiley-Liss, Inc., 1994. 478 p.
 16. Bolaños, S.; Casas J. C.; Aguirre, N. (2008). *Gestión y Ambiente*, volumen 11, No2, 39-48. “Análisis comparativo de la remoción de un sustrato orgánico por las macrófitas *Pistia stratiotes* y *Egeria densa* en un sistema Batch”.
 17. Boyles, W. 1997. Technical Information Series, Booklet No. 9. The Science of Chemical Oxygen Demand. Denver, Colorado.
 18. Bracho, M.; Díaz, L.; Soto, L. (2004). Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. Laboratorio de Microbiología Acuática, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
 19. Cabal, M. B. (2009). “Depuración de efluentes contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante carbones activados: Evaluación del proceso de adsorción”. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo.

20. Castro, G. (2007). Gobierno de Chile, Ministerio de Agricultura, Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Informe final diseño monitoreo frente derrames de hidrocarburos. Quillota, Chile.
21. Chang Y., Cheng H., Lai S., Ning H. (2014). International Biodeterioration & Biodegradation, volumen 86: 272-277. "Biodegradation of naphthalene in the oil refinery wastewater by enriched activated sludge".
22. Chirinos, I., Larreal, M., Diaz, J. (2010). "Biorremediación de lodos petroquímicos mediante el uso de la biota microbiana autóctona en un oxisol del municipio Lagunillas del estado Zulia, Venezuela" Departamento de Ingeniería Suelos y Agua. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo.
23. CNRCOP, Centro Nacional de Referencia sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. (2004) "Breve perfil de las sustancias COP incluidas en el Convenio de Estocolmo y el Reglamento (CE) nº 850" Disponible en: <http://www.cnrkop.es/gc/assets/docs/Hidrocarburos%20Aromaticos%20Policiclicos.pdf>
24. Correa, J.; Domínguez, V.M.; Martínez, M.; Vidal, G. (2003). Aerobic degradation of 2,4,6- Trichlorophenol content in ECF bleached effluent. Environment International 29:459-465, San Diego, U.S.A.
25. Crites, R. Y Tchobanoglous, G. (2000). Tratamiento de Aguas residuales en pequeñas poblaciones. Mc Graw Hill, Colombia.
26. Cuevas, B. Remoción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) utilizando reactores de suelos activados inoculados biológicamente. Trabajo

- de titulación (Tesis de maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental). Zacatenco, México D.F: Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. 2008. 141 p.
27. Czysz, W.; Denne, A.; Rump, H.; Schneider, W.; Staudte, E.; Supperl, W.; Blitz, E.; Böhnke, B.; Doetsch, P.; Dreschmann, P.; Pöppinghaus, K.; Siekmann, K.; Thomas, S. Cooperación Técnica República Federal de Alemania (GTZ). Manual de Disposición de Aguas Residuales. Origen, Descarga, Tratamiento y Análisis de las Aguas Residuales. Tomo II. De la edición en español: Programa de Salud Ambiental, Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS) – Organización Panamericana de la Salud (OPS) – Organización Mundial de la Salud (OMS). 1991. Lima, Perú. 443-1058p.
28. Das N., Chandran P. (2011). SAGE-Hindawi Access to Research. Biotechnology Research International, volume 2011 pág. 1-2. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. India.
29. Das N., Chandran P. (2011). SAGE-Hindawi Access to Research. Biotechnology Research International, volume 2011 pág. 1-2. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. India.
30. Domínguez, V.M.; Correa, J.; Vidal, G.; López, A.; Martínez, M. (2002). 2,4,6-Trichlorophenol Degradation by River Sediment Exposed to Bleached Kraft Mill Discharge. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 69:463-470, New York, U.S.A.

31. Domínguez, V.M.; Vidal, G.; Grey, A.; Mejía, F.; Díaz, A. (2013). Proyecto EFA-010-018 “Modelo cinético para determinar la capacidad depurativa de hidrocarburos del microcosmos, en agua y sedimento, de la bahía de manzanillo, zona portuaria del Canal de Panamá y su aplicación a sistemas de tratamiento biológico”. Universidad Tecnológica de Panamá. Panamá.
32. Echarri, L. (2007), Población, ecología y ambiente, Universidad de Navarra.
33. Eghtesadi, P; Darvish, K.; Rahmanpoor, S. (2013) “Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments of Gorgan Bay, Caspian Sea”, Instituto Nacional Iraní de Oceanografía y Atmósfera (INIOAS).
34. Ellis, L.B.M.; Hershberger D.; Bryan E.M., Wackett L.P. (2001), Universidad de Minesota, “Biocatalysis/Biodegradation Database: emphasizing enzymes”.
35. Enciclopedia de la salud, Guía de productos químicos 104. “Propiedades de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos”. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/spivst/2012/104-09.pdf>
36. Environment Canada. 1999. Canadian sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Supporting document. Environmental Conservation Service, Ecosystem Science Directorate, Science Policy and Environmental Quality Branch, Guidelines and Standards Division, Ottawa. Draft.
37. Ercoli, E. C. (1998). AIDIS. “Tratamientos biológicos”.

38. Escudero, J.; Londoño, M.; Toro, N.; Márquez, M. (2011). V Simposio Internacional de Biofábricas. I Congreso Internacional de Flujos Reactivos, Biorrefinerías: Presente y futuro en la producción de insumos químicos y biocombustibles. "Efectos del pH en el crecimiento de una cepa de *Rhodococcus rhodochrous* usando un medio de carbón mineral". Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Minas. Medellín, Colombia.
39. Evers, D.; Craig, R. Deshalogenación de compuestos orgánicos halogenados. Registro de la Propiedad Industrial España (0 252 688): 1-10, 91-1.
40. Finklea, J.; Messite, J.; Coppée, G.; Sauter, S.; Hunt, V.; Spiegel, J.; Kraus, R.; Soskolne, C.; Laurig, W.; Terracini, B.; Myers, M. "Propiedades de los hidrocarburos aromáticos". Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, pp. 283, Chantal Dufresne, BA., Madrid, 2011.
41. Frioni, L. Procesos Microbianos. Argentina: Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, 1999. 332p.
42. Fritsche, J.D. (1985). Journal of Basic Bacteriology 25, 603-619. "Nature and significance of Microbial cometabolism of xenobióticos".
43. García, C., (2005^a). "Responsabilidad por contaminación por hidrocarburos", Tesis de Maestría ante la Universidad del País Vasco.
44. García, M. (2005^b). Departamento de Ingeniería Química y Combustibles. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos asociados a combustibles fósiles. Caracterización, análisis y remediación. Madrid.

45. García, R.; Peralta, M. (2008). *Revista mexicana de Ingeniería Química*, 7 (1) 1-12. "Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos".
46. Gargouri, B.; Karray, F.; Mhiri, N.; Aloui, F.; Sayadi, S. (2011). *Journal of Hazardous Materials*, volume 189 pág. 427–434, "Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents". Tunisia.
47. Gargouri, B.; Karray, F.; Mhiri, N.; Aloui, F.; Sayadi, S. (2011). *Journal of Hazardous Materials*, volume 189 pág. 427–434, "Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents". Tunisia.
48. Gomes, R.B., Nogueira, R., Oliverira, J.M., Peixoto, J., Brito, A.G., 2009. Determination of total and available fractions of PAHs by SPME in oily wastewaters: overcoming interference from NAPL and NOM. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 16, 671e678.
49. Gómez, S.; Gutiérrez, D.; Hernández, A.; Hernández, C.; Losada, M.; Mantilla, P. (2008). *NOVA: Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. Vol. 6. No 9. Enero-Junio. Pág.101-212.
50. Goodfellow M, Anderson G. (1977). *J Gen Microbiol*; 100: 99-122. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the "Rhodochrous" complex.
51. Grey A., Mejía F., Domínguez V. (2013). Eleventh LACCEI Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technology (LACCEI-2013).

