



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD AZCAPOTZALCO

Ciencias Básicas e Ingeniería

“Estudio de la biodegradabilidad de mezclas de compuestos fenólicos alquil-sustituidos bajo condiciones de metanogénesis”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS E INGENIERÍA
AMBIENTALES**

PRESENTA

I.A. Miguel Angel Meza Vudoyra

Asesora (UAM-A): Dra. Clementina Rita Ramírez Cortina

Co asesora (IMP): M. En B. Laura del C. Puig Grajales

RESUMEN

Se investigó el efecto del *orto* y *meta*-cresol sobre la biodegradabilidad del fenol y *para*-cresol, utilizando lodo granular metanogénico adaptado. Se utilizaron dos reactores continuos tipo UASB y botellas serológicas en las que se determinó la velocidad de degradación individual y en mezcla de estos compuestos *alquil*-fenólicos.

A una carga orgánica de 3 kg DQO/m³ d y una relación 2:1 (fenol : cresol), la eficiencia de remoción de una mezcla fenol/*para*-cresol no se afectó por la presencia del isómero *orto*. Este último se removió hasta en un 70% ya que al seguir la misma ruta de degradación que el fenol, compite con él. No fue indispensable adicionar extracto de levadura para lograr la remoción de *orto*-cresol ya que se degradó al 60% sin este sustrato, aunque no se alcanzó una fase estable.

En otro reactor con una mezcla terciaria de fenol / cresoles (2:1) y una carga orgánica de 3 kg DQO/m³ d, el *meta*-cresol fue removido con una eficiencia del 30%, sin tampoco alcanzarse una fase estable. Su presencia afectó la remoción de fenol y se alcanzó una fase estable en el reactor después un período de adaptación de 60 días, alcanzando una eficiencia del 95%. Esto posiblemente se debe a que sus rutas de degradación convergen en el 4-hidroxibenzoato (**4-OH Bz**), metabolito que impide la subsecuente degradación del *m*-cresol. La biodegradación del *para*-cresol no se vio afectada. El mismo inóculo fue capaz de remover completamente cada compuesto de esta mezcla, a una relación 1:1 y una carga orgánica de 2 kg DQO/m³ d. En una mezcla cuaternaria, agregando *orto*-cresol y conservando la misma carga orgánica, se logró la remoción al 100% de los tres primeros compuestos. La remoción del *orto*-cresol alcanzó una eficiencia del 65% y 70% la de DQO, lo que demuestra que se puede tratar anaeróbicamente y bajo condiciones de metanogénesis, una mezcla cuaternaria de fenol y los tres isómeros de cresol.

En pruebas por lotes, el fenol se degradó a una velocidad específica mayor que el *para*-cresol, ambos sin fase de retardo, lo que confirma que es más fácil de degradar el fenol que el fenol sustituido. La presencia de *orto*-cresol disminuyó en un 36% en la velocidad de degradación de fenol y en un 80% del *para*-cresol en mezcla. El lodo granular no fue capaz de degradar individualmente el *orto* ni el *meta*-cresol a 132 mg/L después de 17 días de incubación a 30°C, posiblemente debido a la ausencia de fenol y *para*-cresol, que pueden tener papel de cosustratos.

ABSTRACT

Was investigated the effect of *ortho*-cresol and *metha*-cresol on the phenol and *para*-cresol biodegradability, using an adapted granular methanogenic sludge. The experiments were made with continuous reactors (UASB) and a group of serologic bottles (batch systems) where the biodegradation rate of phenolic compounds was measured.

Feeding an organic load of 3 kg DQO/m³ d, with a 2:1 phenol -cresol ratio, the removal rate of phenol and *para*-cresol was not affected by the presence of *ortho*-cresol, which was removed in a 70%, possibly due to a competence with phenol, because both compounds continue the same via of biodegradation. In the same way, was not indispensable the addition of yeast extract to achieve a removal rate from the 60% of *ortho*-cresol; nevertheless a steady state phase was not reached.

In the other reactor, feeding a tertiary mixture composed of phenol, *para* and *metha*-cresols with an organic load of 3 kg DQO/m³d, the *metha* isomer reach a removal rate of 30% without an appreciable stable phase. The presence of this isomer affects the biodegradation rate of phenol. This fact is possibly due to a convergence of the two compounds biodegradation routes in 4 hidroxibenzoato. This last compound inhibits the subsequent biodegradation of *metha*-cresol. Phenol reached a removal rate of 95% and *para*-cresol removal rate was not affected. This inoculum was capable of a total removal of the mixture of phenol, *para* and *metha*-cresol at a 1:1 phenol-cresol ratio, and an organic load of 21 kg DQO/m³ d. Feeding a quaternary mixture by adding 88 mg/L of *ortho*-cresol, the first three compounds was completely removed. *Ortho*-cresol reaches an average removal rate of 65% and the global elimination efficiency was of 70% (DQO). This fact demonstrate the capability of biodegrade a quaternary mixture composed by phenol and the three cresol isomers, at methanogenic conditions.

In batch systems, phenol reached a specific biodegradation rate greater than *para*-cresol, both of them without an appreciable lag phase. The presence of *ortho*-cresol in the phenol and *para*-cresol mixture, diminishes the elimination rates at 36% and 80%, respectively. The granular sludge was not capable to remove *ortho* and *metha*-cresol as a sole carbon and energy source, possibly due to the absence of phenol and *para*-cresol, which can play an instigator role.

DEDICATORIA

Dedico el trabajo de esta tesis a todas las personas que amo, que están y han estado conmigo en cada momento de mi vida. Quizás sea innecesario (a la vez que es difícil) enumerar a todas y cada una de ellas:

A mi amada y bella Paola.

A mis queridos, admirados y siempre recordados padres: Carlos y Ofelia.

A mis muy entrañablemente queridos hermanos: Marco, Luis, Carlos y Laura.

A mis amigos y compañeros de la preparatoria y universidad.

A mi familia Meza y familia Vudoyra.

A la familia que me ha tomado como uno de los suyos y que yo he tomado también como mía, a los Perlasca Ruz: Rocío, José Luis, Pamela y Pepe.

A todos aquellos que siempre han creído en mi capacidad.

A todos mis amigos y compañeros de generación, así como a mis amigos y compañeros de la PROFECO.

Esta tesis también está dedicada a todo aquel que la consulte, con la esperanza que sea un documento útil que pueda brindar un poco de conocimiento, y me disculpo por cualquier omisión que haya hecho. Así mismo espero que sirva de ejemplo para mostrar que si bien el trabajo que involucra una tesis es arduo y difícil, no es imposible. Es únicamente cuestión de perseverancia, constancia y nunca perder de vista el objetivo principal: Hacer lo que se quiere siempre de la mejor manera.

AGRADECIMIENTOS

A la M. en B. Laura Puig Grajales, asesora en el Instituto Mexicano del Petróleo: por todo el apoyo y atenciones que tuvo conmigo durante mi estancia en el Instituto y la paciencia de leer tantas y tantas veces los intentos que se aproximaron cada vez más a esta tesis

A la Dra. Clementina Ramírez, asesora en la Universidad Autónoma Metropolitana: por sus consejos.

A la Dra. Mabel Vaca y M. José Antonio Barrios por el tiempo que invirtieron en la revisión de este documento y la retroalimentación para mejorarlo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana y su comité de estudios de posgrado en la Maestría en Ciencias e Ingeniería Ambiental: por la oportunidad de estudiar esta maestría.

A todos los profesores: por sus conocimientos compartidos.

A todos mis compañeros de generación: por los buenos momentos compartidos.

A los compañeros del Instituto Mexicano del Petróleo y en particular al departamento de Biotecnología del Petróleo: por el compañerismo y cálido trato de parte todos con quienes compartí las instalaciones.

A los compañeros de producción en la Procuraduría Federal del Consumidor: por la disponibilidad y flexibilidad que siempre ha habido para fijar los horarios de grabación

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: por el financiamiento otorgado.



Agradecimientos especiales al programa de becas del Instituto Mexicano del petróleo y al financiamiento de los proyectos de investigación:

IMP-D.00021

CONACYT-31537-B

FIES-98-90-VI

CONTENIDO

	PÁGINA
Resumen	ii
Abstract	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Agradecimientos IMP.....	vi
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Notación	xi
1. Introducción y Objetivos	1
2. Marco Teórico	5
2.1 Digestión anaerobia.	6
2.1.1 Requerimientos fisicoquímicos y nutricionales	10
2.2 Aplicaciones de la digestión anaerobia en el tratamiento de agua residual a nivel industrial	13
2.3 Tipos de reactores anaerobios	16
2.3.1 Reactor de lecho fluidizado	17
2.3.2 Reactor de flujo ascendente y lecho de lodos UASB	17
2.3.3 Reactor de lecho expandido EGSB.....	20
2.4 Compuestos <i>alquil</i>-fenólicos	21
2.4.1 Toxicidad	22
2.4.2 Biodegradabilidad	23
2.4.3 Mecanismos de remoción de los compuestos fenólicos.	30
2.4.3.1 Mecanismos de degradación del fenol.....	31
2.4.3.2 Mecanismos de degradación del <i>orto</i>-cresol	33
2.4.3.3 Mecanismos de degradación del <i>para</i>-cresol.....	35
2.4.3.4 Mecanismos de degradación del <i>meta</i>-cresol.....	36
3 Metodología	38
3.1 Sistemas continuos	39
3.1.1 Reactor A.....	42
3.1.2 Reactor B	43
3.2 Sistemas en lotes	44

3.3	Técnicas analíticas	46
3.3.1	Mediciones en los reactores	46
3.3.2	Métodos cromatográficos	47
3.3.2.1	Compuestos fenólicos	47
3.3.2.2	Metano en los sistemas en lote	49
4.	Resultados y discusiones	52
4.1	Sistemas continuos	53
4.1.1	Reactor A	53
4.1.2	Reactor B	62
4.2	Sistemas en lotes (batch)	70
4.2.1	Compuestos fenólicos	70
4.2.2	Metano	74
5.	Conclusiones	77
6.	Referencias	81
ANEXOS		89

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1	Organismos Metanogénicos	8
Tabla 2.2	Parámetros de control de un reactor anaerobio...	13
Tabla 2.3	Ventajas y desventajas del tratamiento anaerobio	15
Tabla 2.4	Comparación entre los sistemas aerobio y anaerobio	15
Tabla 2.5	Comparación del reactor UASB, respecto a otros sistemas anaerobios	20
Tabla 2.6	Propiedades fisicoquímicas del fenol e isómeros del cresol	21
Tabla 2.7	Constantes de inhibición del fenol y compuestos alquil-sustituídos hacia las bacterias metanogénicas acetoclastas	23
Tabla 2.8	Resumen de experimentos de remoción del fenol e isómeros del cresol	25
Tabla 2.9	Resultados de pruebas de biodegradabilidad en lote	26
Tabla 3.1	Composición del medio mineral alimentado a los sistemas continuos	42
Tabla 3.2	Etapas de operación del reactor A	43
Tabla 3.3	Etapas de operación del reactor B	44
Tabla 3.4	Tratamientos en las pruebas de biodegradabilidad	45
Tabla 3.5	Técnicas analíticas de los parámetros cuantificados en los sistemas ...	46
Tabla 3.6	Constantes de transformación en metano	47
Tabla 3.7	Condiciones para la determinación de compuestos fenólicos en el cromatógrafo HP6890 en los sistemas continuos	48
Tabla 3.8	Condiciones para la determinación de compuestos fenólicos en el cromatógrafo HP6890 en las pruebas por lote	48
Tabla 3.9	Tiempos de retención de los CAF según el método ...	49
Tabla 3.10	Condiciones para la cuantificación del metano de las pruebas en lote	50
Tabla 3.11	Resumen estadístico de las curvas de calibración	51
Tabla 4.1	Resumen de los resultados obtenidos al operar el reactor A, por etapas	54
Tabla 4.2	Resumen de los resultados obtenidos al operar el reactor B, por etapas	63
Tabla 4.3	Velocidades de degradación de los compuestos <i>alquil</i> -fenólicos	72
Tabla 4.4	Velocidades de producción específica de metano, por tratamiento	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Etapas que integran el proceso de digestión anaerobia	9
Figura 2.2	Diagrama de un reactor UASB	18
Figura 2.3	Moléculas de fenol y los tres isómeros de cresol	21
Figura 2.4	Primer paso del mecanismo de la biodegradación del fenol	31
Figura 2.5	Reacciones que llevan a cabo dos especies de <i>Clostridium</i>	32
Figura 2.6	Representación esquemática de la degradación del 4-OHBz	33
Figura 2.7	Representación esquemática de la degradación del <i>o</i> -cresol	34
Figura 2.8	Representación esquemática de la degradación del <i>p</i> -cresol	35
Figura 2.9	Representación esquemática de la degradación del <i>m</i> -cresol	37
Figura 3.1	Diagrama del plan de experimentos, de acuerdo a los objetivos ...	40
Figura 3.2	Fotografía del reactor UASB utilizado en este estudio	41
Figura 3.3	Cromatograma de la determinación de CAF	49
Figura 4.1	Efecto del <i>orto</i> -cresol en la biodegradabilidad del fenol y <i>para</i> -cresol	55
Figura 4.2	Efecto del extracto de levadura en la remoción de <i>orto</i> -cresol	60
Figura 4.3	Efecto del <i>m</i> -cresol en la biodegradabilidad de fenol y <i>p</i> -cresol	65
Figura 4.4	Biodegradabilidad de una mezcla cuaternaria	69
Figura 4.5	Pruebas de biodegradabilidad en lotes	71

NOTACIÓN

AC	Reactor de contacto anaerobio.
AME	Actividad metanogénica específica.
ATP	Adenosín trifosfato
C.	Género <i>Clostridium</i>
DQO	Demanda química de oxígeno
DSSF	Reactor de biopelícula estacionaria fija, con flujo descendente.
EGSB	Reactor de lecho expandido con flujo ascendente.
FB	Reactor de lecho fluidizado.
GyA	Grasas y aceites.
4-OHBz	4-Hidroxibenzoato
IC ₅₀	Concentración que inhibe el 50% de la actividad.
IC ₁₀₀	Concentración que inhibe el 100% de la actividad.
Log P	Coefficiente de partición octanol/agua
<i>m</i> -	<i>meta</i>
Ntot	Nitrógeno total.
<i>o</i> -	<i>orto</i>
<i>p</i> -	<i>para</i>
pH	(-log [H ⁺]).
pK _a	Constante de disociación
R1	Reactor 1.
R2	Reactor 2.
REDOX	Potencial de óxido-reducción (indicativo de presencia o ausencia de O ₂ .)
SST	Sólidos suspendidos totales.
SSV	Sólidos suspendidos volátiles (medida de la cantidad de biomasa.)
T	Temperatura.
TRH	Tiempo de retención hidráulica.
UAF	Filtro anaerobio de flujo ascendente.
UASB	Reactor de flujo ascendente con lecho de lodos.
VEB	Velocidad específica de biodegradación.

CAPÍTULO I

Introducción

y

Objetivos

1. Introducción y objetivos

El fenol y los compuestos *alquil*-fenólicos están presentes en las descargas de algunas industrias químicas, específicamente aquellas en las que se producen resinas para adhesivos, antioxidantes, explosivos, herbicidas, químicos fotográficos, etc. Estos compuestos también pueden estar presentes en altas concentraciones en corrientes de agua residual provenientes de refinerías y complejos petroquímicos. Estas corrientes residuales son el resultado de la utilización del agua durante el procesamiento de las materias primas.

Actualmente, tanto en el ámbito nacional como internacional, las industrias química y petroquímica se encuentran sometidas a controles muy estrictos en sus corrientes de descarga debido a que al integrarse estas corrientes a cuerpos de agua pueden exhibir una elevada toxicidad hacia los organismos vivos, pudiendo dañar a la población acuática en general y en ocasiones, eliminarla completamente a lo largo de muchos kilómetros corriente abajo de la descarga. El destino de un compuesto liberado al ambiente depende de una variedad de factores físicos y bioquímicos, incluyendo su estructura química (aromaticidad o alifaticidad, naturaleza del grupo funcional, etc.), características de adsorción, volatilidad, carácter iónico, solubilidad y disponibilidad de aceptores finales de electrones en el medio. Colectivamente estos factores pueden afectar la biodegradabilidad y toxicidad de un compuesto (O'Connor y Young, 1996). La toxicidad de estas descargas se debe a la presencia de compuestos como hidrocarburos lineales, aromáticos y poliaromáticos, que se sabe inhiben la actividad biológica y son potencialmente tóxicos y carcinogénicos (Klivanov *et al.*), 1980; Donlon *et al.*, 1995).

En México, debido a los procesos de transformación de materias primas en la industria del petróleo, el consumo de agua durante 1999 fue de 262.9 millones de metros cúbicos. El 60% de este volumen se consumió y el resto se liberó como agua residual. En términos de insumo unitario, en la actualidad se utilizan 0.87 metros cúbicos de agua por tonelada producida o procesada (PEMEX, 2001). Las corrientes de agua residual que se generan en las plantas refinadoras del petróleo son diversas y tienen como característica principal la complejidad de su composición debido a las fracciones orgánicas e inorgánicas que la conforman. Este tipo de corrientes puede tener un pH entre 12 y 13, sales de sodio de ácidos neutralizados, como el fórmico, acético, benzoico, sulfuros, bisulfuros, mercaptano, ácidos nafténicos, carbonatos, amonio y compuestos fenólicos. Éstos últimos se encuentran en un intervalo de concentración

que puede ir de 2 a 10 g/L, donde la mayor proporción corresponde a fenol aunque, también en menor concentración, se encuentran compuestos *alquil*-sustituidos tales como cresoles, xilenoles y etilfenoles. Los sistemas de tratamiento convencionales para este tipo de efluente son la regeneración química (oxidación, neutralización), disposición en pozos, incineración, oxidación húmeda a temperaturas que van desde 150°C hasta 315° C y presiones de 10 bar a 207 bar .

El tratamiento biológico más utilizado actualmente en la depuración de aguas residuales industriales, es el proceso de lodos activados. Este tratamiento tiene como principales desventajas que requiere de grandes reactores y genera importantes cantidades de lodos, que deben ser estabilizados para su disposición final. Para mejorar las plantas de tratamiento existentes, es recomendable dividir las descargas y tratar los efluentes en subunidades específicas donde los contaminantes estén más concentrados y tengan volúmenes más pequeños. Desde esta perspectiva, un proceso anaerobio podría ser una alternativa interesante porque utiliza tanques de volúmenes comparativamente más pequeños debido a que tolera altas cargas orgánicas, lo que hace su construcción menos costosa, produce menor cantidad de lodos que los procesos aerobios y utiliza menos energía que los sistemas aerobios, haciendo su operación más económica (Charest *et al.*, 1999).

Se han hecho estudios acerca del tratamiento anaerobio de descargas residuales con elevadas concentraciones de compuestos fenólicos. Por citar un ejemplo, Charest *et al.* (1999) concluyen que la población microbiana mixta con la cual han llevado a cabo sus investigaciones y que está adaptada a fenol y *orto*-cresol, es capaz de tratar eficientemente los compuestos fenólicos del efluente de una planta petroquímica, degradando el 97% del fenol y 83% de compuestos fenólicos, aunque es necesario adicionar peptona en el tratamiento.

En este trabajo se estudió la aplicación de la digestión anaerobia metanogénica para la remoción de compuestos *alquil*-fenólicos, utilizando un inóculo adaptado a fenol y *para*-cresol, con el fin de participar en la búsqueda de soluciones al problema de la contaminación ambiental que representan las aguas residuales complejas ricas en compuestos fenólicos.

El fenol y *para*-cresol son compuestos que en condiciones anaerobias se degradan más fácilmente que los isómeros *orto* y *meta*-cresol (O'Connor y Young, 1996). Fang y Zhou (2000) demostraron que es posible la remoción del 93% de la DQO en una mezcla de fenol y *para*-cresol a una relación 3:1, bajo condiciones de metanogénesis y empleando una carga orgánica

de 4.3 kg / (m³ d) en reactores UASB. Aparentemente la capacidad de degradar estos dos compuestos es universal para cualquier lodo granular, independientemente de su origen (Razo-Flores *et al.*, 1996) debido que están involucrados en las rutas metabólicas de degradación del aminoácido tirosina (Evans y Fuchs, 1988). Los isómeros *orto* y *meta*-cresol son los más persistentes, aunque se reporta su degradación bajo condiciones muy específicas o bien mediante probables mecanismos de cometabolismo (Bisaillon *et al.*, 1991, Fang y Zhou, 1997). Desde esta perspectiva se plantea la hipótesis de que en condiciones de metanogénesis la biodegradabilidad del fenol y *para*-cresol no se vea afectada por la inclusión de un tercer compuesto, *orto*- y *meta*-cresol, y que a su vez el fenol y *para*-cresol jueguen un papel de inductores en la degradación de los isómeros *orto*- y *meta*-cresol en mezclas terciarias y cuaternarias.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es evaluar la biodegradabilidad de compuestos fenólicos, en sistemas continuos y en lotes, bajo condiciones de metanogénesis, utilizando diversas mezclas.

Los objetivos específicos fueron evaluar, en reactores del tipo UASB:

- El efecto del *orto*-cresol sobre la mineralización del fenol y *para*-cresol.
- El efecto del *meta*-cresol sobre la mineralización del fenol y *para*-cresol.
- La biodegradabilidad de una mezcla cuaternaria de fenol, *para*, *meta* y *orto*-cresol.
- El efecto de la falta de extracto de levadura en la degradación del *orto*-cresol

Así como también determinar las velocidades específicas de biodegradación de los compuestos *alquil*-fenólicos estudiados mediante experimentos en lotes.

CAPÍTULO 2

Marco Teórico

2. Marco teórico

Para entender la finalidad de este estudio, es necesario primero aclarar cómo ocurren los procesos de transformación que se ven involucrados en la digestión anaerobia metanogénica. Para ello, este capítulo presenta una visión general de las etapas en que se desarrolla la digestión anaerobia metanogénica, las características fisicoquímicas que es necesario mantener en el medio para que el proceso se lleve a cabo de manera eficiente, así como una revisión general sobre las poblaciones microbianas que intervienen en cada etapa, y algunas relaciones estequiométricas.

La utilización de reactores anaerobios en el tratamiento de aguas residuales municipales y de algunas industrias específicas no es algo novedoso, por ello se presenta también un resumen de los tipos de efluente que en la actualidad se tratan mediante esta tecnología, una descripción de los reactores más utilizados, así como una comparación entre este tratamiento y el sistema biológico aerobio utilizado tradicionalmente.

Finalmente, se hace un recuento de algunos trabajos que se han realizado en lo referente al tema de la biodegradación de compuestos alquil-fenólicos. Se estudian por un lado, las características físicas que hacen tóxicos y recalcitrantes a estos compuestos y por otro las rutas metabólicas que presuntamente siguen durante su biodegradación.

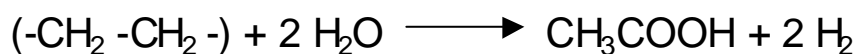
2.1 Digestión anaerobia metanogénica

La conversión de materia orgánica compleja en metano y dióxido de carbono (biogás) es la más pobre reacción microbiana exergónica conocida, en el sentido que produce una muy limitada cantidad de energía comparada con otros procesos aerobios y anaerobios. El proceso de metanogénesis es la ruta de degradación primaria de la materia orgánica y solamente ocurre cuando no se encuentra presente en los ambientes anóxicos algún aceptor de electrones más eficiente como sulfato, nitrato o alguna forma metálica oxidada. Dado que los microorganismos obtienen una muy pequeña cantidad de energía de la degradación metanogénica, el metano, que es el producto final, aún retiene una gran cantidad de la energía disponible. Debido a la

capacidad de producir metano sin la necesidad de un gran gasto energético (por ejemplo de aireación), el uso de las reacciones metanogénicas proporcionan a la biotecnología una alternativa atractiva, no solo para evitar costos en el tratamiento, sino también para recuperar energía de los desechos orgánicos. (Sekiguchi *et al.*, 2001; Speece, 1996)

En el tratamiento anaerobio, los consorcios microbianos activos llevan a cabo un complejo proceso que engloba muchas clases de bacterias y muchos procesos intermedios. Si se trata de compuestos orgánicos complejos como proteínas, carbohidratos y lípidos, primero deben ser hidrolizados a compuestos orgánicos más simples como aminoácidos, péptidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga mediante enzimas extracelulares (tales como celulasas, amilasas, proteasas y lipasas). Después estos compuestos serán fermentados a una variedad de compuestos orgánicos, principalmente ácidos grasos volátiles, CO₂, H₂, ácido láctico y etanol. A esta última etapa también se le llama acidogénesis (Wise, 1987; Sekiguchi *et al.*, 2001; Speece, 1996)

Los ácidos grasos volátiles con más de dos carbonos como el propionato, butirato, etc. formados durante la fermentación se oxidan a acetato, dióxido de carbono e hidrógeno, que son los sustratos para las bacterias metanogénicas. Los organismos que llevan a cabo esta oxidación se les llama “acetógenos” u “organismos protón-reductores obligados”. Esta conversión solamente es posible si la presión parcial del hidrógeno se mantiene a niveles suficientemente bajos, que se logra debido a que este gas es consumido por los organismos metanógenos o sulfatorreductores. La degradación de los ácidos grasos de cadena larga se da mediante la de la ruta de la β-oxidación (Wise, 1987) :



A este nivel también existe una etapa de homoacetogénesis, que es la producción directa de acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono (Sekiguchi *et al.*, 2001).

La última etapa es la formación de metano. De hecho, se lleva a cabo en dos diferentes tipos de reacciones: en la primera, el CO₂ e hidrógeno se transforman en metano y agua, en la otra, el acetato se convierte en metano y CO₂. (Wise, 1987) Se han aislado entre 20 y 30 especies de metanógenos, morfológicamente diferentes y el mecanismo de generación de adenosín

trifosfato (ATP) no está aún del todo claro. Solo se conocen dos géneros de metanógenos que usan acetato como fuente de energía: *Methanosarcina* y *Methanotherix*. Las especies halladas en digestores son *Methanosarcina barkeri*, *M. Mazei* y *Methanotherix soehngenii*. En la tabla 2.1 se enumeran algunas de las especies de metanógenos aislados (Wise, 1987).

Tabla 2.1 Organismos metanogénicos
(Wise, 1987)

Organismo	Sustrato
<i>Metanobacterium formicicum</i>	H ₂ /CO ₂ , HCOOH
<i>M. bryantii</i>	H ₂ /CO ₂
<i>M. thermoautotrophicum</i>	H ₂ /CO ₂
<i>M. ruminantium</i>	H ₂ /CO ₂
<i>M. arboriphilus</i>	H ₂ /CO ₂
<i>M. hungatei</i>	H ₂ /CO ₂ , HCOOH
<i>Methanobacterium soehngenii</i> (<i>Methanotherix</i>)	CH ₃ COOH, H ₂ /CO ₂ , CH ₃ OH metilaminas
<i>Methanosarcina barkeri</i>	CH ₃ COOH
<i>Methanoplasma elizabethii</i>	H ₂ /CO ₂

Si se suministran sustratos orgánicos complejos, aproximadamente el 70% del metano se produce por la descomposición del acetato y 30% por la reducción del dióxido de carbono con hidrógeno (Boone, 1982). Aunque a la fecha se han aislado y descrito una gran cantidad de microorganismos metanógenos, la mayoría de los estudios basados en resultados de análisis de clonación 16S rDNA sugieren que las bacterias metanógenas dominantes en los reactores se limitan a *Methanobacterium*, *Methanothermobacter* (propriadamente *Methanobacterium*), *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*, y *Methanosaeta* (propriadamente *Methanotherix*). Dejando de lado la significativa importancia de los organismos sintróficos, se sabe muy poco acerca de sus posiciones taxonómicas, diversidad y fisiología, principalmente debido a la dificultad de aislarlos.

La secuencia completa de reacciones se pueden considerar como una cadena alimenticia microbiana donde los productos excretados por alguna especie, son asimilados por otro grupo microbiano. Esto da como resultado la formación de colonias mixtas.

Mediante análisis estructurales en comunidades microbianas de lodos anaerobios, se ha revelado la presencia de muchas *archaea* metanogénicas, bacterias sintróficas, sulfato-reductoras, heterotróficas y poblaciones aún desconocidas. Dentro de los biogránulos se encuentran microcolonias de diferentes organismos, formando una arquitectura bien organizada en la que llevan a cabo transferencias interespecies de hidrógeno y sustratos. De esta manera, un organismo sintrófico que oxida el propionato forma microcolonias que son rodeadas por metanógenos hidrogenotróficos y su proximidad hace energéticamente posible la oxidación del propionato mediante la transferencia interespecies de hidrógeno. (Sekiguchi *et al.*, 2001)

Las diferentes etapas de la digestión anaerobia, así como el porcentaje de materia orgánica involucrado en la producción de biogas se muestran en la figura 2.1 (Speece, 1996).

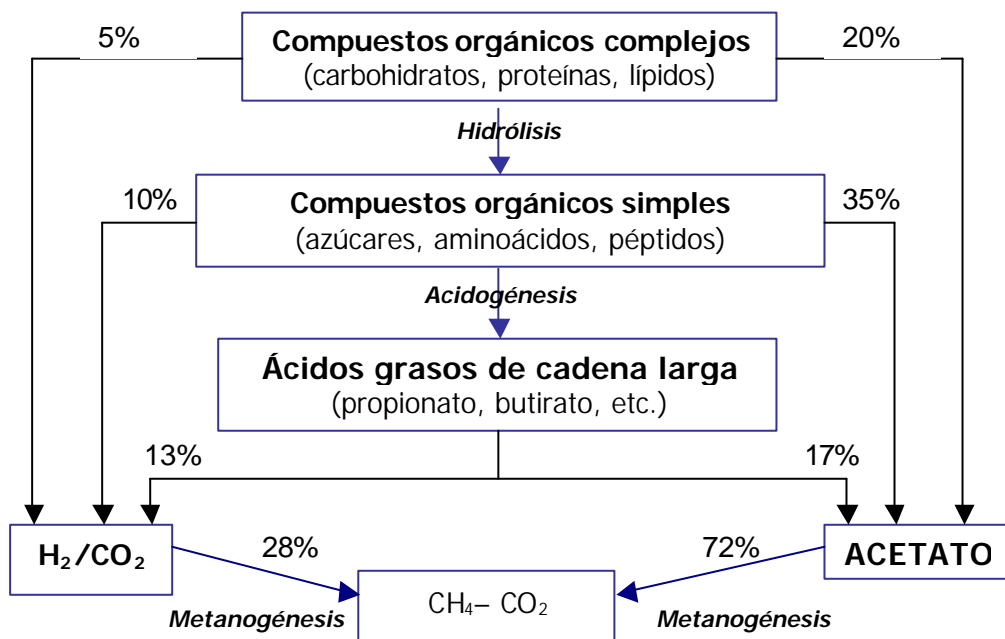


Figura 2.1 Etapas que integran el proceso de digestión anaerobia.
(Speece, 1996)

La degradación metanogénica de sustratos complejos involucra al menos tres grupos tróficos de anaerobios: heterótrofos fermentativos, sintróficos protón-reductores y *archaea*

metanogénicas. Aunque esta clasificación es un tanto simple, cada grupo abarca diversos microorganismos que siguen a su vez diferentes rutas metabólicas. Un hecho que distingue a los organismos anaerobios de los aerobios es que las diferentes especies degradan un compuesto orgánico interactivamente, compartiendo así la energía y fuente de carbono, en lo que se llama metabolismo en serie. La asociación sintrófica entre los microorganismos que oxidan los ácidos grasos, los metanógenos consumidores de hidrógeno y los metanógenos consumidores de acetato, representa solo un ejemplo de cómo las comunidades metanógenas utilizan estas interacciones. Sin esta cadena alimenticia la oxidación de ácidos grasos no puede ocurrir porque el primer paso de esta reacción es endergónico si no se acopla con las reacciones que consumen hidrógeno y acetato. En particular, el hidrógeno es el intermediario más importante, ya que las reacciones de utilización de éste hacen posible la reacción entera. De los intermediarios producidos durante la degradación anaerobia en reactores, los más importantes son, además del hidrógeno, el butirato, propionato y acetato (Sekiguchi *et al.*, 2001)

El paso más lento en la cadena de degradación se caracteriza por una acumulación de sustrato y los miembros más lentos de las poblaciones mixtas o consorcios son ocasionalmente las bacterias que utilizan ácidos propiónico o acético, de manera que una acumulación de estos ácidos orgánicos puede agotar la reserva de alcalinidad del bicarbonato, haciendo disminuir el pH; lo que puede afectar adversamente al consorcio entero. Para agravar la situación, una inhibición ocasionada por un bajo pH puede afectar a estos mismos grupos bacterianos (Sekiguchi *et al.*, 2001 ; Speece, 1996)

2.1.1 Requerimientos fisicoquímicos y nutricionales

Los procesos de tratamiento microbiológico requieren de macronutrientes como sustratos orgánicos, es decir, una fuente de carbono y energía para llevar a cabo el crecimiento y las transformaciones bioquímicas. Además de éstos, algunos microorganismos requieren algunos nutrientes especiales para su metabolismo, crecimiento y actividad. Debe mantenerse la concentración de nutrientes y elementos traza a un nivel adecuado para lograr el crecimiento, ya que algunos componentes, a elevadas concentraciones, lejos de ser estimulantes, son inhibitorios. (Singh *et al.*, 2001)

Debido a su lenta velocidad de crecimiento y bajo rendimiento energético, las bacterias anaerobias son muy sensibles a las condiciones fisicoquímicas de su medio ambiente: pH, temperatura (T) y a cambios en la composición del medio como la presencia de sustancias nuevas, sean tóxicas o no, la concentración de la materia orgánica y la pérdida de nutrientes. Cualquier alteración en el medio ambiente puede originar un desequilibrio en el sistema cuya respuesta de adaptación sea tan lenta que no permita mantener la actividad biológica del reactor y lo lleve incluso al paro total, a consecuencia de que la población metanogénica sobreviviente llegue a ser demasiado pequeña. En estas condiciones, la mejor manera de lograr nuevamente una digestión balanceada es, en ocasiones, inocular nuevamente el reactor (Monroy, 1992; Koster, 1989).