- "Innovation in Engineering, Technology and Education for Competitiveness and Prosperity". Isolation and Identification of bacteria capable of degrading Naphthalene from sediments collected area near the Panama Canal. Cancun, Mexico.
52. Grey, A. A., Domínguez V.M., Castellero M. A., Determination of Physicochemical and Microbiological indicators of surface water quality in Manzanillo Bay (in Spanish), Revista I+D Tecnológico (Journal of Technological D+R),10(1),16-27, ISSN 2219-6714, 2014.
53. Gualoto, M., Cabrera R. (2011). Congreso AEISA, Cuenca."Tratamiento de lodos residuales industriales con tamices moleculares y cepas microbianas autóctonas".
54. Gualoto, M. (2012). INAE. "Biorremediación de hidrocarburos utilizando cepas antárticas".
Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/81757959/BIORREMEDIACION-DE-HIDROCARBUROS-UTILIZANDO-CEPAS-ANTARTICAS-INA>
55. Hamza, U.; Mohammed, I.; Sale, A. (2012). Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation, 1 (3): 131-138. "Potentials of bacterial isolates in bioremediation of petroleum refinery wastewater".
56. Heider, J.; Spormann, A.; Beller, H.; Widdel, F. (1998). FEMS Microbiology Reviews. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. Vol. 22. No 5. 17-1. Pág. 459-473.
57. Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, P. (2007). Metodología de la Investigación. McGraw-Hill. Iztapalapa, D.F. México.

58. J. I. Medina-Bellver, P. Marín, A. Delgado et al., "Evidence for *in situ* crude oil biodegradation after the Prestige oil spill," *Environmental Microbiology*, vol. 7, no. 6, pp. 773–779, 2005.
59. Jain, R.; Kapur, M.; Labana, S.; Lal, B.; Sarma, P.; Bhattacharya, D.; Shekhar Thakur, I. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Current Science*, Vol. 89, No.1. 2005.
60. Jørgensen, A. (2005). Biotransformation of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene in the marine polychaete *Nereis virens*. Trabajo de titulación (Master thesis in Molecular biology and Environmental biology). Dinamarca: Roskilde University, Department of Life Sciences and Chemistry
61. Kiely, G. (1999). Ingeniería Ambiental. Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. McGraw-Hill. Interamericana de España, S.A.. Aravaca, Madrid.
62. La Grega, M. D.; Buckingham, P.L.; Evans, J.D.; ERM (2001). Hazardous Waste Management. McGraw-Hill. Boston, U.S.A.
63. Larkin, M.; Kulakov, L.; Allen, C. (2005). *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 282–290. "Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility". Northern Ireland, UK.
64. Leahy, J. G. y Colwell, R. R. (1990). *Microbial. Rev.* 54(3):305–315. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.
65. López de Uralde, J., (1998). "Demasiado Petróleo en el mar", Boletín Informativo de Greenpeace N°1.

66. Malatova, K. Isolation and Characterization of Hydrocarbon degrading bacteria from environmental habitats in Western New York State. Trabajo de titulación (Tesis de maestría en Ciencias Químicas). Rochester, NY: Rochester Institute of Technology, Department of Chemistry. 2005. 108 p.
67. Martínková, L.; Uhnáková, B.; Pátek, M.; Nešvera, J.; Křen, V. (2009). Environment International, volumen 35, paginas 162-177, "Biodegradation potential of the genus Rhodococcus".
68. Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez A., (2005). "Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos". Acta bioquímica clínica latinoamericana, volumen 39, La Plata.
69. Medina-Bellver, J.I.; Marín, P.; Delgado, A. "Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill," Environmental Microbiology, vol. 7, no. 6, pp. 773–779, 2005.
70. Mehrasbi, MR.; Haghghi, B.; Shariat, M.; Naseri, S.; Naddafi, K. (2003). Iranian J Publ Health, 32 (3): 28-32. "Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Soil". Iran.
71. Merli, G., Ricciuti, N. (2009) "Microbiología de las aguas residuales. Aplicación de Biosólidos en Suelo".
72. Metcalf & Eddy. Wastewater Engineering. Treatment, Disposal and Reuse. 3rd. ed. United States of America: McGraw-Hill Inc., 1991. 1134 p.
73. Mihelcic J.; Zimmerman, J. Ingeniería Ambiental. Fundamentos, Sustentabilidad y Diseño. Alfaomega, 2011. 729p.

74. Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L. (2004) "Levels of PAHs in soil and vegetation samples from Tarragona Country, Spain". Environmental Pollution.
75. Neff, J.M. (1979). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment- sources, fates and biological effects". Applied Science Publishers, Ltd. Londres.
76. Nievas, M.L. (2006). Diseño, simulación y optimización de un reactor biológico para el tratamiento de efluentes orgánicos provenientes de sentinas de buques. Tesis Doctoral en Ingeniería Química. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
77. Nievas, M.L., Commendatore, M.G., Esteves J.L.; Bucalá, V. (2006). Cinética de Biodegradación de Hidrocarburos de Residuos de Sentina de Buques utilizando un Consorcio Microbiano Autóctono.
78. OMS, Organización Mundial de la Salud (2003). "Polynuclear aromatic hydrocarbons in drinking-water". Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra (Suiza).
79. Ortega, M. (2010). Tesis de postgrado. "Remoción de hidrocarburos en efluentes de una planta de tratamiento de aguas petrolizadas". Maracaibo, Venezuela.
80. Pérez, N.; Marañón, A.; Bermúdez, R. C.; Aguilera, I.; Cumbá, F.; Abalos, A. (2004). Revista Cubana de Química 16 (1): 53-60. "Caracterización de las aguas residuales de la refinería "Hermanos Díaz"".

81. Pozo, A., Optimización de la operación de un reactor aeróbico de biopelícula bacteriana inmovilizada: incidencia de los nutrientes en la biosíntesis de Polihidroxialcanoato (PHA) como producto del tratamiento de efluentes de celulosa Kraft. Trabajo de titulación (Magister en Ciencias mención Microbiología). Chile: Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. 2009. 56 p.
82. Procedimientos Simplificados para el Examen de Aguas, 1978, OMS.
83. Rodriguez L., (2004), Revista Digital Educación y Sociedad. "Efectos perjudiciales de los compuestos aromáticos sobre el medio ambiente". Año 2, Número 4. Disponible en: <http://www.revistaedusoc.rimed.cu/index.php/2-4-art%C3%ADculos/efectos-perjudiciales-de-los-compuestos-arom%C3%A1ticos-sobre-el-medio-ambiente>
84. Salinas, R., Cram, S., Sommer, I. (2012). Universidad y Ciencia, 28 (2): 131-144 "Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos de la llanura aluvial baja del estado de Tabasco, México". Villahermosa.
85. Sánchez, N., Sandoval AH, Díaz-Corrales F, Serrano JA. (2013), Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, "El género Rhodococcus. Una revisión didáctica".
86. Sawyer and McCarty: Chemistry for Environmental Engineering, third edition, McGraw-Hill Book Company, Nueva York, 1978.
87. SEMPLE, K.T. y col., 2001. Impact of Composting Strategies on the Treatment of Soils Contaminated with Organic Pollutants. EE.UU., 112, 269-283P.