Un factor crucial en la operación de los procesos de digestión anaerobia es la tolerancia a la acidez de las bacterias fermentativas. En general, la actividad metanogénica cae drásticamente a niveles de pH inferiores a 6, siendo favorable un intervalo de entre 6.5 y 8.2. En condiciones de equilibrio las reacciones bioquímicas tienden a mantener el pH en el nivel adecuado, aunque las reacciones de acidogénesis, en sí, tienden a bajar los niveles de pH. Este efecto es, sin embargo, amortiguado por el bicarbonato y contrarrestado por la degradación de los ácidos formados (Speece, 1996).

En cuanto a la temperatura óptima, se reconocen tres intervalos correspondientes a bacterias metanogénicas mesófilas, cuya temperatura máxima es de 40°C y la óptima de 35°; termófilas, que crecen a temperaturas superiores a los 50°C y psicrófilas, que crecen a temperaturas inferiores a 20°C (Monroy, 1992).

Dado que la fórmula empírica de la biomasa es $C_5H_7O_2N P_{0.06} S_{0.1}$, además de los dos elementos requeridos para la biomasa aerobia (N y P) debe agregarse algún precursor de azufre, comúnmente en forma de sulfato. Debe destacarse que los sistemas anaerobios tienen un contenido de azufre significativamente más alto en su biomasa que las células aerobias, de manera que deben suministrarse concentraciones de 0.001 a 1.0 mg/L de azufre para un crecimiento y producción específica de metano óptimos (Speece, 1996)

Todos los microorganismos anaerobios requieren nitrógeno para su crecimiento ya sea en forma de nitratos, o sales de amonio. Los metanógenos utilizan el amoníaco como fuente de nitrógeno, que puede encontrarse a consecuencia de la hidrólisis de proteínas y aminoácidos.

A concentraciones de nitrógeno por debajo de 0.3 g/L, el crecimiento celular se reduce drásticamente, sin embargo, una elevada concentración (1 g/L) inhibe la granulación. El requerimiento de nitrógeno es de 3-6 kg N/1000 kg DQO consumido ó 0.5-1 kg/60 m³ de metano producido (Singh *et al.*, 2001).

Como el nitrógeno, el fósforo también es un nutriente esencial para el crecimiento y mantenimiento celular. Es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos. La cantidad de fósforo requerida es cerca del 2.2% del peso de los sólidos volátiles celulares (\approx 20% de los requerimientos de nitrógeno). Expresado como una relación DQO/N/P los requerimientos para reactores con alta carga son de 350/7/1, aunque para cargas ligeras es de 1000/7/1. Se ha notado que para prevenir una disminución en la actividad de la biomasa, la concentración de nitrógeno amoniacal en el reactor debe mantenerse en el rango de 40 a 70 mg/L (Singh *et al.*, 2001; Speece, 1996).

En lo que se refiere a micronutrientes, aparentemente se requieren mayores cantidades de fierro, respecto a otros metales traza como cobalto, níquel y zinc, que en algunos casos los reportan como estimulantes. También se usan como estimulantes metales como tungsteno, manganeso, molibdeno, selenio y boro (Speece, 1996).

El extracto de levadura es una fuente rica en vitamina B y además contiene compuestos nitrogenados y carbonados. Se adiciona para favorecer el crecimiento celular y rara vez tiene efectos inhibitorios para los microorganismos anaerobios (Singh *et al.*, 2001).

La tabla 2.2 resume las principales parámetros a controlar en un reactor anaerobio, en condiciones de metanogénesis.

Tabla 2.2 Parámetros de control de un reactor anaerobio en condiciones de metanogénesis (Speece, 1996).

pH	6.5-8.5
T	20-40°C
N	3-6 kg N/1000 kg DQO 0.5-1 kg N/60 m ³ de metano
P	1/7 N
DQO/N/P	350 / 7 / 1
NH₄	40-70 mg/L
S	0.001 a 1.0 mg/L
Micronutrientes	Fe, Co, Ni, Zn
Estimulantes	W, Mn, Mo, Se, Bo

2.2 Aplicaciones de la digestión anaerobia en el tratamiento de agua residual a nivel industrial

Durante los últimos 20 años se ha ido considerando a la digestión anaerobia como una tecnología atractiva para el tratamiento de aguas residuales. Hoy en día existen al menos 1162 reactores anaerobios en el mundo (Franklin, 2001). De estos el 75% se trata efluentes provenientes de industrias alimentarias y relacionadas (panificación, cervecería, conservas, lácteos, destilería, procesamiento de pescado y de papa, maltería, confitería, cárnicos, bebidas, almidón, azúcar, vino y producción de levadura).

La construcción de digestores dirigido a los sectores químico y petroquímico aumentó de 2 a 4.4 reactores por año, entre 1990 y 1999. Al menos 63 digestores anaerobios (alrededor del 7.4% de los digestores del mundo) están tratando descargas de estos tipos de industrias (Macarie, 1999). En cuanto a procesos de alta tasa y hacia 1989, las primeras aplicaciones estuvieron basadas en la tecnología del filtro anaerobio, siendo en este último año el 63% de los reactores instalados. Durante el mismo período, solamente se construyeron dos reactores de flujo ascendente con lecho de lodos UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), mientras que en otros sectores industriales eran la principal tecnología. Entre 1993 y 1999, también se utilizaron un reactor de lecho expandido de lodos EGSB (*Expanded Granulated Sludge Bed*) y

otro de Lecho fluidizado. Su número tan reducido se debe probablemente al hecho de que esas tecnologías se comenzaron a comercializar hacia estas fechas (Macarie, 1999).

El uso de la digestión anaerobia para el tratamiento de agua residual comenzó en México después que en Europa o Norteamérica, de manera que el primer digester se construyó en 1987. Posteriormente, hacia 1991 se construían de uno a cuatro digestores por año y en 1992 se construyeron 16 reactores, lo que logró un crecimiento del 400 %. Durante los dos años siguientes, la tasa de construcción permaneció en 10 reactores/año, alcanzando un máximo de 19 en 1993. (Monroy, 2000).

En el 2000, en México se encontraban operando 85 reactores a gran escala. El volumen instalado total era de 228 551 m³ y se trataban 216 295 m³/d (2.5 m³/s) de agua residual y 592 toneladas de DQO/ día, lo que equivale a una población de 12.3 millones, considerando un consumo de 160 L/habitante diario y 300 mg de DQO/L. Esto representa apenas el 0.62% del volumen total de agua residual generada y 3.39% del agua tratada (5.5% de la industrial, 2.93% de la municipal). La mayoría de los efluentes industriales tratados por digestión anaerobia en México son típicos de esta tecnología alrededor del mundo (maltería, cervecería, lácteos, queso, bebidas, levaduras, papel, alimentos, papa, procesamiento de fruta y granjas porcícolas), predominando el sector de cervecería, que incluye al 25.4% de los reactores industriales. Es importante destacar su presencia en la industria química, mediante dos plantas tratando agua residuales con dimetiltereftalato y ácido tereftálico (Monroy, 2000).

Las ventajas y desventajas de el tratamiento anaerobio de aguas residuales se resumen en la tabla 2.3 (Seghezzo *et al.*, 1998).

Tabla 2.3 Ventajas y desventajas del tratamiento anaerobio
(Seghezzo *et al.*, 1998)

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Alta eficiencia • Construcción y operación relativamente simple. • Aplicable a pequeña o a gran escala. • Requiere de poca área superficial para localizar el reactor. • Consumo de energía despreciable: las operaciones de la planta se pueden hacer por gravedad y no se necesita calentar el afluente. • Muy baja producción de lodos. • Largos períodos de inanición. • Bajo requerimiento de nutrientes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los patógenos son parcialmente reducidos. • Largos períodos de arranque, cuando no se dispone de un buen inóculo. • Se produce sulfuro de hidrógeno, cuando hay elevadas concentraciones de sulfato en el afluente. • Se requiere un manejo adecuado del biogas para evitar malos olores. • Generalmente se requiere de un postratamiento del efluente para alcanzar los límites de descarga, en lo que se refiere a materia orgánica, nutrientes y patógenos.

La tabla 2.4 ofrece una comparación entre los sistemas aerobio y anaerobio, haciendo énfasis en el destino del carbono y la energía, los requerimientos nutricionales, remoción de patógenos y tiempo de arranque (Gijzen, 2001).

Tabla 2.4 Comparación entre los sistemas aerobio y anaerobio
(Gijzen, 2001)

Comparación	Aerobio	Anaerobio
Balance de Carbono	50-60% CO ₂ 40-50% Biomasa	95% Biogas 5% Biomasa
Balance de Energía	60% Biomasa 40% Pérdida en proceso	90% Metano 3-5% Calor 5-7% Biomasa
Requerimiento de energía	Alto debido a la aireación	No requiere energía
Nutrientes	Adición de nutrientes	Bajo requerimiento
Remoción de patógenos	Bajo	Bajo
Arranque	Cortos períodos	Largos períodos

2.3 Tipos de Reactores Anaerobios

Algunas características que inicialmente se consideraban como desventajas en los sistemas de tratamiento anaerobios, como por ejemplo la velocidad tan reducida con que aumenta su biomasa y la sensibilidad ante compuestos tóxicos, han dado pie al desarrollo de una nueva generación de reactores. En cierta medida, la primera de estas características es aún su principal desventaja cuando se requiere aumentar la biomasa. (Speece, 1996)

El problema de la baja velocidad de crecimiento se resolvió fijando la biomasa en soportes estáticos (Filtros anaerobios de flujo ascendente o **UAF** –*Upflow Anaerobic Filter*-, Reactores de biopelícula estacionaria con flujo descendente o **DSFF** –*Downflow Static Fixed Film*-), en movimiento (Reactores de lecho fluidizado o **FB** - *Fluidized bed*-) y escogiendo biomasa floculante con buena capacidad de sedimentación (Contacto anaerobio o **AC** -*Anaerobic Contact*-, Flujo ascendente con lecho de lodos o **UASB** - *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*- y Reactor de lecho expandido de lodos granulares **EGSB** -*Expanded Granular Sludge Bed*-). De esta manera, el tiempo de retención celular es independiente del hidráulico. (Monroy, 1992b; Speece, 1996)

La aplicación de la sedimentación por gravedad ha sido uno de los principales problemas a los que se han enfrentado los biorreactores anaerobios. Estos sedimentadores deben tener la capacidad de capturar la biomasa aún en condiciones de desequilibrio o emergencias en el arranque. A diferencia de su aplicación en el tratamiento aerobio, donde una baja eficiencia en el sedimentador solamente compromete la calidad del efluente, en un sistema anaerobio se ve comprometida la estabilidad del proceso ya que no es posible recuperar la biomasa con suficiente rapidez como para reponer la que se pierde. La alimentación de una carga hidráulica muy elevada también puede traer como consecuencia una pérdida de biomasa, aún la que está inmovilizada dentro del reactor. De este modo, la instalación de un componente para la captura de los sólidos a la salida del reactores una decisión prudente ya que es posible la pérdida masiva de biomasa durante arranque (Speece, 1996)

2.3.1 Reactor de Lecho fluidizado

En un reactor de lecho fluidizado, se utiliza un soporte al que se adhiere la biomasa, con lo que se retiene dentro del reactor y se dispone de mucha área específica. Este tipo de procesos tiene una elevada tasa de transferencia de masa y puede controlarse el espesor de la biopelícula. Los vehículos o *carriers* incluyen sustancias como arena, carbón, carbón activado granular, espuma de poliuretano reticular, arcilla quemada, cuentas de vidrio poroso, medio intercambiador de iones, y tierra de diatomeas. Tanto la arena como el carbón son probablemente los medios menos deseados por lo liso de la superficie y la gran energía que se requiere para su fluidización. Por otro lado, el carbón activado granular se ha demostrado que retiene de 3 a 10 veces más biomasa adherida que a arena, además que la pérdida de biomasa debido al esfuerzo cortante es de 6 a 20 veces menor ya que ofrece una superficie más irregular. Las partículas de soporte deben tener una distribución de tamaño uniforme, ya que de no ser así, las partículas pequeñas pueden ser evacuadas del reactor. Puede tener recirculación del efluente, con lo que el afluente se diluye y neutraliza, evitándose así choques tóxicos. Estos reactores soportan en mucho menor medida los períodos sin alimentación que otro tipo de reactores anaerobios (Noyola, 1992; Speece, 1996).

Los lechos fluidificados alcanzan las más altas cargas orgánicas volumétricas. Sus excelentes capacidades de transferencia de materia los hace adecuados para tratar efluentes muy diluidos o muy concentrados. Se le aplican cargas de diseño a escala real de entre 30 y 60 kg DQO/m³ d. Sin embargo, su arranque es lento y difícil, tiene elevados requerimientos energéticos debido a la fluidificación por bombeo (misma que debe ser permanente) y es complejo el control del proceso (Noyola, 1992).

2.3.2 Reactor de flujo ascendente y lecho de lodos UASB.

El reactor de flujo ascendente con lecho de lodos **UASB** -*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*- fue desarrollado a inicios de los años 70's. Su antecesor, por llamarlo de alguna manera, fue el llamado proceso anaerobio de contacto. También se desarrolló un sistema similar, llamado tanque biolítico, hacia 1910 (Seghezzeo *et al.*, 1989).

El concepto del UASB se basa en el establecimiento de una densa cama de lodos en el fondo del reactor, que es donde suceden todos los procesos biológicos. En los sistemas anaerobios ascendentes, y bajo ciertas condiciones, se ha observado que las bacterias se agregan de manera natural en flóculos o gránulos, evitándose, de esta manera el gasto del empaque que se requiere para otras configuraciones como el filtro anaerobio ascendente. Es esencial para la buena operación del reactor la formación y el mantenimiento de lodo con buenas características de sedimentación preferentemente en la forma granular. Estos agregados densos tienen buenas propiedades de sedimentación y no son susceptibles de salirse del reactor a las condiciones prácticas de operación. La figura 2.2 muestra la configuración típica de un reactor de este tipo en el que la cama de lodos se forma básicamente por la acumulación de los sólidos suspendidos que entran y por el crecimiento microbiano (Wise, 1987; Speece, 1996, Seghezzi *et al.*, 1998).

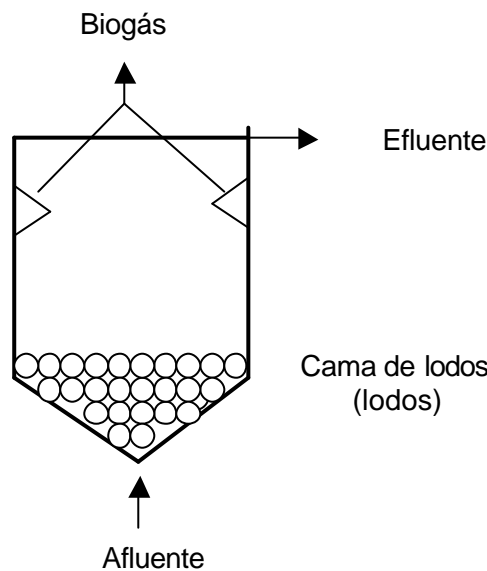


Figura 2.2 Diagrama del reactor UASB (Speece, 1996)

Los biogránulos tienen una característica distribución por capas bien definida: la superficie está poblada por bacterias hidrolíticas y fermentativas-acidógenas, la capa media se forma por bacterias sintróficas y la última o interna, por metanógenas acetotróficas (acetoclastas). Esto da una idea que los biogránulos no se forman por agregados al azar de células suspendidas,

sino que se van formando a través de un proceso de evolución, de modo que son menos vulnerables a cambios en la composición del medio porque la mayoría de las células dentro de los biogránulos se encuentran protegidas del exterior. Esto se comprueba del hecho que son más resistentes ante la toxicidad del sulfuro de hidrógeno, metales pesados y compuestos aromáticos que un lodo suspendido (Speece, 1996; Fang, 2000).

La retención de los lodos activos, granular o floculento, dentro del reactor permite llevar a cabo un buen tratamiento a elevadas cargas. La turbulencia natural causada por el flujo ascendente del afluente y la producción de biogas brinda buen contacto entre el agua y la biomasa. La cama de lodos tiene concentraciones de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) de entre 40 y 70 g/L, con velocidades de sedimentación de alrededor de 50 m/h. En la parte superior del lecho de lodos la concentración de SSV es de 10 a 30 g/L y en promedio se tiene, para todo el reactor, una concentración de entre 20 y 40 g SSV/L. Se recomienda que el afluente no tenga más 500 mg/L de Sólidos Suspendidos Totales (SST). La granulación se ve favorecida a cargas superiores a 0.6 kg DQO/kg SSV d. En el caso de aguas que tengan compuestos tóxicos o inhibidores en su composición se recomienda, primeramente, aclimatar los lodos, recircular el efluente para diluir la concentración del contaminante o bien, aplicarle un pretratamiento que disminuya su toxicidad. También debe evitarse la entrada de oxígeno en el agua (Seghezzi *et al.*, 1998; Noyola, 1992)

El reactor UASB puede sustituir al sedimentador primario, el digester de lodo anaerobio, el proceso aerobio (lodos activados, filtro percolador, etc.) y el sedimentador secundario de un sistema aerobio convencional en una planta de tratamiento. Sin embargo, es recomendable la instalación de un clarificador para evitar que se lave la biomasa del reactor, en un momento dado. Además se puede requerir de un tratamiento posterior con el fin de remover la materia orgánica remanente, los nutrientes y patógenos. Este postratamiento puede efectuarse en sistemas aerobios convencionales tales como las lagunas de estabilización, plantas de lodos activados y otros. En la tabla 2.5 se resumen las características que ofrecen ventajas y desventajas de utilizar el reactor UASB, respecto a otros sistemas anaerobios. (Monroy, 1992 b)

Tabla 2.5 Comparación del reactor UASB , respecto a otros sistemas anaerobios
(Monroy, 1992b)

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Soporta altas cargas (20 kg DQO/m³d) • Bajo requerimiento de energía • No requiere medio de soporte • Construcción relativamente simple • Con el inóculo adecuado puede arrancar de manera inmediata • Aplicable a pequeña y gran escala • Operación simple • Proceso ampliamente probado 	<ul style="list-style-type: none"> • La granulación es lenta y no necesariamente controlable. • No todas las aguas favorecen la granulación. • Requiere inóculo de determinadas características. • Sensible a aguas que forman precipitados • Riesgo de flotación de los gránulos durante re arranques. • Puede llegar a haber un mezclado deficiente

2.3.3 Reactor de lecho expandido EGSB.

El reactor EGSB, del inglés *Expanded Granular Sludge Bed*, es un reactor de configuración semejante al UASB, con la diferencia que es más alto, es decir que tiene una mayor relación altura/diámetro. Se opera con recirculación, lo que da como resultado una velocidad superficial de más de 4 m/h. Debido a la velocidad ascendente, la cama de lodos se expande y se logra un mejor contacto entre el lodo y el agua residual, usando eficientemente la totalidad del volumen del reactor, es decir, se eliminan las zonas muertas. Los contaminantes disueltos se eliminan de forma eficiente, pero no sucede lo mismo para los sólidos suspendidos, que no se remueven sustancialmente por la alta velocidad ascendente que se aplica. Comparado con el reactor UASB, puede recibir mayores cargas orgánicas, con lo que también la producción de metano es mayor, siendo mejor el mezclado dentro del reactor (Seghezzo *et al.*, 1998).

2.4 Compuestos *alquil*-fenólicos.

El fenol es un compuesto derivado del alquitrán de hulla que se descubrió en 1834 y se usó inicialmente para reducir el olor a putrefacción en el drenaje. Se obtiene de la destilación del alquitrán de hulla, aunque también se puede obtener mediante procesos de síntesis tales como la oxidación del cumeno (metil-etil-benceno), oxidación del tolueno, fusión del bencensulfonato de sodio con hidróxido de sodio o calentando el monoclorobenceno con hidróxido de sodio, bajo alta presión. La mayor parte del fenol producido se usa en la producción de resinas de policarbonato, aunque también se usa en explosivos, pinturas, tintas, perfumes, conservadores de madera (pentaclorofenol), textiles, fármacos como agente antibacteriano, antifúngico y como desinfectante. En medicina se utiliza como anestésico y antiséptico tópico (Schie *et al.*, 2000.)

Las moléculas de los isómeros del cresol, que son los compuestos más sencillos dentro del grupo de los *alquil*-fenólicos, se muestran en la figura 2.3. Se forman por una molécula de fenol sustituida con un grupo metilo. Sus tres isómeros difieren, tanto en su biodegradabilidad como en sus características fisicoquímicas, resumidas en la tabla 2.6 (Aldrich, 1998; MERCK & Co. 1996).

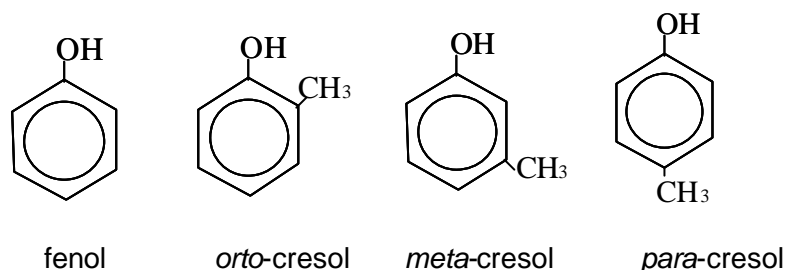


Figura 2.3 Moléculas de fenol y los tres isómeros de cresol

Tabla 2.6 Propiedades fisicoquímicas del fenol e isómeros del cresol (Aldrich, 1998; MERCK & Co. 1996).

Propiedad	fenol	<i>o</i> -cresol	<i>m</i> -cresol	<i>p</i> -cresol
Peso molecular (g/mol)	94.11	108	108	108
Fórmula molecular	C ₆ H ₆ O	C ₇ H ₈ O	C ₇ H ₈ O	C ₇ H ₈ O
Punto de fusión (°C)	43	30.99	11-12	34.69
Punto de ebullición (°C)	182	191	202.2	201.9
Densidad	1.071	1.04	1.0341	1.0341
Solubilidad (g/100 mL agua)	6	1-5 (19°C)	1-5 (20°C)	2.5 (50°C)

2.4.1 Toxicidad

La toxicidad del fenol y los diferentes isómeros del cresol difiere principalmente en el origen y adaptación que el lodo metanogénico haya tenido frente a estos compuestos. En general, su toxicidad aumenta conforme el número y tipo de sustituyentes, de modo que los compuestos más sustituidos son más tóxicos (Puig-Grajales *et al.*, 2000). El efecto inhibitorio de los compuestos mono-sustituidos está relacionado con su hidrofobicidad o apolaridad (Sierra-Alvarez y Lettinga, 1991; Schie *et al.*, 2000).

El coeficiente de partición octanol/agua (Log P) representa la afinidad relativa de una molécula a un solvente no polar. Este valor, aunque de mucha importancia, no es determinante para predecir la toxicidad de una molécula, debido a que no considera la disociación entre sus formas básica o ácida. Dependiendo del pK_a (constante de disociación) ambas formas pueden expresar diferentes propiedades de disociación octanol/agua (Kishihno y Kobayashi, 1994; Olguín-Lora *et al.*, 2001). Se tienen evidencias de que a medida que aumenta su hidrofobicidad, los compuestos son capaces de atravesar la membrana celular y lograr una buena distribución en el área constituida por lípidos, teniendo la capacidad de solubilizarse parcialmente y alterar funciones como el transporte de iones y ocasionalmente producir lisis celular (Field y Lettinga, 1987; Sierra-Alvarez y Lettinga, 1991; Donlon *et al.*, 1995; Schie *et al.*, 2000).

Los mecanismos de resistencia de las células tienden a contrarrestar el aumento en la fluidez de la membrana originado por los compuestos fenólicos. Uno de estos mecanismos es la isomerización de los ácidos grasos insaturados de la configuración *cis* a la *trans*. De esta manera las cadenas de ácidos grasos se alinean más cerca entre sí, dando lugar a una membrana más rígida y menos permeable. Otro mecanismo es el aumento en la proporción de ácidos grasos saturados, respecto a los insaturados, lo que genera el mismo fenómeno (la membrana se hace más rígida), y también puede compensar el aumento en la fluidez de la membrana (Schie *et al.*, 2000).

En la digestión anaerobia, las bacterias metanogénicas son más susceptibles frente a compuestos tóxicos que las bacterias acidogénicas, por lo que la presencia de compuestos tóxicos pueden romper fácilmente el balance entre la tasa de producción de ácidos y su tasa de consumo. De esta manera, si se introduce un compuesto tóxico, se afectará principalmente la actividad metanogénica originando una acumulación de ácidos grasos volátiles en el ambiente del reactor (Guyot, 1992).

En la tabla 2.7 se presentan los valores de toxicidad del fenol y los isómeros de cresol, es decir, las concentraciones a las que se inhibe el 50% y 100% de la actividad metanogénica acetoclasta (IC₅₀, IC₁₀₀ respectivamente) Olguín-Lora *et al.*, 2001; Puig-Grajales *et al.*, 2000.

Tabla 2.7 Valores de toxicidad para los compuestos *alquil*-fenólicos. (Olguín-Lora *et al.*, 2001; Puig-Grajales *et al.*, 2000)

Compuesto	Sustituyentes	Log P	IC ₅₀ (mg)	IC ₁₀₀ (mg)
fenol	1-OH	1.46	226-1505	2541-7811
<i>o</i> -cresol	1 OH 1 CH ₃	1.95	432-507	983-1620
<i>m</i> -cresol	1 OH 1 CH ₃	1.96	443	1728
<i>p</i> -cresol	1 OH 1 CH ₃	1.94	410-1209	1210-1512

2.4.2 Biodegradabilidad

El fenol e isómeros del cresol (*o*, *m*, *p*-) pueden ser mineralizados en condiciones aerobias, a través de bacterias y hongos, solos o en mezclas. También se ha probado la degradación anaerobia bajo condiciones metanogénicas, sulfato-reductoras, nitrato-reductoras y fierro-reductoras, en cultivos discontinuos y continuos (Bisaillon *et al.*, 1991; Kennes *et al.*, 1997, Schie *et al.*, 2000, Fedorak y Hudrey, 1984; Young y Rivera, 1985). Es muy importante la procedencia de los lodos ya que el uso de poblaciones mixtas aclimatadas aumenta las velocidades específicas de remoción de estos compuestos fenólicos (Charest *et al.*, 1999).

El fenol se degrada en la mayoría de las ocasiones más rápidamente que los compuestos sustituidos, mediante digestión anaerobia. Su conversión a metano es el resultado de un trabajo sintrófico de bacterias, entre las que se cuentan fermentadoras y metanógenas hidrógeno-oxidantes.

Se requiere de un período de aclimatación antes de que un consorcio llegue a degradar estequiométricamente compuestos fenólicos. Young y Rivera (1985) proponen tres mecanismos de aclimatación, los cuales son:

- 1) Selección de los organismos capaces de crecer en el sustrato nuevo.
- 2) Inducción o desarrollo de las enzimas necesarias.
- 3) Mutaciones, con lo que se da origen a nuevos genotipos.

El tiempo de aclimatación depende tanto de la composición del medio de alimentación que se utilice, como del origen del inóculo (Young y Rivera, 1985; Razo-Flores *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 1986). Se han encontrado diferentes valores para el tiempo de adaptación al fenol, y dependiendo del origen, varía en un rango que va desde 6 a 40 días. (Razo-Flores *et al.*, 1996; Battersby y Wilson, 1989; O'Connor y Young, 1996). La adición de glucosa en una concentración de 1000 mg/L hace más rápida la remoción, además que favorece la aclimatación y hace al reactor más resistente frente a cambios de temperatura y aumentos bruscos en la carga orgánica (Tay e Yan, 2001) . La velocidad de degradación de fenol disminuye ligeramente cuando se adiciona *o*-cresol (Iniestra , 2001; Bisailon *et al.*, 1993).

El *p*-cresol, al igual que el fenol, se ha demostrado que puede ser utilizado como única fuente de carbono y energía (Hajii *et al.*, 1999; Fang, 2000). En lote y utilizando un lodo metanogénico adaptado, este compuesto es degradado antes de 192 horas con un rendimiento de 90% de metano, con una fase de adaptación de 70 horas (Wang *et al.*, 1988). Puede ser degradado a una concentración de 108 mg/L (1 mM) bajo diferentes condiciones reductoras (desnitrificantes, sulfatorreductoras y metanogénicas) por un mismo lodo en un intervalo de 21 a 30 días. Este tiempo se puede reducir a 6 ó 10 días, si el lodo es aclimatado, además la adición de ácidos grasos volátiles permite la remoción de más altas concentraciones en el afluente, funcionando posiblemente a manera de co-sustratos. La capacidad de degradar este compuesto está presente en el lodo, aunque depende de la disponibilidad del aceptor electrónico (Hägglom *et al.*, 1990).

El hecho que un lodo granular pueda degradar, tanto el fenol como el *p*-cresol, se debe a que ambos compuestos son intermediarios en la ruta de degradación de flavonoides y tirosina (Heider y Fuchs, 1997). Iniestra (2001) encontró que en experimentos por lote ambos compuestos comienzan a ser removidos simultáneamente. Se ha observado además, que la presencia de *p*-cresol a bajas concentraciones aumenta la velocidad de degradación del fenol y que la presencia de fenol (80 ppm) en una corriente de alimentación de *p*-cresol no modifica su velocidad de remoción, lo que se debe a que se remueve rápidamente (Kennes *et al.*, 1997). De esta manera, se pueden degradar fenol y *p*-cresol, en condiciones anaerobias, utilizando reactores UASB. Ambos compuestos se mineralizan hasta metano y dióxido de carbono de manera eficiente, aún al exceder los límites inhibitorios; Sin embargo, debe tenerse cuidado de no exceder estos límites durante el arranque del reactor (Sierra-Alvarez y Lettinga, 1991; Fang y Zhou, 2000; Kennes *et al.*, 1997; Iniestra, 2001).

Las tablas 2.8 y 2.9 resumen algunos de los experimentos que se han realizado, en lo que a la degradación de compuestos fenólicos se refiere.

Tabla 2.8 Resumen de experimentos de remoción del fenol e isómeros del cresol en continuo.