88. Sims, J.; Suflita, J.; Russell, H. (1991). EPA Ground Water Issue, 540: 4-90. "Reductive Dehalogenation of Organic Contaminants in Soils and Ground Water". EUA.
89. Solano-Serena, F. Marchal, R. Vandecasteele, J.P. (2001). Oil and Gas Science and Technology 56, 479-498. "Biodegradation of Gasoline in the Environment: From Overall Assessment to the Case of Recalcitrant Hydrocarbons".
90. Song, H.-G. y Bartha, R. (1990). Appl. Environ. Microbiol. 56(3):646-651. "Bioremediation potencial of terrestrial fuel spills".
91. Soriano, J. (2009) "Evaluación y seguimiento del contenido en Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en Mejillón Silvestre de la costa de Galicia y cantábrico, antes y después del vertido del b/t prestige", Tesis Doctoral en química, Universidad de Coruña, España.
92. T. M. April, J. M. Foght, and R. S. Currah, "Hydrocarbondegrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 46, no. 1, pp. 38–49, 2000.
93. Ukiwe, L.; Egereonu, U.; Njoku, P.; Nwoko, C.; Allinor, J. (2013). International Journal of Chemistry. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Degradation Techniques: A Review. Vol. 5. No.4. 17-9. Pág. 43-55.
94. Uzoekwe, S.; Oghosanine, F. (2011). Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management 4 (2): 107-116. "The effect of refinery and petrochemical effluent on water quality of Ubeji Creek Warri, Southern Nigeria".

95. Van Hamme, J. D., Singh, A. y Ward, O. P. 2003. *Microbiology Molecular Biotechnology*. Rev. 67(4):503-549. "Recent Advances in petroleum Microbiology".
96. Vasudevan, N. y Rajaram, P. (2001). "Bioremediation of soil sludge-contaminated soil". *Environment International*, Volumen 26.
97. Vecchioli, G. I., Del Panno, M. T. and Panceira, M. T. (1990). *Environmental Pollution* 67, 249-258. "Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil".
98. Vives, I., Grimalt, J. O., Guitart, R., (2001). "Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana". *Asociación para el Avance de la Ciencia y la Tecnología en España (AACTE)*.
99. Wetler-Tonini, R. M. C.; Rezende, C. E.; Grativol, A. D. (2011), *Revista virtual de Química* 3 (2), 78-87 "Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados".
100. Widada, J.; Nojiri, H.; Omori, T. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* (60):45–59, 2002.
101. Widdel, F.; Rabus, R. (2001). *Current Opinion in Biotechnology*. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Vol. 12, No 3, 1-6 2001, Pag. 259–276.
102. World Health Organization (WHO). *Air Quality Guidelines for Europe* [En línea]. WHO regional publications. European series; No. 91. Copenhagen. 2010. Disponible en:

http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf.

103. Yanine, H. F. (2010). Tesis de Maestría. "Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos Otún y la Vieja". Universidad Nacional de Colombia.
104. Zamora, A., Ramos J. y Arias M., (2012). "Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana". Bioagro, volumen 24.
105. Zaror, C. (1999). Proyecto de Docencia 94-150. Introducción a la Ingeniería Ambiental. Universidad de Concepción. Proyecto de Desarrollo de la Docencia. Chile.
106. ZoBell, C.E. (1946). Bacteriol Rev. 10: 1-49. "Actions of microorganisms on hydrocarbons".

CAPÍTULO IX. ANEXOS.

ANEXO 6. Resultados.

Anexo 6.1. Resultados. Escenario 1.

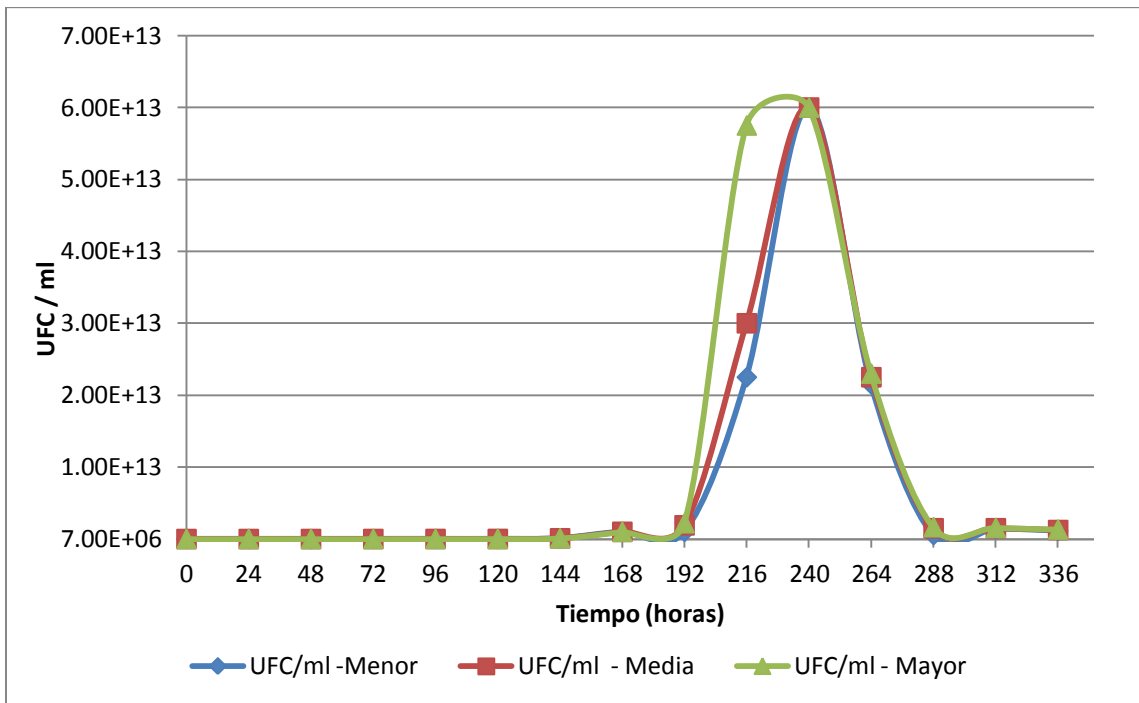
Anexo 6.1.1 Tabla promedio de medición de parámetros en la entrada.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/l) | Sólidos totales disueltos |
|----------------|------------------|------|------------|---------------------------|
| 0 | 26,57 | 7,02 | 1300 | 6,858 |
| 24 | 23,30 | 6,99 | | 6,932 |
| 48 | 24,21 | 7,07 | | 6,943 |
| 72 | 26,72 | 6,72 | | 6,945 |
| 96 | 26,50 | 6,51 | | 7,013 |
| 120 | 28,21 | 6,37 | | 7,029 |
| 144 | 26,24 | 6,34 | | 6,759 |
| 168 | 24,97 | 6,37 | 1340 | 7,269 |
| 192 | 26,60 | 6,35 | | 7,279 |
| 216 | 27,36 | 6,36 | | 7,291 |
| 240 | 25,34 | 6,88 | | 10,59 |
| 264 | 27,76 | 6,85 | | 10,62 |
| 288 | 26,68 | 6,88 | | 12,43 |
| 312 | 26,68 | 6,80 | | 12,43 |