Compuestos	Co-sustrato	Concentración (mg/L)	Eficiencias (%)	Inóculo/reactor	Referencia
fenol	glucosa (1000 mg/L) ninguno	6kg DQO/m ³ d	98	lodo adaptado UASB	Tay e Yan , 2001
			88		
fenol	-	4000	100	fermentador anaerobio	Suidan e <i>t al.</i> , 1988
fenol	-	1260	100	lodo anaerobio	Fang y Zhou, 1997
fenol/ <i>p</i> -cresol	-	800/300	95/65 85 DQO	lodo aclimatado UASB	Fang y Zhou, 2000
		1200-1500/400	75-80 DQO		
Fenol/ <i>p</i> -cresol	-	7 kgDQO/m ³ d 1200-400	75, global 75	lodo anaerobio	Fang y Zhou, 1999
<i>p</i> -cresol	-	400-650 7.25 kgDQO/m ³ d	80	lodo adaptado UASB	Kennes <i>et al.</i> , 1997

Tabla 2.8 (Cont.) Resumen de experimentos de remoción del fenol e isómeros del cresol en continuo.

Compuestos	Co-sustrato	Concentración (mg/L)	Eficiencias (%)	Inóculo/reactor	Referencia
fenol: <i>m</i> -cresol	-	900: 320	98: 20	lodo metanogénico <i>UASB</i>	Zhou <i>et al.</i> , 1997
fenol/ <i>o, p</i> -cresol	-	500/150/150	40-85/ 47- 56/ 90-100	<i>UASB</i>	Hajji <i>et al.</i> , 2000
fenol/ <i>o, p</i> -cresol	-	500/150/150	100/ 51-53/ 88-95	<i>UASB</i>	Hajji <i>et al.</i> , 2000
fenol/ <i>o, p</i> -cresol	suero 0.025%	150/35/35	98 global	mezcla delodo aclimatado reactor de biopelícula	Hajji <i>et al.</i> , 1999
comp. fenólicos	peptona proteosa	178	97 fenol 83 fenólicos	lodo adaptado reactor de biopelícula	Charest <i>et al.</i> , 1999
fenol- <i>o, m, p</i> cresol	-	148-27-40-20	70, global <i>o</i> -cresol no degradado	Consorcio anaerobio	Charest <i>et al.</i> , 1999
fenol- <i>o, m, p</i> cresol	-	200-100 c/cresol	100-0-85-90	lodo anaerobio	Wang <i>et al.</i> , 1988

Tabla 2.9 Resultados de pruebas de biodegradabilidad en lote

Compuestos	Concentración mg/L	Eficiencia	Inóculo	Referencia
fenol	0.5 mM	Degradación 32 μ M/Ld	Sedimento Río Este N.Y. <i>botellas serológicas</i> lag: 3.8-6.5 sem.	O'Connor y Young, 1996
<i>o</i> -cresol	0.5 mM	Degradación 8.57 μ M/Ld	Sedimento Río Este N.Y. <i>botellas serológicas</i> lag: 18.3-21.7 sem.	O'Connor y Young, 1996
<i>m</i> -cresol	0.5 mM	Degradación 4.28 μ M/Ld	Sedimento del Río Este N.Y. <i>botellas serológicas</i> lag: 0-8.5 sem.	O'Connor y Young, 1996
<i>p</i> -cresol	0.5 mM	Degradación 15.7 μ M/Ld	Sedimento del Río Este N.Y. <i>botellas serológicas</i> lag: 0-8.5 sem.	O'Connor y Young, 1996

Tabla 2.9 (cont) Resultados de pruebas de biodegradabilidad en lote

Compuestos	Concentración mg/L	Eficiencia	Inóculo	Referencia
fenol: <i>p</i> -cresol	200: 100	VEB 156:75	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Iniestra, 2001
fenol: <i>p</i> -cresol	200: 150	VEB 3 : 2	Lodo no-adaptado <i>botellas serológicas</i>	Iniestra, 2001
fenol: <i>p</i> -cresol: <i>o</i> -cresol	200: 100: 25	VEB 132:73:10	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Iniestra, 2001
fenol: <i>p</i> -cresol: <i>o</i> -cresol	200: 100: 75	VEB 116:71:20	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Iniestra, 2001
fenol: <i>p</i> -cresol: <i>o</i> -cresol	200: 100: 150	VEB 121:55:30	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Iniestra, 2001
fenol	210: 420: 840	AME 0.2 : 0.26: 0.33	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Zhou <i>et al.</i> , 1997
<i>o</i> -cresol	159	AME nula	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Zhou <i>et al.</i> , 1997
<i>m</i> -cresol	159	AME nula	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Zhou <i>et al.</i> , 1997
<i>p</i> -cresol	159	AME 0.07	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Zhou <i>et al.</i> , 1997
Fenol	420	AME 0.25-0.3	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Fang y Zhou, 2000
<i>p</i> -cresol	159	AME 0.07-0.08	Lodo adaptado <i>botellas serológicas</i>	Fang y Zhou, 2000

VEB: Velocidad Específica de Biodegradación (mg DQO/g SSV d)

AME: Acividad Metanogénica Específica (g CH₄-DQO/ gSSV d).

La eficiencia de remoción disminuye cuando el tiempo de retención se acorta, y lo mismo ocurre cuando se aumenta la concentración de fenol (Fang y Zhou, 1999). Los mecanismos de degradación del *p*-cresol son más sensibles a choques tóxicos que los del fenol. Para obtener elevadas eficiencias de remoción de DQO, utilizando reactores del tipo UASB, se propone

como carga volumétrica máxima 7.1 kg DQO/ m³ d, aunque se puede aumentar recirculando los efluentes (Iniestra, 2001).

Wang *et al.* (1988) encontraron que en sistemas por lotes, la degradación de *para*-cresol comienza una vez que se ha agotado el fenol, además que la velocidad de degradación del *para*-cresol es aproximadamente cinco veces menor que la del fenol. Este resultado lo atribuyen al hecho que el lodo inoculado estaba adaptado a fenol.

En sistemas por lotes y con un lodo no adaptado, se tiene un tiempo de adaptación de 20 días para una mezcla de fenol y los isómeros *orto* y *para*-cresol. El *orto*-cresol produce una disminución significativa en la velocidad de degradación del *p*-cresol y del fenol (Iniestra, 2001; Bisailon *et al.*, 1993). Se sabe que la misma población microbiana que degrada el fenol es capaz de transformar el *orto*-cresol. A este respecto se ha encontrado en muchas ocasiones simplemente una transformación y no la mineralización.

En 1991, Bisailon *et al.* demostraron la ruta de degradación del *orto*-cresol empleando átomos de deuterio y comprobaron además, la necesidad de agregar un sustrato de enriquecimiento en el medio como la peptona, ya que en ausencia de ésta, no se lleva a cabo alguna transformación. Estos mismos autores, en 1993 demostraron que en mezcla, el fenol aumenta la velocidad de degradación del *o*-cresol, mientras que la del fenol disminuye. Observaron que su cultivo mixto o consorcio transforma compuestos fenólicos sustituidos en la posición *orto*, pero en las posiciones *meta*, ni *para*. Este cultivo mixto está compuesto por siete diferentes morfologías. Aunque no han aislado cada uno de los microorganismos, para 1994 obtuvieron un cultivo activo con cinco microorganismos de morfologías diferentes (Bisailon, 1994).

En 1999 Hajji *et al.* emplearon el mismo cultivo bioaumentado con otro capaz de degradar *para*-cresol, en un reactor de biopelícula al que alimentaron fenol, *orto*- y *para*-cresol empleando suero de leche al 0.025% como cosustrato, sustituyendo la peptona. Se degradaron los compuestos sin que observara la acumulación de intermediarios en el medio, aunque en pruebas en lotes encontraron ácido *m*-toluico. El análisis microscópico mostró siete diferentes formas bacterianas, incluyendo bacterias del género *Methanotrix*. En sistemas por lotes, Puig-Grajales *et al.* (2000 b) observaron que no hubo una significativa degradación de *o*-cresol en condiciones tanto de metanogénesis, como nitrato y sulfatorreductoras después de períodos de incubación de 100 días. Sin embargo observaron que en presencia de Mn IV como aceptor

de electrones se degrada en un período menor a 15 días. El *orto*-cresol fue mineralizado como se comprobó por la ausencia de metabolitos que absorben luz UV.

Hajji *et al.* (2000) utilizaron reactores UASB inoculados con 18 g SSV/L_{reactor} de lodo granular anaerobio, uno de ellos bioaumentado con 1.8 g SSV/L_{reactor} de lodo adaptado a fenol, *para* y *orto*-cresol. Alimentaron 500 mg/L de fenol y 150 mg/L de *para* y *orto*-cresol, respectivamente, a 29°C con un TRH de 3 días y recirculación. En el reactor que no hubo bioaumentación se incrementó la eficiencia en la remoción del fenol, de alrededor del 40 % en el día 48 a 100% en el día 171. La eficiencia de remoción de *para*-cresol mostró la misma tendencia hasta alcanzar un 90% en el día 60. La remoción completa de *para*-cresol se alcanzó hasta después de 235 días. La eficiencia de remoción de *orto*-cresol aumentó muy lentamente a lo largo de su experimento hasta niveles del 41% en el día 81. Para el día 276 las eficiencias de remoción fueron del 100, 56 y 100% respectivamente para el fenol, *orto* y *para*-cresol. En este primer reactor encontraron ácido 4-hidroxi-3-metil benzoico, que es el primer intermediario de transformación del *orto*-cresol a concentraciones superiores a los 50 mg/L. También encontraron, aunque en menor concentración, (18mg/L) ácido *meta*-toluico, que es el segundo intermediario de la transformación. El reactor con bioaumentación alcanzó eficiencias de remoción de hasta el 100% del fenol y 95% del *para*-cresol, respectivamente, en 36 días. Para el *orto*-cresol alcanzó una eficiencia de remoción hasta del 77% en 276 días. Encontraron trazas de ácido *m*-toluico de manera intermitente.

El *meta*-cresol puede degradarse en condiciones sulfatorreductoras y nitratorreductoras más rápido que en condiciones metanogénicas. Son necesarios 20 días para comenzar a adaptar una mezcla de lodos proveniente de un digestor de lodos (de una planta de tratamiento de agua municipal) a una mezcla de fenol y *m*-cresol, usando sacarosa como cosustrato, en un reactor UASB (Zhou y Fang, 1997). En este estudio citado, los autores reportan una remoción del 98 % y 20% del fenol y *meta*-cresol a concentraciones de 900 y 320 mg/L, respectivamente. El reactor se operó a 37°C, con un tiempo de retención hidráulica de 1 día con recirculación. Observaron que a concentraciones por encima de éstas disminuye de forma drástica la actividad de la biomasa, sin embargo, al reducir las concentraciones la biomasa recupera por completo su actividad. La degradación de 600 mg/L de fenol no se afecta por la presencia de 600 mg/L de *meta*-cresol, sin embargo, por encima de 800 mg/L comienza a deteriorarse (Zhou y Fang, 1997).

Zhou y Fang (1997) reportan que el lodo con el que experimentan, aunque remueve el 15% de *m*-cresol en un reactor UASB, no lo hace en pruebas por lote, así como tampoco el *orto*-cresol. Esto lo atribuyen a la ausencia del fenol en estas pruebas, que aparentemente funciona como co-sustrato en la degradación del *m*-cresol. La actividad metanogénica específica disminuye al aumentar la concentración de *meta*-cresol, lo que indica que es tóxico a la degradación del fenol. La concentración que inhibe el 50% de la actividad metanogénica específica IC₅₀ es de 330 mg/L. El consorcio que es capaz de degradar *m*-cresol, es capaz también de degradar el *p*-cresol con facilidad. Esto se debe a que el *p*-hidroxibenzoato es metabolizado por el consorcio y a su vez es parte de la ruta de degradación de ambos compuestos (Ramanand y Sufliya, 1991).

Un consorcio mixto, en un reactor continuo de biopelícula con flujo ascendente remueve cerca del 98% de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) de un afluente con de 150 mg/L de fenol y 35mg/L de ambos, *orto* y *meta*-cresol, a 29°C, adicionado con 0.025% de suero, como cosustrato (Hajji *et al.*, 1999). Blum *et al.* (1986) reportan la degradación del *o*-cresol en un filtro anaerobio, inoculado con un lodo adaptado a fenol, agregando glucosa como cosustrato. La degradación se favorece adicionando glucosa a una concentración de 100 mg/L. Sin embargo, no observó degradación utilizando el mismo inóculo en pruebas en lotes. La fase de adaptación al *o*-cresol se ha encontrado que es más larga que para los otros dos isómeros y para el fenol, siendo de 65 a 151 días (Battersby y Wilson, 1989; O'Connor y Young, 1996).

En términos generales, la biodegradabilidad de estos tres isómeros tiene el siguiente orden (O'Connor y Young, 1996):

***p*-cresol > *m*-cresol >> *o*-cresol**

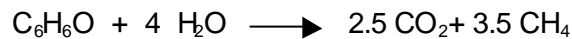
2.4.3 Mecanismos de degradación de los compuestos fenólicos

Se ha reportado que los compuestos fenólicos se degradan en dos pasos: Inicialmente el sustrato se convierte a un intermediario aromático central, comúnmente el benzoil-CoA el cual se reduce a un compuesto alifático, el que posteriormente se metaboliza a Acetil-CoA y CO₂ (Heider y Fuchs, 1997; Harwood *et al.*, 1999).

Las bacterias acidogénicas transforman los compuestos fenólicos, en primera instancia a benzoato, el cual es transformado posteriormente en acetato por las bacterias acetogénicas y, finalmente, es convertido en metano por las bacterias metanogénicas. En experimentos continuos, la concentración de posibles intermediarios, incluyendo benzoato y ácidos grasos volátiles, se encuentra por debajo de los límites de detección, lo que sugiere que el paso limitante en la degradación es la acidogénesis inicial (Zhou y Fang, 1997).

2.4.3.1 Mecanismos de degradación del fenol

La reacción estequiométrica de conversión es:



Se ha reportado la biodegradación del fenol utilizando consorcios metanogénicos y se han identificado como posibles intermediarios en esta degradación al *ciclohexano-carboxilato*, el *1-ciclohexeno-carboxilato* y el *heptanoato*, con base en su degradación cuando se usan como sustratos y a su acumulación en el cultivo (Bisaillon *et al.*, 1991).

Entre los intermediarios de la degradación se ha encontrado además de benzoato, al 4-hidroxibenzoato (**4-OHBz**). El fenol es carboxilado y dehidroxilado produciéndose benzoato (figura 2.4), mismo que puede ser metabolizado a acetato. Esta reacción solo es favorable si se consumen el acetato, dióxido de carbono e hidrógeno (Knoll y Winter, 1989).

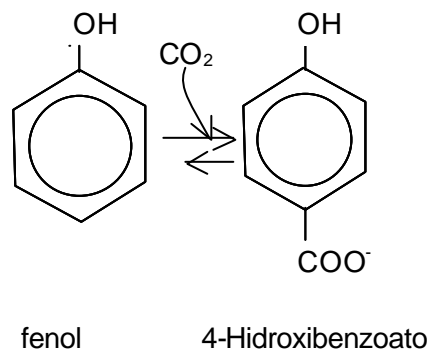


Figura 2.4 Primer paso del mecanismo de la biodegradación del fenol (Bisaillon *et al.*, 1993)

La primera reacción que ocurre es una carboxilación en la posición *para*, respecto al hidroxilo. Los organismos que llevan a cabo esta reacción no son sintróficos, auténticamente, porque la inhibición de la metanogénesis no afecta la subsecuente producción de benzoato, mediante una dehidroxilación (Knoll y Winter, 1989).

Se han aislado dos organismos capaces de llevar a cabo esta reacción de carboxilación en condiciones metanogénicas: Ambos son estrictamente anaerobios, esporulados y requieren de aminoácidos como sustratos para el crecimiento y carboxilación (*Clostridium hydroxybenzoicum* y *Clostridium* sp.(cepa 7). El primero de ellos, *Clostridium hydroxybenzoicum*, requiere solamente de arginina y glicina para llevar a cabo esta reacción de carboxilación, de modo que el extracto de levadura cubre completamente sus requerimientos. La cepa 7 de la segunda especie aislada *Clostridium* sp. requiere de peptona, aunque son suficientes las combinaciones de arginina y glicina, o alanina, valina, isoleucina, glicina y ornitina. (Schie *et al.*, 2000)

Hay una diferencia muy importante entre estas dos especies de *Clostridium* y es que, mientras que la primera de ellas (*C. hydroxybenzoicum*) descarboxila el 4-OHBz a fenol mediante una reacción no reversible, como se aprecia en la figura 2.5, la **cepa 7** (*C. sp*) puede descarboxilar el 4-OHBz a fenol y transformar el fenol a benzoato, posiblemente a través del 4-OHBz como intermediario, es decir que puede revertir las reacciones. Este compuesto se transfiere entre células, lo que explica la acumulación en el medio. (Schie *et al.*, 2000; Li, *et al*, 2000).

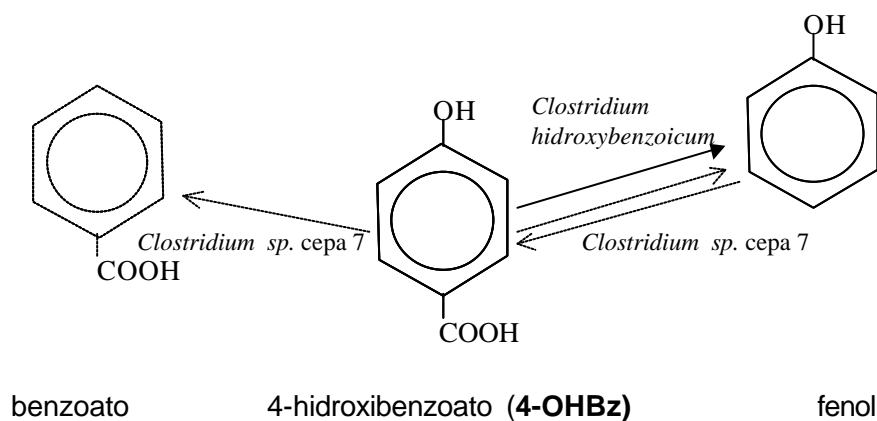


Figura 2.5 Reacciones que llevan a cabo dos especies de *Clostridium* (Schie *et al.*, 2000)

Bisaillon *et al.* (1991) han reportado un consorcio microbiano que puede carboxilar y dehidroxilar, además del fenol, compuestos fenólicos sustituidos con grupos -OH, -CH₃, -F, -NH₂, -Cl, COOH y Br, en la posición *orto* respecto del hidroxilo.

Se ha encontrado que el benzoil-Co A es el intermediario central en la degradación de muchos compuestos aromáticos. La ruta de metabolización de este compuesto (figura 2.6) se puede dividir en cinco etapas: 1) tio esterificación del anillo (-Co A), 2) Reducción del anillo, 3) hidrogenación/dehidrogenación, 4) fisión o ruptura del anillo, 5) β-oxidación del anillo abierto hasta acetil-CoA (Harwood *et al.*, 1999; Schie *et al.*, 2000).

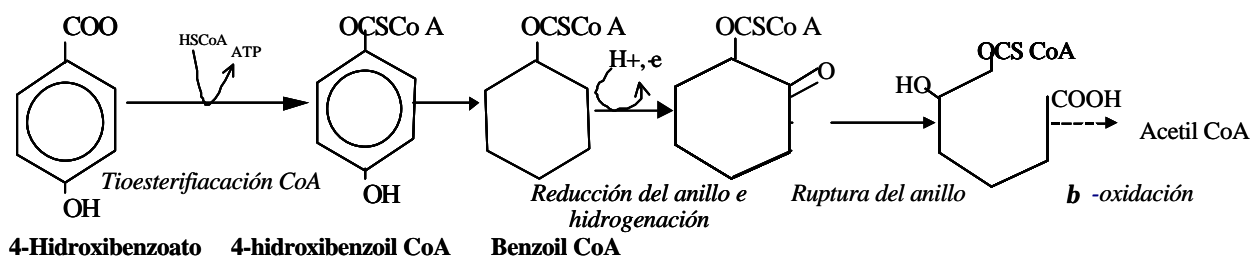


FIGURA 2.6 Representación esquemática de la degradación del 4-OHBz (Harwood *et al.*, 1999; Schie *et al.*, 2000)

2.4.3.2 Mecanismos de degradación del *orto*-cresol

El *orto*-cresol es el isómero cresílico más persistente (O'Connor y Young, 1996). Bisaillon *et al.* (1991) reportaron que algunas poblaciones microbianas mixtas son capaces de degradar el *orto*-cresol solo o en mezcla con fenol en un medio rico, es decir, adicionado con peptona. Sin embargo, el consorcio utilizado no degrada a los otros dos isómeros -*meta* y *para*. La capacidad

para metabolizar los fenoles sustituidos en la posición orto varía, por lo que se asume que los efectos estéricos son determinantes en las reacciones de carboxilación y dehidroxilación. (Charest *et al.*,1999; Bisailon *et al.*, 1991; Bisailon *et al.*, 1991b)

La ruta de degradación de este compuesto es mediante la adición de un grupo carboxilo y la eliminación del hidroxilo, capacidad que es inducida por el fenol y se consigue después de que la población mixta ha permanecido expuesta por varios años, de modo que, la presencia de fenol aumenta la tasa de transformación del *o*-cresol. La transformación estequiométrica indica que la carboxilación ocurre en la posición *para*, respecto del grupo hidroxilo, como se puede apreciar en la figura 2.7. El ácido 3-metilbenzoico (toluico) producto de la carboxilación y dehidroxilación de la molécula, inhibe la subsecuente degradación del *orto*-cresol (Bisailon *et al.*, 1991).

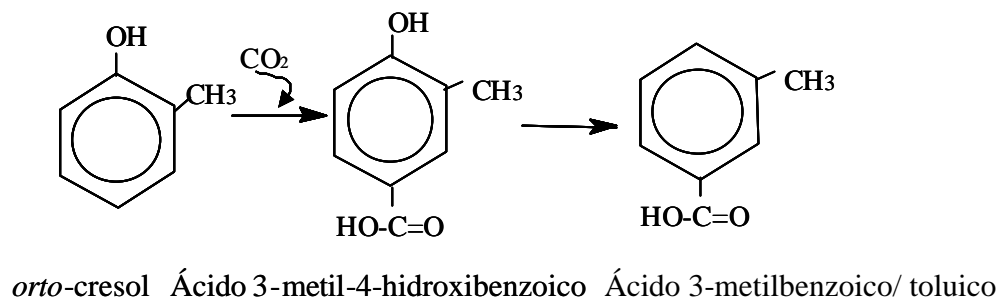


Figura 2.7 Representación esquemática de un mecanismo de degradación del *o*-cresol (Bisailon *et al.*, 1991)

El *o*-cresol también se metaboliza por la oxidación del grupo metilo bajo condiciones sulfato-reductoras (Sulfita y Saxena, 1989), y metanogénicas (O'Connor y Young,1996) rindiendo 2-hidroxibencilalcohol. En condiciones nitrato-reductoras, este compuesto se degrada mediante una *p*-carboxilación. (Londry *et. al.*, 1999 ; O'Connor y Young , 1996)

2.4.3.3 Mecanismos de degradación del *para*-cresol

El *p*-cresol es degradado por consorcios desnitrificantes, metanogénicos y sulfato-reductores mediante la oxidación anaerobia del grupo metilo (ver figura 2.8, Häggblom *et al.*, 1990), encontrándose al *p*-hidroxibenzoato como el principal compuesto intermediario, mismo que es dehidroxilado posteriormente (Kennes *et al.*, 1997, Sulfito y Saxena, 1989; O'Connor y Young, 1996, Häggblom *et al.*, 1990). Se ha encontrado al benzoato como intermediario inmediato en condiciones de metanogénesis, aunque no en condiciones de desnitrificación o sulfatorreducción (Schie *et al.*, 2000).

Young y Rivera (1985) estudiaron la ruta de degradación del *p*-cresol bajo condiciones metanogénicas en un digestor de lodos de una planta de tratamiento de agua. Encontraron una ruta que involucra al fenol y ciclohexanol y sugieren que la desmetilación es el paso limitante.

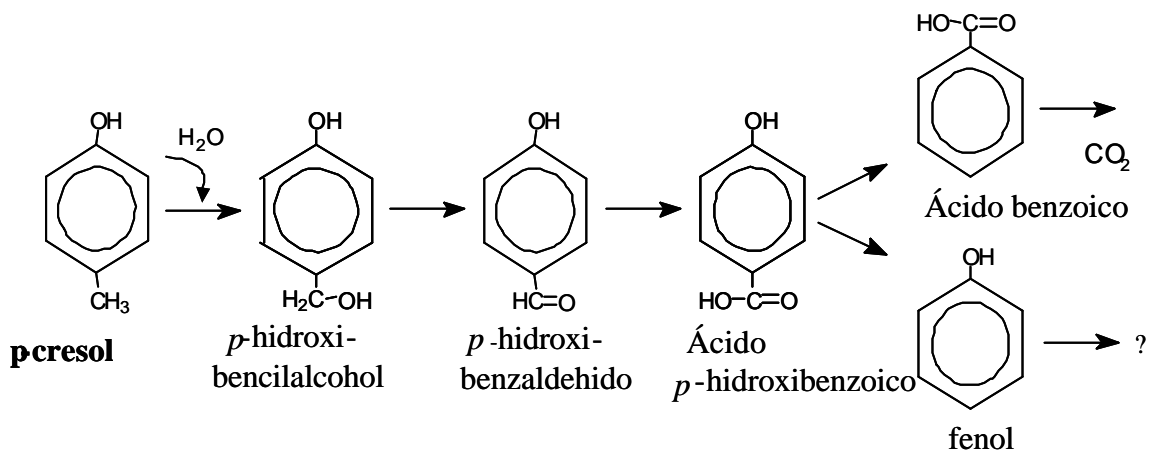


Figura 2.8 Representación esquemática de la degradación del *para*-cresol (Häggblom *et al.*, 1990)

2.4.3.4 Mecanismos de degradación del *meta*-cresol

La ruta metabólica por la cual es degradado el *m*-cresol en condiciones anaerobias depende del aceptor electrónico disponible en el medio: Bajo condiciones nitrato-reductoras se degrada mediante un mecanismo de oxidación del grupo metilo. En condiciones metanogénicas se transforma via una *para* -carboxilación inicial, seguida de una aparente demetilación y dehidroxilación para producir ácido benzoico. Otra idea es que posterior a la carboxilación, ocurre una dehidroxilación, paso en el que se produce ácido *orto*-toluico (Ramanand y Suflita, 1991). En la figura 2.9 se muestran ambas rutas propuestas para la degradación del *para*-cresol (Schie *et al.*, 2000; Londry y Fedorak, 1993)

En el primer paso de la ruta metabólica del *meta*-cresol se tiene la formación de un intermediario, el 4-hidroxi-2-metilbenzoato. El siguiente paso metabólico, tentativamente la demetilación, produce otro intermediario, el *para*-hidroxibenzoato. Éste es removido a través de una descarboxilación y transformación a fenol (Ramanand y Suflita, 1991). La carboxilación se prueba del hecho que cada molécula de cresol tiene siete átomos de carbono, sin embargo se producen ocho moléculas de acetato, que es transformado en CO₂ (Roberts *et al.*, 1990). La reacción de demetilación favorece la transformación del grupo *m*-metilo en metano y es la limitante (Londry y Fedorak, 1993).

En condiciones sulfatorreductoras el proceso es casi el mismo que para las metanogénicas, donde se ha encontrado que los ácidos benzoico y 4-hidroxibenzoico son metabolitos intermediarios de la biodegradación. (Kathleen *et al.*,1997) Se han encontrado tiempos de adaptación de hasta 100 días. (Battersby y Wilson, 1989; O'Connor y Young, 1996)

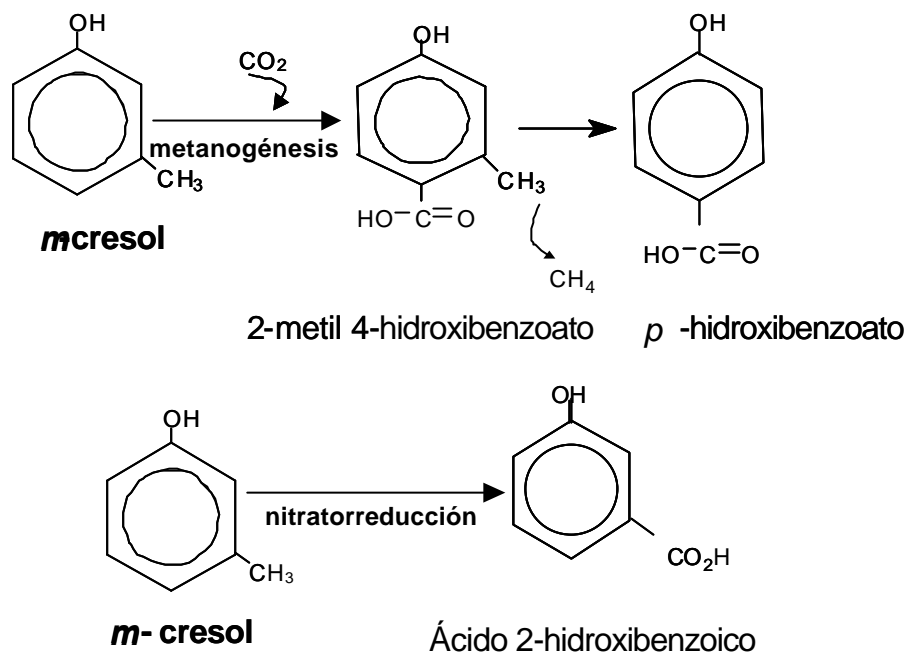


Figura 9 Representación esquemática de la degradación del *m*-cresol (Schie *et al.*, 2000; Londry y Fedorak, 1993)

CAPÍTULO 3

Metodología

3. Metodología

En este capítulo se describen los experimentos que se realizaron en este estudio, así como las condiciones en que se desarrollaron y los cálculos que derivan en los resultados.

De manera general, el trabajo experimental se divide en cinco partes de acuerdo con los objetivos específicos y se esquematiza en la figura 3.1:

1. Investigar el efecto del *orto*-cresol en la remoción de una mezcla de fenol y *para*-cresol en un sistema continuo.
2. Investigar el efecto del extracto de levadura en la remoción del *orto*-cresol, dentro de una mezcla de fenol y *para*-cresol, en un sistema continuo.
3. Investigar el efecto del *meta*-cresol en la remoción de una mezcla de fenol y *para*-cresol en un sistema continuo.
4. Analizar la biodegradabilidad de una mezcla cuaternaria de fenol y los tres isómeros de cresol en un sistema continuo.
5. Determinar la velocidad de degradación de los compuestos fenólicos involucrados en el estudio, solos y en una mezcla terciaria, así como la velocidad en que se transforman en metano. Para esta última parte se realizaron pruebas en lotes en las que se utilizó como inóculo lodo granular metanogénico proveniente de uno de los reactores, al momento de finalizar su operación.

3.1 Sistemas continuos

Se utilizaron dos reactores tipo **UASB** contruidos en vidrio, con un volumen de operación de 160 mL y las siguientes dimensiones: 14.5 cm de altura y 3.9 cm de diámetro interno. En la figura 3.2 se muestra una fotografía de un reactor.

Ambos reactores se inocularon con 12.8 g de Sólidos Suspendidos Volátiles (**SSV**) de lodo metanogénico granular adaptado a fenol y *p*-cresol y operaron con un Tiempo de Retención Hidráulica (**TRH**) promedio de 12 horas, dentro de un cuarto con temperatura (**T**) controlada a 30 (± 3) °C.