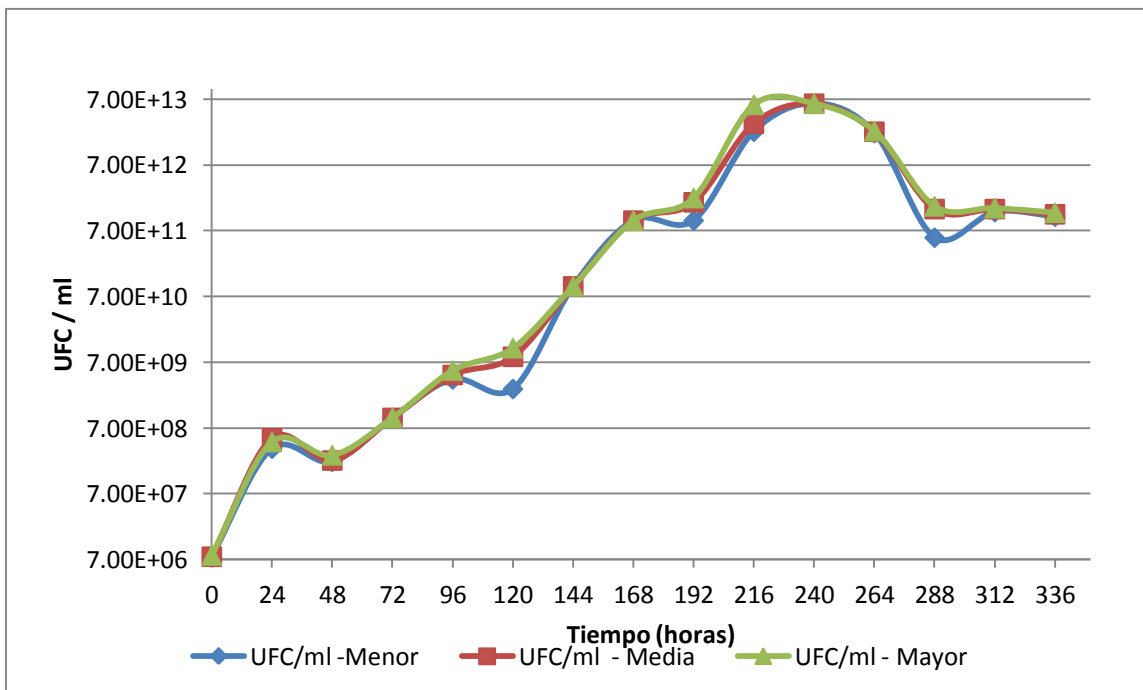
Anexo 6.1.2. Tabla promedio de medición de parámetros en el reactor.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/l) | DBO ₅ (mg/L) | Sólidos suspendidos (mg/l) | Sólidos disueltos (mg/l) | Sólidos totales (mg/l) | Sólidos fijos (mg/l) | Sólidos volátiles (mg/l) |
|----------------|------------------|------|------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|
| 0 | 24,33 | 7,04 | 1480 | 950 | 50 | 6,853 | 7640 | 7520 | 120 |
| 24 | 24,24 | 6,93 | 1050 | | 70 | 6,944 | | | |
| 48 | 23,52 | 6,84 | 1160 | 800 | 83 | 6,827 | | | |
| 72 | 24,44 | 6,77 | 1080 | | 78 | 6,904 | | | |
| 96 | 26,32 | 6,72 | 1350 | | 64 | 6,790 | 7100 | 6880 | 220 |
| 120 | 25,11 | 6,84 | 1050 | | 39 | 6,871 | | | |
| 144 | 23,66 | 6,82 | 1190 | | 36 | 6,831 | 7426,6 | 7186 | 240,6 |
| 168 | 23,55 | 6,82 | 1130 | 800 | 38 | 6,729 | 7720 | 7480,7 | 239,3 |
| 192 | 23,81 | 6,83 | 1310 | | 29 | 6,812 | | | |
| 216 | 23,78 | 6,80 | 1340 | 720 | 30 | 6,860 | 7180 | 6854 | 326 |
| 240 | 23,57 | 6,71 | 1560 | | 30 | 7,135 | | | |
| 264 | 25,06 | 6,70 | 1780 | | 28 | 7,865 | | | |
| 288 | 23,79 | 6,77 | 1800 | | 48 | 8,803 | | | |
| 312 | 23,74 | 6,72 | 1910 | 1466 | 48 | 9,639 | | | |

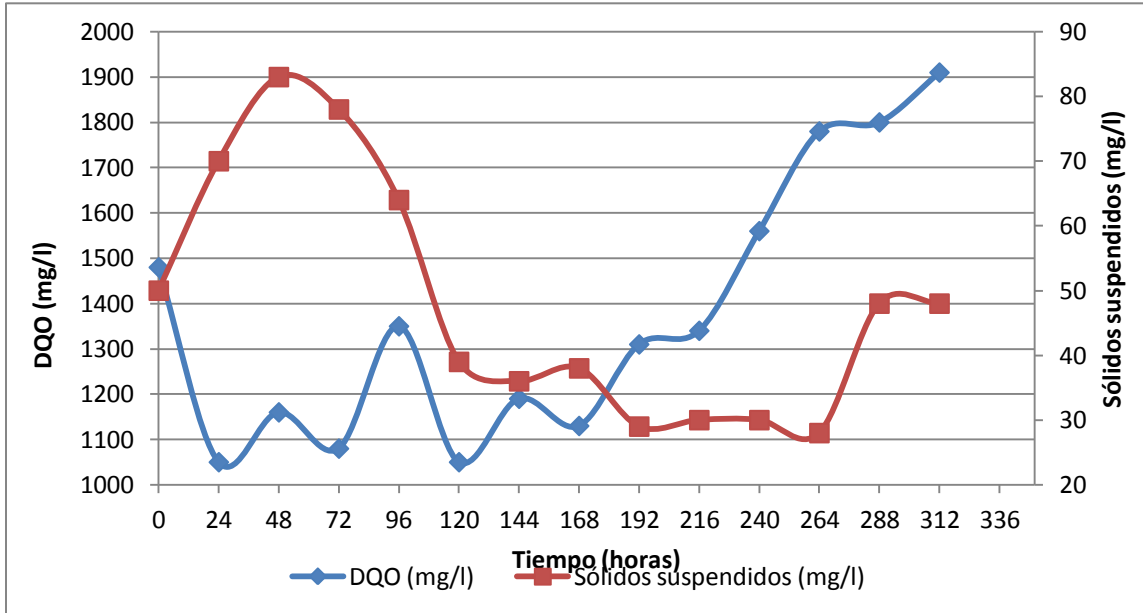
Anexo 6.1.3. Gráfico de crecimiento bacteriano de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. Escenario 1.