SISTEMAS CONTINUOS

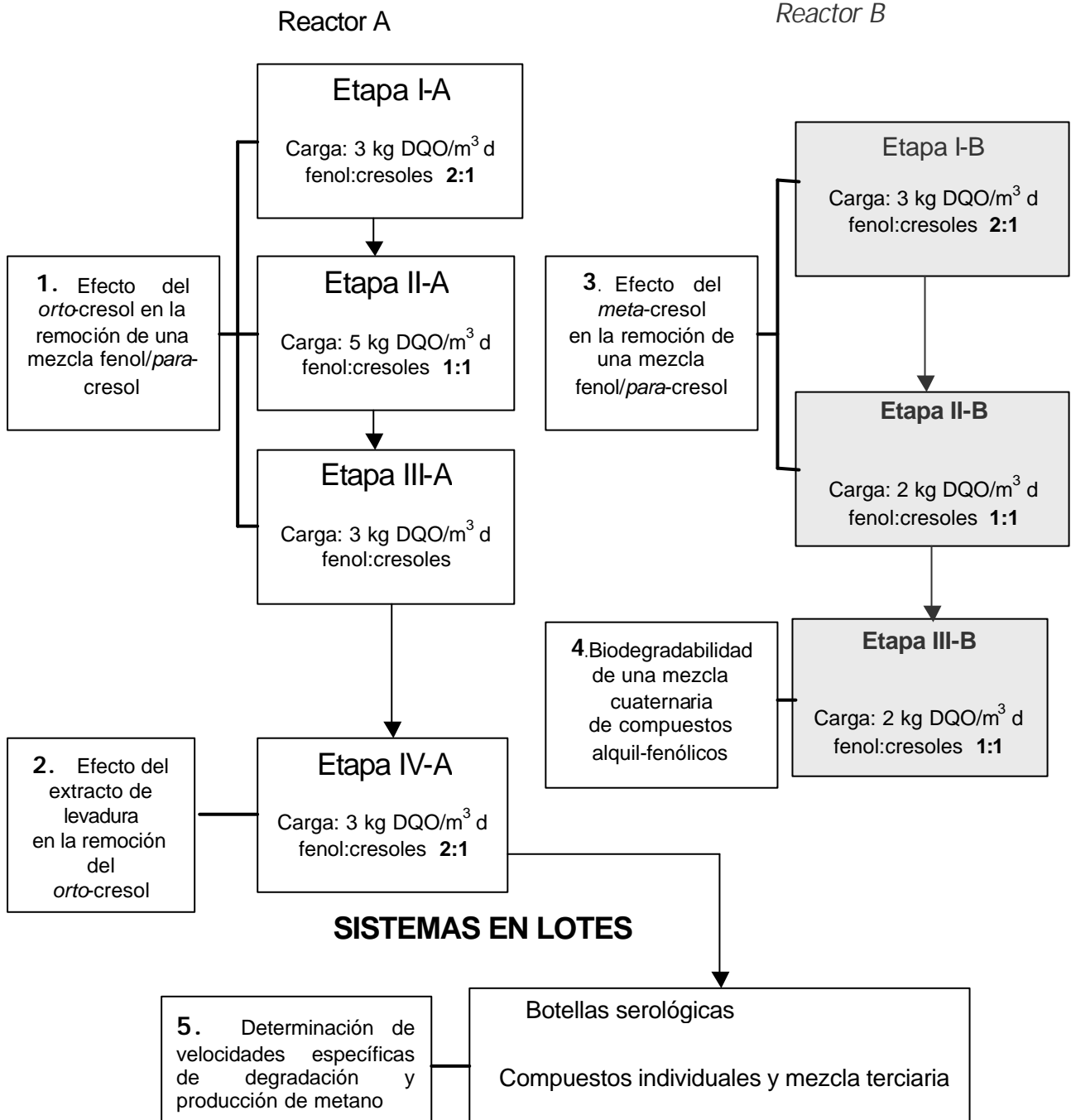


Figura 3.1 Diagrama del plan de experimentos, de acuerdo a los objetivos específicos

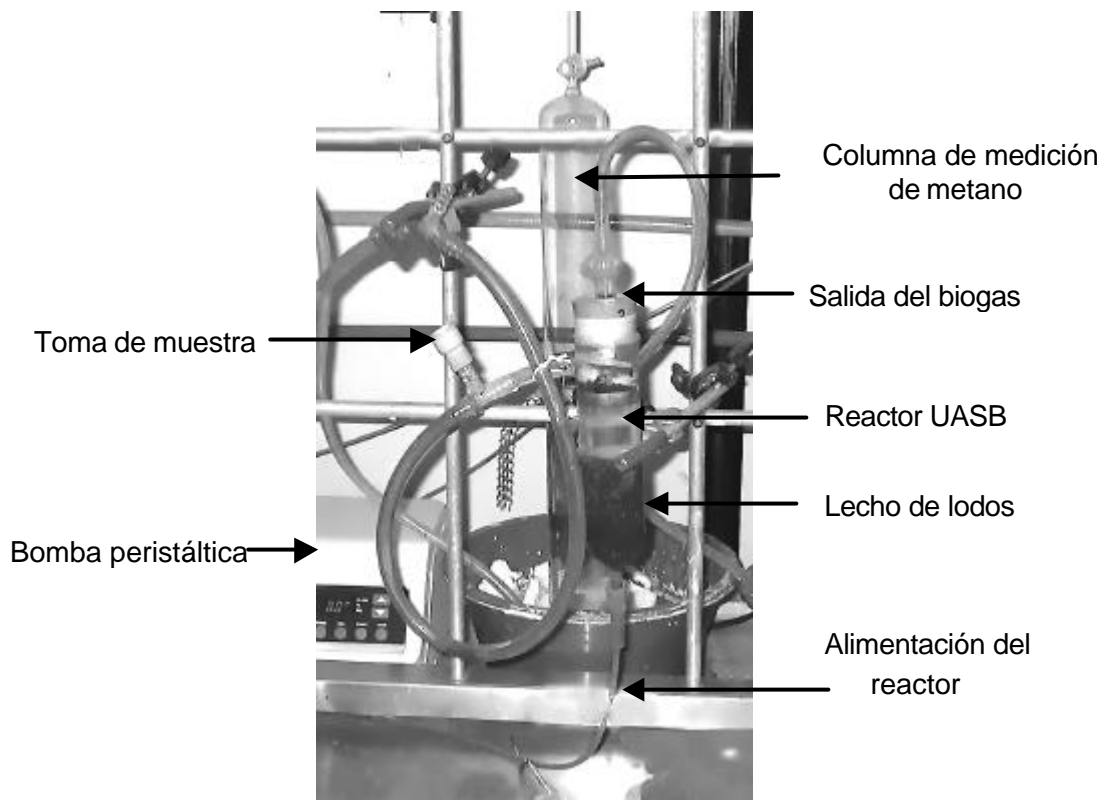


Figura 3.2 Fotografía del reactor UASB utilizado en este estudio.

Los sistemas continuos se alimentaron con un medio mineral (cuya composición general se muestra en la tabla 3.1) al que se adicionaron los compuestos fenólicos.

El medio de alimentación, para cada reactor, se mantuvo a una temperatura de entre 46°C, dentro de un refrigerador y se alimentó a los reactores por medio de una bomba peristáltica digital de flujo ajustable marca *Masterflex*, con dos cabezales *Master Load II*. El biogas producido se colectó y cuantificó en una columna de vidrio con un diámetro interno de 5.5 cm, llena de una solución de hidróxido de sodio (40 g/L), en la que se disolvió el dióxido de carbono. De esta manera el desplazamiento de la columna fue debido únicamente a la producción de metano.

En ambos reactores se monitorearon diariamente (cinco veces por semana), parámetros como: volumen alimentado en el intervalo de operación, pH, producción de metano, Demanda Química de Oxígeno (**DQO**, en entrada y salida) y cuantificación de compuestos fenólicos (en entrada y salida). Al inicio y término de la operación de los reactores se les cuantificó la biomasa (**SSV**).

Tabla 3.1 Composición del medio mineral empleado en los sistemas continuos y en lotes.

Macronutrientes (mg/L):		Micronutrientes (µg/L):	
Extracto de levadura	(10)	FeCl ₂ ·4H ₂ O	(200)
NaHCO ₃	(2000)	H ₃ BO ₃	(5)
NH ₄ Cl	(28)	ZnCl ₂	(5)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	(1)	CuCl ₂ ·2H ₂ O	(3.8)
K ₂ HPO ₄	(25)	MnCl ₂ ·4H ₂ O	(50)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	(10)	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	(5)
		AlCl ₃ ·6H ₂ O	(9)
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	(200)
		NiCl ₂ ·6H ₂ O	(14.2)
		Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O	(16.4)
		EDTA	(100)
		resazurina	(20)
		HCl 36%	(0.1mL)

3.1.1 Reactor A

El reactor **A** se operó durante 280 días, alimentado con mezclas de Compuestos Alquil-Fenólicos (**CAF**) como única fuente de carbono y energía (figura 3.2). Su análisis se divide de acuerdo a los objetivos específicos en dos partes:

1. Efecto del orto-cresol en la biodegradabilidad de una mezcla fenol/para-cresol

Esta parte del experimento engloba las tres primeras etapas de operación del Reactor **A**. En la **etapa I**, o inicial, se alimentaron concentraciones de 550 mg/L de fenol, 132 mg/L de *para*-cresol y 132 mg/L de *orto*-cresol, resultando una relación fenol:cresoles de 2:1.

En la **etapa II** se alimentaron 610 mg/L de fenol, 305 mg/L de *p*-cresol y 305 mg/L de *o*-cresol, haciendo una relación fenol:cresoles de 1:1.

En la **etapa III** se retomaron nuevamente las concentraciones iniciales, es decir, 550 mg/L de fenol, 132 mg/L de *para*-cresol y 132 mg/L de *orto*-cresol, haciendo una relación fenol:cresoles de 2:1 .

2. Efecto del extracto de levadura en la biodegradabilidad del orto-cresol

Esta parte del experimento abarca la **etapa IV** de la operación del Reactor **A**. En esta fase se eliminó el extracto de levadura de la composición del medio mineral, conservando las mismas concentraciones de **CAF** que en la etapa anterior: 550 mg/L de fenol, 132 mg/L de *para*-cresol y 132 mg/L de *orto*-cresol, manteniendo una relación fenol:cresoles de 2:1.

La Tabla 3.2 presenta las concentraciones de compuestos *alquil*-fenólicos con que se alimentó el Reactor **A**, por etapa.

Tabla 3.2 Etapas de operación del Reactor A

Compuesto	Etapa I-A	Etapa II-A	Etapa III-A	Etapa IV-A
	1			2
	concentración			(mg/L)
fenol	550	610	550	550
<i>para</i> -cresol	132	305	132	132
<i>orto</i> -cresol	132	305	132	132

3.1.2 Reactor B

Este reactor se operó por más de 340 días, en tres etapas. Su análisis se divide de acuerdo a los objetivos específicos en dos partes:

3. Efecto del meta-cresol en la biodegradabilidad de una mezcla fenol/*para*-cresol

Esta parte del experimento engloba las dos primeras etapas de operación del reactor.

En la **etapa I** o de arranque, se observó la influencia del *meta*-cresol en la biodegradación del fenol y *para*-cresol a concentraciones de 550 mg fenol/L, 132 mg *p*-cresol/L y 132 mg *m*-cresol/L, lo que hace una relación fenol:cresoles de 2:1.

En la **etapa II**, debido a que la remoción del *meta*-cresol no era constante, se disminuyó la carga orgánica en el afluente, reduciendo la concentración de fenol a la mitad, de manera que se igualó la relación fenol:cresoles a 1:1 (250 mg fenol/L 132 mg *p*-cresol/L : 132 mg *m*-cresol/L).

4. Efecto del orto-cresol en la biodegradabilidad de una mezcla fenol / para-cresol / meta-cresol

En la **etapa III**, al tener una remoción eficiente y estable de todos los compuestos, se incluyó también *orto*-cresol en el medio de alimentación y se mantuvo la relación fenol:cresoles en 1:1, con las respectivas concentraciones: 250 mg fenol/L, 88 mg *p*-cresol/L, 88 mg *m*-cresol/L y 88 mg *o*-cresol/L.

La Tabla 3.3 presenta las concentraciones de compuestos *alquil*-fenólicos con que se alimentó el Reactor **B**, por etapas de operación.

Tabla 3.3 Etapas de operación del reactor B

	Etapa I-B	Etapa II-B	Etapa III-B
	3		4
Compuesto	concentración (mg/L)		
fenol	550	250	250
<i>para</i> -cresol	132	132	88
<i>meta</i> -cresol	132	132	88
<i>orto</i> -cresol			88

3.2 Sistemas en lotes

Se llevaron a cabo pruebas de biodegradabilidad en lotes empleando como inóculo lodo granular proveniente del Reactor **A** al final del experimento en continuo.

5. Determinación de las velocidades específicas de degradación y producción de metano

Como medio mineral basal se empleó la misma composición descrita para los sistemas continuos (Tabla 3.1). Se realizaron en cinco diferentes tratamientos o experimentos: fenol, al igual que *para*, *orto* y *meta*-cresol adicionados como única fuente de carbono y energía, así como una mezcla terciaria de fenol, *para* y *orto*-cresol. Las concentraciones en que se adicionaron se describen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Tratamientos en las pruebas de biodegradabilidad

Tratamiento	fenol (mg/L)	p-cresol (mg/L)	o-cresol (mg/L)	m-cresol (mg/L)
1	550	-	-	-
2	-	132	-	-
3	-	-	132	-
4	-	-	-	132
5	550	132	132	132

Las pruebas de biodegradabilidad se realizaron en botellas serológicas de 120 mL a las que se adicionó 50 mL de medio mineral basal y compuestos fenólicos de acuerdo a la siguiente metodología:

- Las botellas se inocularon con 1.9 g SSV/L de lodo adaptado y se sellaron con un tapón de vitón y un arillo de aluminio.
- Se realizó un cambio de atmósfera para desplazar el aire atmosférico haciendo pasar por las botellas una corriente de Nitrógeno-Dióxido de carbono (70-30 %) por 15 minutos.
- Las botellas inoculadas y con atmósfera anóxica se incubaron a 30°C por 24 horas.
- Transcurrido este período y tras desechar las botellas cuyo medio mineral no se encontrara en condiciones anaerobias (según el color del indicador redox) se inyectaron los compuestos *alquil*-fenólicos de acuerdo a la Tabla 3.4 e incubaron a 30°C por 16 días.

Cada tratamiento se realizó por triplicado, además de llevar un control, sin compuestos fenólicos, para cuantificar el metano endógeno. Durante el transcurso del experimento se tomaron muestras líquidas para la cuantificación de los compuestos fenólicos y muestras de gas en el espacio de cabeza para la determinación de metano.

El cálculo de producción de metano teórico se hizo considerando la ley de los gases ideales, la presión barométrica promedio de la Ciudad de México de 585 mmHg, temperatura de 30 °C, según se describe en el Anexo1 .

3.3 Técnicas Analíticas

3.3.1 Mediciones en los reactores

En los sistemas continuos se monitorearon sistemáticamente tanto en el afluente como en el efluente el pH, producción de metano, concentración de compuestos fenólicos y DQO. De la misma manera se corroboraba diariamente el flujo para tener una estimación diaria del TRH. La determinación de SSV se realizó al inicio y término de la operación de los reactores. En la Tabla 3.5 se resumen los parámetros cuantificados y la respectiva técnica utilizada en las mediciones.

Tabla 3.5 Técnicas analíticas de los parámetros cuantificados en los sistemas continuos.

Determinación	Técnica	Referencia
pH	Potenciómetro <i>Oakton</i> RS-232	
Metano	Desplazamiento de una columna de NaOH	(Iniestra-González y Razo-Flores, 2000)
Compuestos fenólicos	Cromatografía de gases	Zhou y Fang, 1997;
SSV	Peso seco	APHA (1989)
DQO	Equipo <i>Hach</i> (microDQO)	APHA (1989)

El gas desplazado en la columna de NaOH se transformó a base molar de acuerdo a la ecuación de los gases ideales, considerando la presión atmosférica de la Ciudad de México de 585 mmHg y el volumen, según el desplazamiento vertical de la columna y su diámetro de 5.5 cm. Se comparó con el metano teórico, calculado en base a las relaciones estequiométricas (Iniestra-González, 2001) y a la DQO transformada (Speece, 1996), relaciones que se muestran en la Tabla 3.6 . El cálculo se describe en el Anexo1.

Tabla 3.6 Constantes de transformación en metano

4.25 mol metano/ mol cresol
3.5 mol metano / mol fenol
0.35 L CH_4 / 1g DQO^2 (0 °C, 760 mmHg)

En la determinación de la DQO se aplicaron factores de dilución, para el afluente de 10 x y el efluente de 5 x. Cada determinación se realizó por duplicado y se obtuvo el promedio de ambos valores, que son los graficados en el anexo 2.

3.3.2 Métodos cromatográficos

En este estudio se cuantificaron los compuestos fenólicos mediante cromatografía de gases. Sin embargo, para descartar la acumulación de intermediarios aromáticos de degradación en los sistemas continuos, se realizaron esporádicamente barridos en la región UV (Resultados no mostrados).