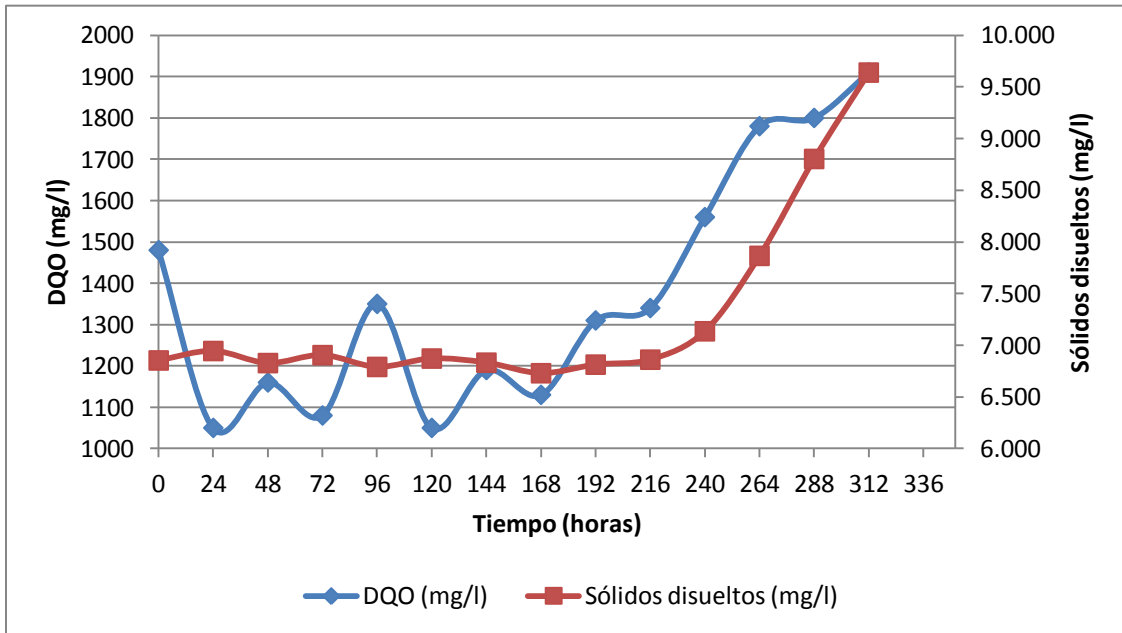
Anexo 6.1.4. Gráfica logarítmica de crecimiento bacteriano de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. Escenario 1.



Anexo 6.1.5 Gráfico de sólidos suspendidos vs la DQO del reactor. Escenario 1.



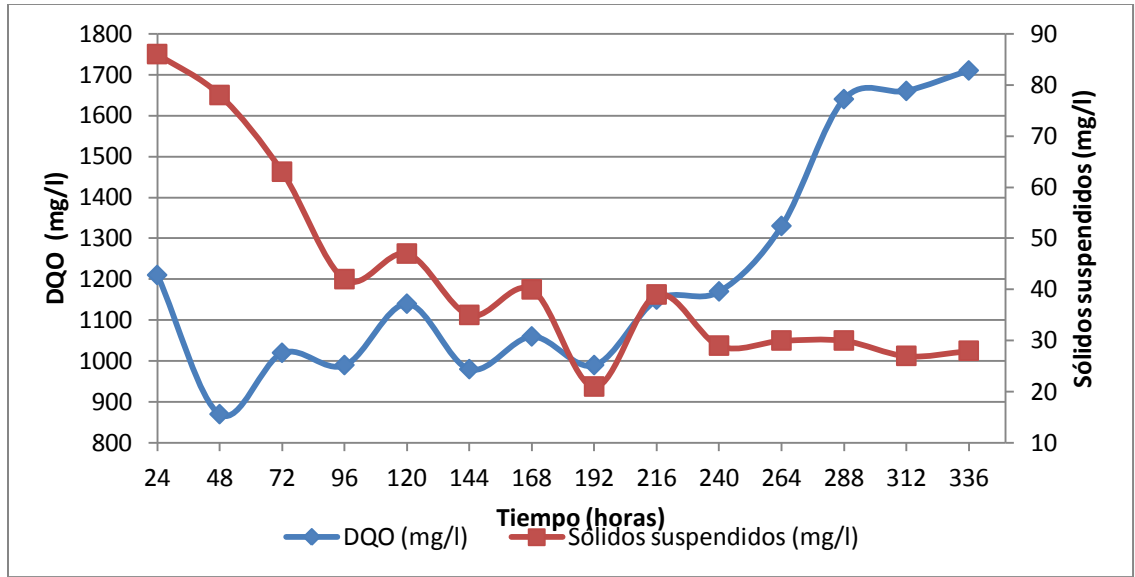
Anexo 6.1.6. Gráfico de la DQO y Sólidos Disueltos del reactor. Escenario 1.



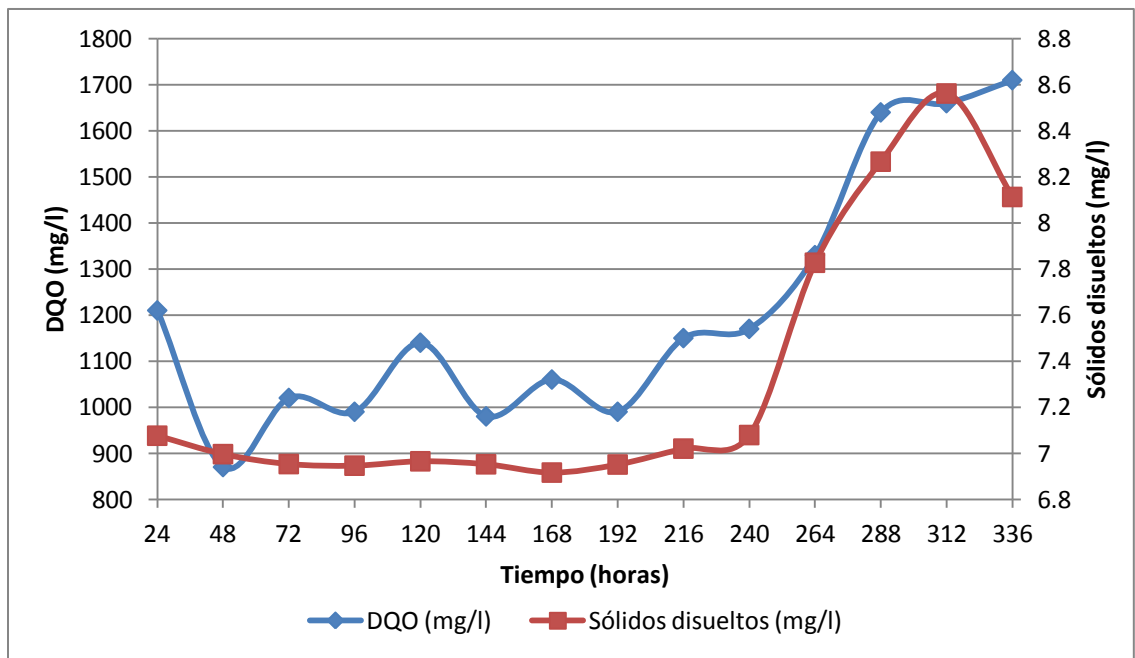
Anexo 6.1.7. Tabla promedio de medición de parámetros en la salida.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/l) | DBO ₅ (mg/L) | Sólidos suspendidos (mg/l) | Sólidos disueltos (mg/l) | Sólidos totales (mg/l) | Sólidos fijos (mg/l) | Sólidos volátiles (mg/l) |
|----------------|------------------|------|------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|
| 24 | 22,30 | 6,70 | 1210 | 820 | 86 | 7,076 | 7398 | 6850 | 548 |
| 48 | 23,49 | 6,58 | 870 | 740 | 78 | 6,996 | | | |
| 72 | 25,50 | 6,58 | 1020 | | 63 | 6,953 | 7320 | 6700 | 620 |
| 96 | 24,08 | 6,72 | 990 | | 42 | 6,946 | | | |
| 120 | 22,96 | 6,78 | 1140 | | 47 | 6,965 | | | |
| 144 | 22,88 | 6,78 | 980 | 700 | 35 | 6,952 | | | |
| 168 | 22,56 | 6,76 | 1060 | | 40 | 6,916 | 7760 | 6460 | 1300 |
| 192 | 22,68 | 6,75 | 990 | 520 | 21 | 6,951 | 7740 | 6510 | 1230 |
| 216 | 22,61 | 6,67 | 1150 | | 39 | 7,020 | | | |
| 240 | 24,03 | 6,56 | 1170 | | 29 | 7,079 | 7450 | 6200 | 1250 |
| 264 | 22,45 | 6,73 | 1330 | | 30 | 7,827 | | | |
| 288 | 22,94 | 6,62 | 1640 | | 30 | 8,266 | | | |
| 312 | 23,09 | 6,60 | 1660 | 966,66 | 27 | 8,562 | | | |
| 336 | 22,30 | 6,66 | 1710 | 830 | 28 | 8,113 | | | |

Anexo 6.1.8. Gráfico de Sólidos Suspensos y DQO de la salida. Escenario 1.



Anexo 1.9 Gráfico de sólidos suspendidos de la salida. Escenario 1.



ANEXO 6.2. Resultados. Escenario 2.

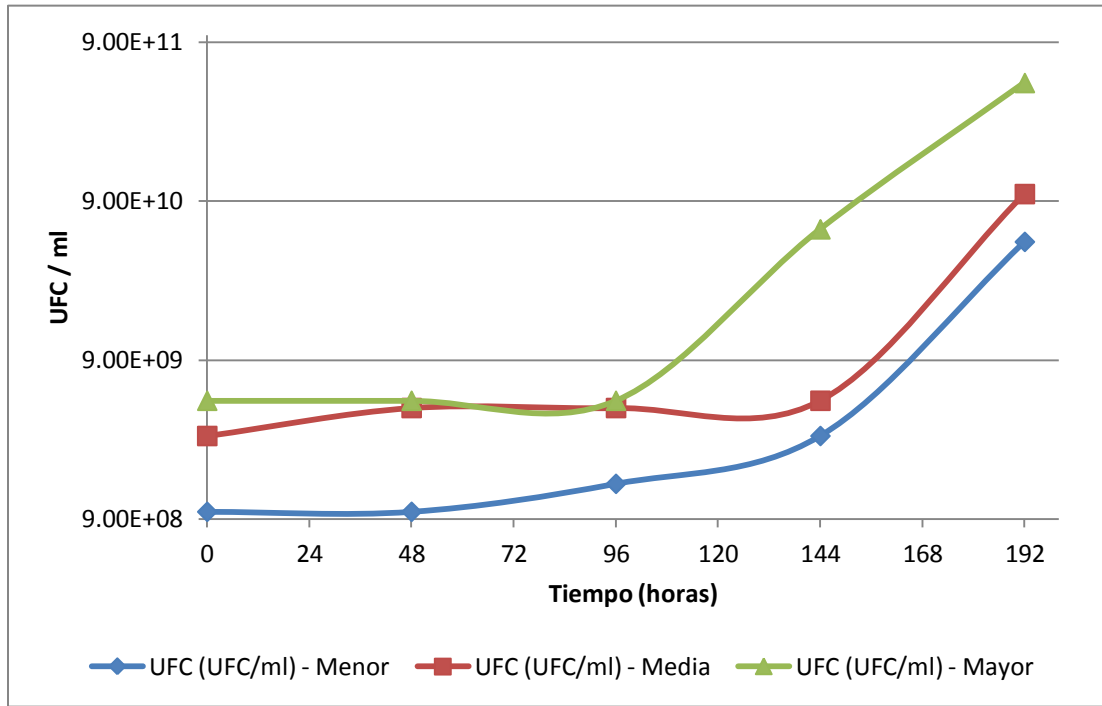
Anexo 6.2.1. Tabla promedio de medición de parámetros en la entrada.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) - Entrada | pH - Entrada | DQO (mg/l) - Entrada | Sólidos totales disueltos - Entrada | Sólidos suspendidos - Entrada |
|----------------|----------------------------|--------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 22,79 | 7,07 | 1280 | 6,909 | 3 |
| 48 | 26,01 | 7,02 | | 6,850 | 10 |
| 96 | 24,43 | 7,08 | | 6967 | 16 |
| 144 | 28,54 | 6,98 | 1260 | 6,984 | 9 |
| 192 | 24,03 | 7,09 | 1250 | 6,958 | 6 |

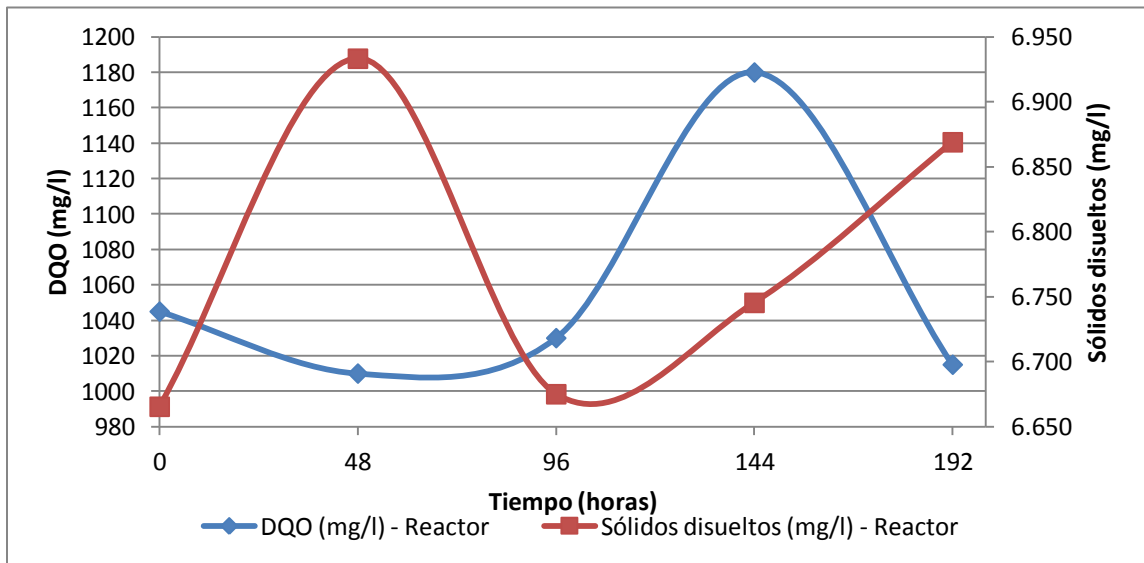
Anexo 6.2.2. Tabla promedio de medición de parámetros en el reactor.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) - Reactor | pH - Reactor | DQO (mg/l) - Reactor | DBO ₅ (mg/L) - Reactor | Sólidos suspendidos (mg/l) - Reactor | Sólidos totales disueltos (mg/l) - Reactor | Sólidos totales (mg/l) - Reactor | Sólidos fijos (mg/l) - Reactor | Sólidos volátiles (mg/l) - Reactor |
|----------------|----------------------------|--------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 0 | 25,31 | 7,05 | 1045 | 640 | 20 | 6,665 | 7906 | 6998 | 908 |
| 48 | 24,82 | 6,90 | 1010 | 662,5 | 53 | 6,933 | 7822 | 6970 | 852 |
| 96 | 23,90 | 6,76 | 1030 | 655 | 53 | 6,675 | 7222 | 5522 | 1700 |
| 144 | 26,85 | 6,82 | 1180 | 642 | 36 | 6,745 | 6990 | 5460 | 1530 |
| 192 | 24,05 | 6,85 | 1015 | 587 | 27 | 6,869 | 7220 | 5330 | 1890 |

Anexo 6.2.3. Gráfica logarítmica de crecimiento bacteriano de la cepa *Rhodococcus equi* en el reactor. Escenario 2.



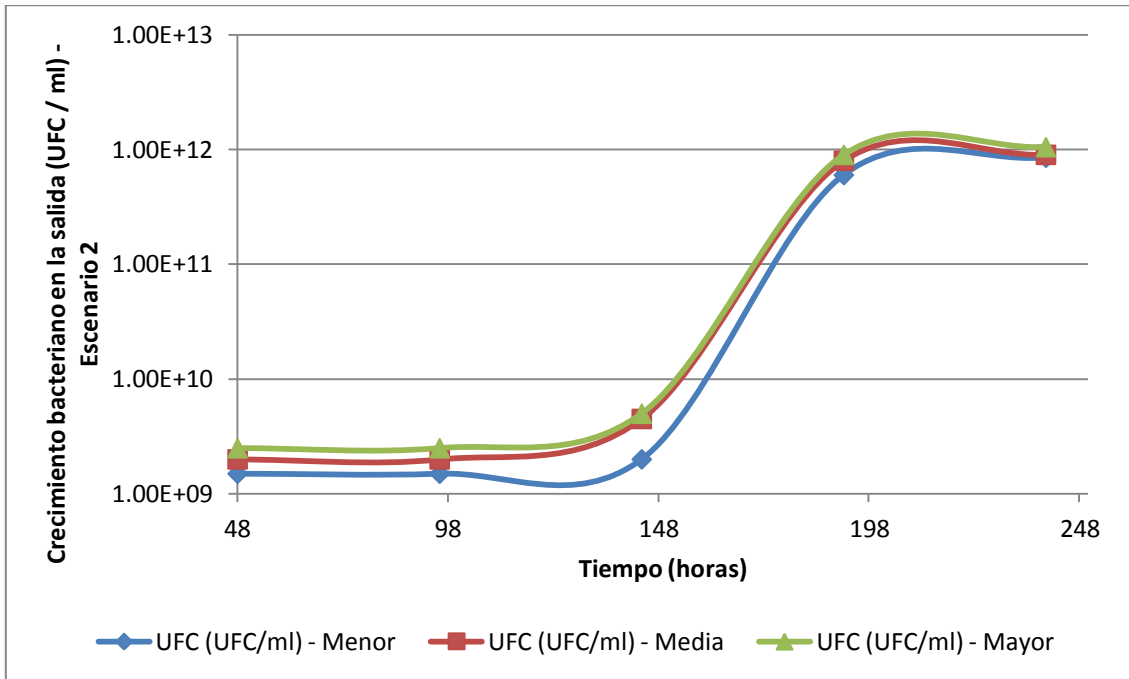
Anexo 6.2.4. Gráfico de sólidos disueltos del reactor. Escenario 2.



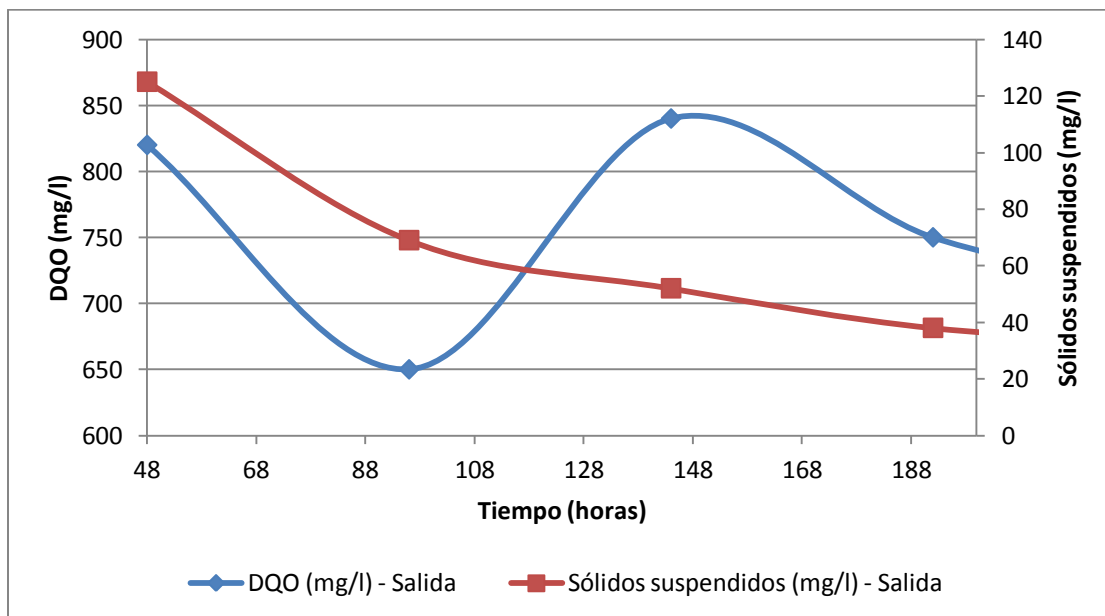
Anexo 6.2.5. Tabla promedio de medición de parámetros en la salida.

| Tiempo (horas) | Temperatura (°C) | pH | DQO (mg/l) | DBO ₅ (mg/L) | Sólidos suspendidos (mg/l) | Sólidos disueltos (mg/l) | Sólidos totales (mg/l) | Sólidos fijos (mg/l) | Sólidos volátiles (mg/l) |
|----------------|------------------|------|------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|
| 48 | 24,1 | 6,71 | 820 | 225 | 125 | 7,009 | 7534 | 6966,6 | 567,4 |
| 96 | 23,64 | 6,72 | 650 | 224 | 69 | 6,986 | 7226 | 5538 | 1888 |
| 144 | 25,55 | 6,64 | 840 | 350 | 52 | 6,967 | 7014 | 5138 | 1876 |
| 192 | 23,37 | 6,72 | 750 | 460 | 38 | 6,978 | 7306 | 5424 | 1882 |
| 240 | 19,87 | 6,83 | 710 | 475 | 33 | 6,943 | 7534 | 5648 | 1886 |

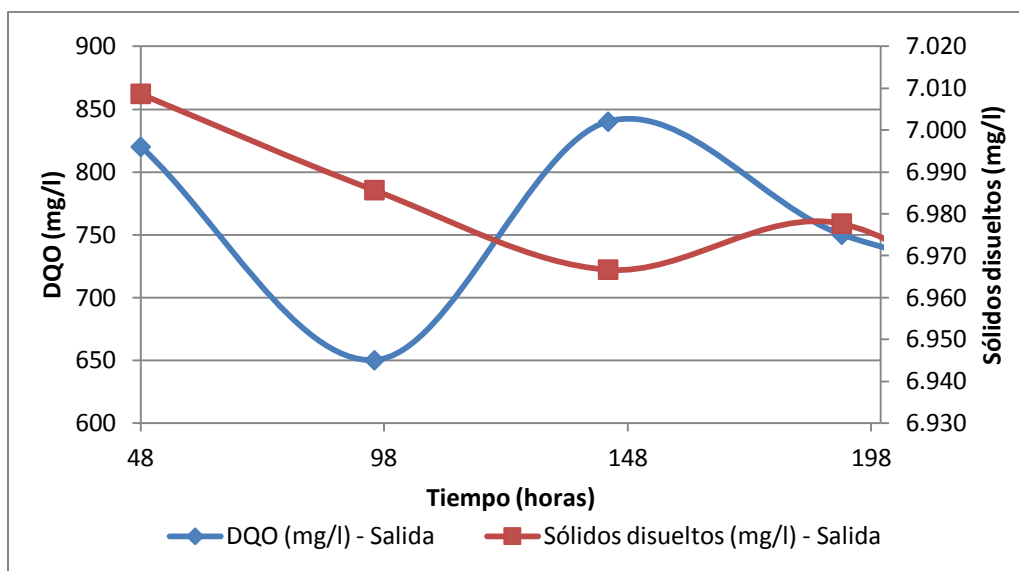
Anexo 6.2.6. Gráfica logarítmica de crecimiento bacteriano de la cepa *Rhodococcus equi* en la salida. Escenario 2.



Anexo 6.2.7. Gráfico de sólidos suspendidos de la salida. Escenario 2.

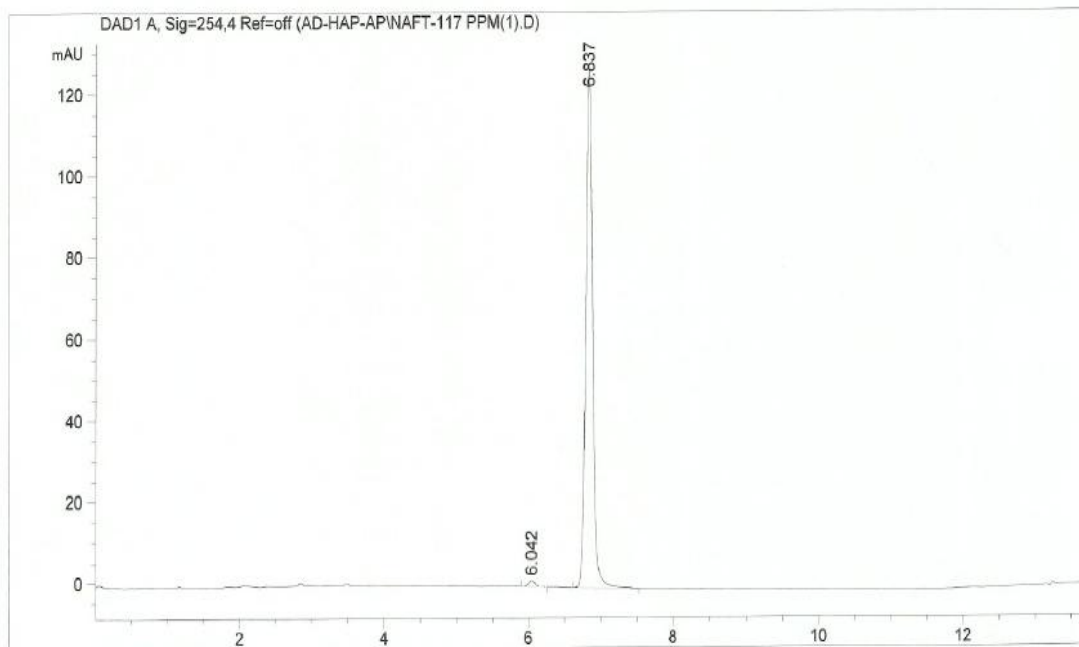


Anexo 6.2.8. Gráfico de sólidos disueltos de la salida. Escenario 2.

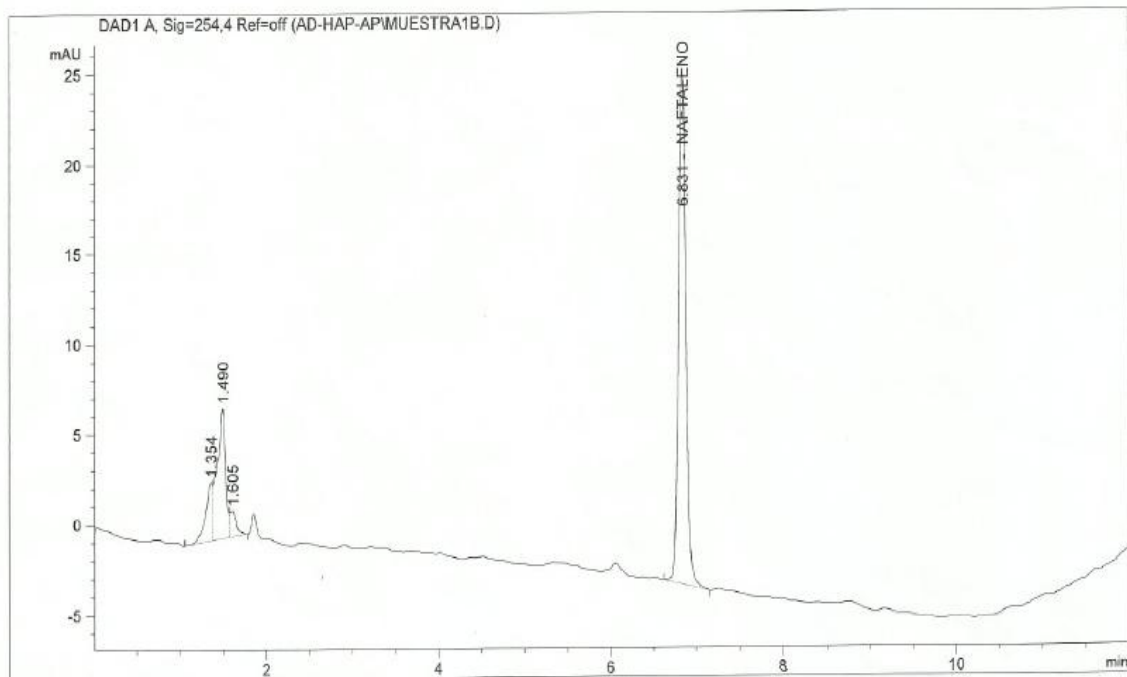


Anexo 6.3. Cromatogramas.

Anexo 6.3.1. Cromatograma del Naftaleno y n-Hexano (Blanco).



Anexo 6.3.2. Cromatograma de Naftaleno con medio artificial.



Anexo 6.3.3. Cromatograma de Naftaleno con medio artificial y bacterias.