3.3.2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se analizaron en un cromatógrafo de gases **HP 8690**. Las muestras se transfirieron en viales de 1mL que se sellaron para evitar pérdida de compuestos por volatilización. El cromatógrafo cuenta con un muestreador automático y sus características para las determinaciones de los sistemas continuos y en lote se resumen, respectivamente, en las Tablas 3.7 y 3.8. Las muestras que no se analizaron de manera inmediata se conservaron en congelación hasta su análisis.

Las concentraciones de compuestos fenólicos también se expresaron como DQO de acuerdo a las siguientes equivalencias: 1g DQO= 0.42 g de fenol =0.397 g de cresol.

Tabla 3.7 Condiciones en el cromatógrafo HP 6890 para la determinación de los compuestos fenólicos en sistemas continuos

Inyector	2 μ L (split 50:1)
Horno	180 °C (2°C/min) 200 °C (6 min)
Detector	Detector de Ionización de flama FID (275°C)
Gas acarreador	Helio
Columna	Alltech AT1000 50m x 250 μ m x 0.4 μ m

Tabla 3.8 Condiciones en el cromatógrafo HP 6890 para la determinación de los compuestos fenólicos en las pruebas por lote

Inyector	2 μ L (split 50:1)
Horno	180 °C (2°C/min) 190 °C 1 min 200°C 1 min
Detector	Detector de Ionización de flama FID (275°C)
Gas acarreador	Helio
Columna	Alltech AT1000 50m x 250 μ m x 0.4 μ m

En la figura 3.3 se muestra un cromatograma de la cuantificación los compuestos fenólicos para los sistemas continuos. Los respectivos tiempos de retención se muestran en la Tabla 3.9, así como los de una corrida del método usado en la detección de los experimentos por lotes. En general el orden de aparición fue: *orto*-cresol, fenol, *para*-cresol y *meta*-cresol. El área de los picos, resultante de los análisis cromatográficos se interpoló con la concentración de cada compuesto mediante la elaboración de curvas de estándar con coeficientes de correlación $r^2 > 0.99$

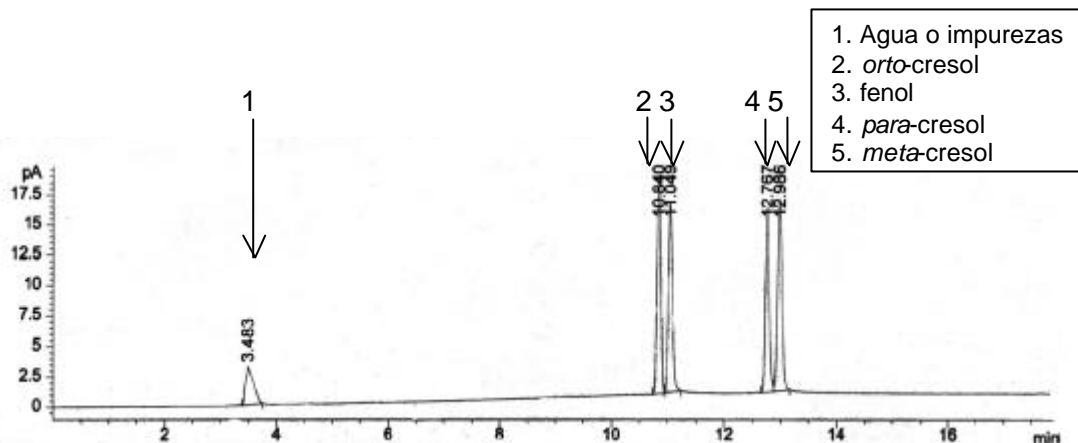


Figura 3.3 Cromatograma de la determinación de Compuestos alquil fenólicos los sistemas continuos.

Tabla 3.9 Tiempos de retención de los Compuestos alquil fenólicos según el método utilizado en la cuantificación

Compuestos	<i>orto</i> -cresol	fenol	<i>para</i> -cresol	<i>meta</i> -cresol
	Tiempo de retención (min)			
Sistemas continuos	10.84	11.049	12.767	12.986
Tratamientos por lote	8.978	9.164	10.616	10.792

3.3.2.2 Metano en los sistemas en lote

Para las pruebas en lote se cuantificó el metano mediante la inyección de 100 μ L de muestras gaseosas de cada botella, previa agitación para desorber el gas, en un cromatógrafo de gases **Hewlett Packard (HP) 6890** con las condiciones que se enumeran en la Tabla 3.10.

El área de los picos resultante del análisis cromatográfico se interpoló de curvas estándar ($r^2 > 0.99$). Estas se elaboraron en botellas serológicas de 120 mL selladas con tapón de hule y aro de aluminio, donde se reemplazó la atmósfera con una mezcla de N_2/CO_2 (70/30 %) y en las que después de nivelar la presión a 1 atm se extrajo un volumen conocido de aire e inyectó el mismo de metano.

Tabla 3.10 Condiciones del cromatógrafo de gases HP 6890 para la cuantificación del metano de las pruebas en lote.

Condiciones para la determinación de metano en el cromatógrafo HP 6890	
Volumen de inyección	100 μ L
Inyector (T)	150°C
Horno (T)	120 °C
Detector (T)	Detector de Ionización de flamaFID (250°C)
Gas acarreador (<i>make up</i>)	Helio 51.9 mL/min
Columna	HP-1 30m x 0.32 mm x 0.25 μ m

El cálculo de concentración de compuestos fenólicos, metano y DQO se hizo mediante la interpolación con curvas de estándares. En la Tabla 3.11 se resume la ecuación promedio de cada curva estándar, el número de curvas utilizadas en la elaboración de este cuadro estadístico.

Para la cuantificación de compuestos fenólicos, debido a que se hicieron ajustes en el método de detección a lo largo de la fase experimental se presentó cierta variabilidad en las curvas de estándares. Sin embargo, periódicamente se realizó la inyección de estándares y cada vez se obtuvieron ecuaciones con coeficientes de correlación superiores a 0.99 ($r^2 > 0.99$). De esta manera, las detecciones tanto de fenol, como *para-* y *meta-*cresol tuvieron coeficientes de variabilidad inferiores al 10% y la detección de *orto-*cresol tuvo un coeficiente de variabilidad del 11%, como se aprecia en la tabla 3.11.

Para la cuantificación de DQO, se analizó también una curva de estándares (biftalato de potasio) cada vez que se analizaron muestras. Aunque los coeficientes de correlación en las curvas siempre fue superior a 0.9 ($r^2 > 0.9$), los valores de la pendiente en la ecuación variaron entre 0.003 y 0.004 debido a que las soluciones utilizadas en la determinación fueron elaboradas por diferentes personas. Esto se refleja en un coeficiente de variabilidad del 10.7%

En la determinación de metano, debido a que se analizaron las muestras en intervalos cortos, se realizaron únicamente cuatro inyecciones de los estándares. Cada curva tuvo un coeficiente

de correlación superior a 0.99 ($r^2 > 0.99$). La pendiente promedio de la ecuación que relaciona el área de cromatograma y la concentración de metano fue de 111.83, y tuvo un coeficiente de variabilidad del 2.76%.

Tabla 3.11. Resumen estadístico de las curvas de calibración

	fenol	p-cresol	m-cresol	o-cresol	metano	DQO
Ecuación	$y=0.3038 x$	$y=0.3035 x$	$y=0.334 x$	$Y=0.3207 x$	$y=111.83x$	$y=0.003$
r^2	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.9
n	9	9	9	9	4	30
C.V %	9.041	9.885	3.807	10.958	2.75	10.7

CAPÍTULO 4

Resultados y Discusiones

4. Resultados y discusiones

En este estudio se desarrollaron experimentos tanto en sistemas continuos como en lote. La primera parte de los experimentos correspondió a la operación de dos reactores tipo UASB. Al finalizar su operación se desarrollaron pruebas de biodegradabilidad en botellas serológicas inoculadas con lodo metanogénico de uno de los reactores y los compuestos fenólicos objeto de este estudio.

En este capítulo se presentan los resultados divididos principalmente de acuerdo al tipo de sistema (en continuo y en lote).

4.1 Sistemas Continuos

Se utilizaron dos reactores UASB de 160 mL (Reactor **A** y Reactor **B**) inoculados con lodo granular metanogénico adaptado a fenol y *para*-cresol, en los que se estudió el efecto de un tercer compuesto (*orto* y *meta*-cresol, respectivamente) sobre la biodegradabilidad de una mezcla de fenol y *para*-cresol. También se eliminó el extracto de levadura en el medio de alimentación del Reactor **A**, a fin de determinar su importancia en la biodegradación del *orto*-cresol dentro de una mezcla terciaria. Finalmente se alimentó una mezcla cuaternaria en el Reactor **B** con el fin de estudiar la biodegradabilidad de una mezcla rica en compuestos fenólicos.

4.1.1 Reactor A

El reactor se operó durante un período de 280 días y su operación se dividió en cuatro etapas respecto a cambios en la composición del medio de alimentación (figura 3.1). En este reactor se evaluó:

1. El efecto del *orto*-cresol en la biodegradabilidad de una mezcla fenol/*para*-cresol.
2. El efecto del extracto de levadura en la remoción del *orto*-cresol.

La biomasa dentro del reactor, medida como sólidos suspendidos volátiles (**SSV**) al final del experimento fue de 19.71 g SSV/L. Durante la operación del reactor, el pH se mantuvo

constante alrededor de 6.9, así como el Tiempo de Retención Hidráulico (**TRH**) alrededor de 0.7 días. Estos resultados, así como las concentraciones de compuestos fenólicos expresados como carga orgánica, eficiencia de remoción de DQO y de producción de metano, se muestran en tabla 4.1. En el anexo 1 se muestra una comparación entre el metano teórico (calculado a partir de la DQO y compuestos fenólicos) y el experimental.

En el anexo 2 se muestran comparativamente, a lo largo del tiempo de operación, las concentraciones de la DQO a la entrada y salida del reactor (figura A2-1), las concentraciones globales expresadas como DQO teórica (figura A2-2) y las concentraciones individuales de cada compuesto (figuras A2-3, A2-4 y A2-5).

Tabla 4.1 Resumen de resultados obtenidos al operar el reactor A, por etapas.

	Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV
Duración (días)	141	41	46	52
Tiempo de retención (días)	0.67 ±0.03	0.71 ±0.12	0.77 ±0.12	0.70 ±0.17
pH de efluente	6.91 ±0.3	6.83 ±0.20	6.78 ±0.16	6.93 ±0.19
carga fenol (kg DQO/m ³ d)*	2.052 ±0.23	2.56 ±0.22	1.98 ±0.47	2.35 ±0.18
carga p-cresol (kg DQO/m ³ d)*	0.44 ±0.07	1.16 ±0.09	0.48 ±0.1	0.58 ±0.05
carga o-cresol (kg DQO/m ³ d)*	0.44 ±0.06	1.27 ±0.09	0.39 ±0.06	0.54 ±0.08
carga total (kg DQO/m ³ d)*	2.95 ±0.31	4.99 ±0.33	2.86 ±0.54	3.47 ±0.26
Eficiencia de remoción DQO**	81.78 ±4.78	66.6 ±12	72.6 ±9.6	75.9 ±7.3
Rendimiento de metano (%)***	103	60	75.3	76.3

*Concentración expresada como carga orgánica

** DQO experimental

***Calculado respecto al esperado estequiométricamente.

1. Efecto del orto-cresol en la biodegradación de una mezcla fenol/ para-cresol.

Esta parte del experimento comprendió un período de 228 días de operación del reactor **A** y engloba las tres primeras etapas de operación del reactor. Los resultados se muestran en la figura 4.1, donde en la gráfica A se ilustra la concentración de los compuestos fenólicos a la entrada, expresados como carga orgánica. En la gráfica B se muestra la eficiencia de remoción por compuesto y en la gráfica C se muestra la DQO remanente y eficiencia de remoción global.

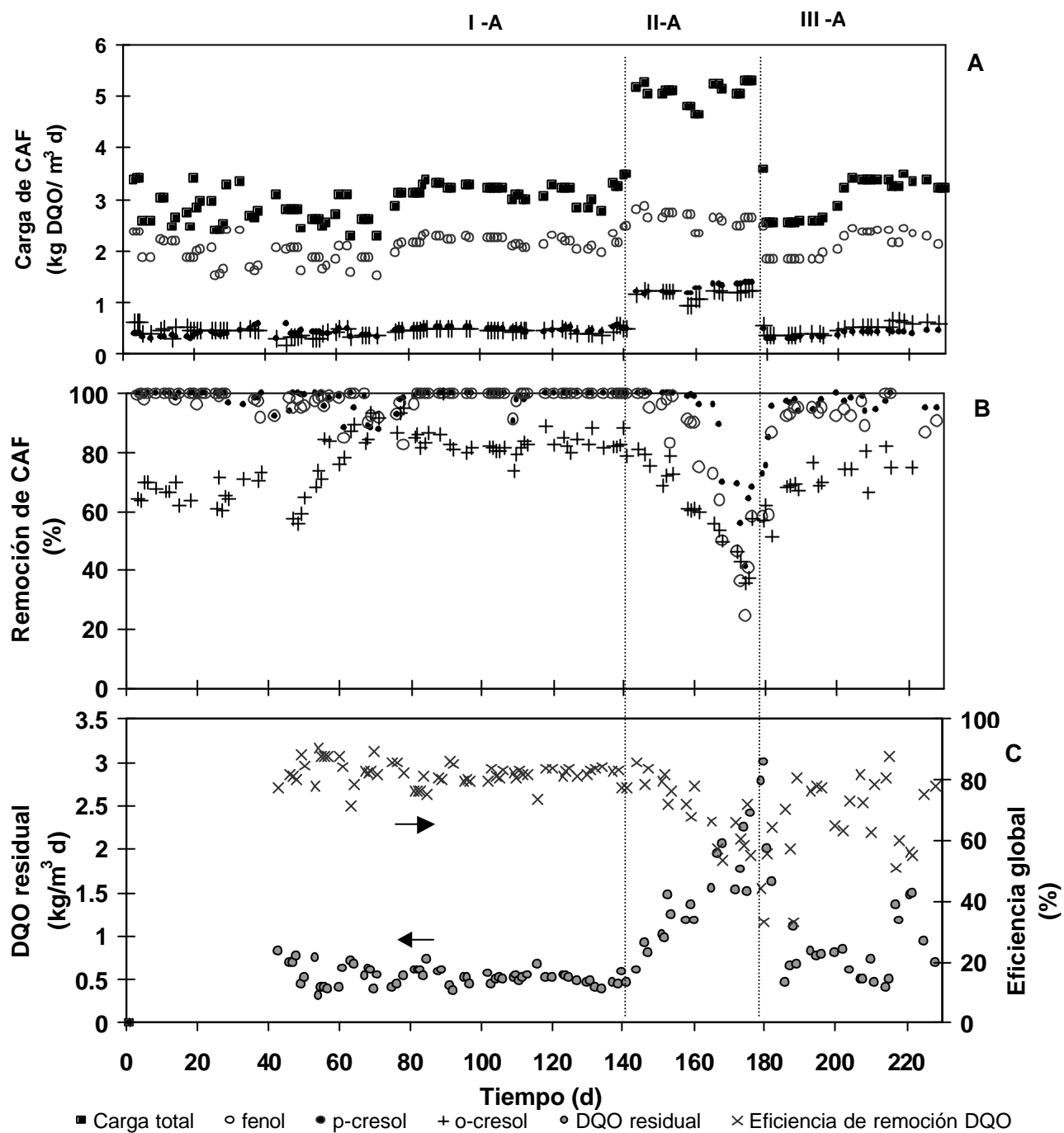


Figura 4.1 Efecto del *o*-cresol en la biodegradabilidad del fenol y *p*-cresol. **A.** Carga orgánica de compuestos *alquil*-fenólicos por compuesto **B.** Eficiencias de remoción de los compuestos *alquil*-fenólicos **C.** Eficiencia de remoción global y DQO en el efluente

Etapa I-A

Al inicio de la operación se alimentó una carga orgánica promedio de 3 kg DQO/m³ d, como se muestra en la gráfica A de la figura 4.1. Las cargas individuales que se alimentaron fueron 2 kg DQO_{fenol}/m³ d (550 mg/L de fenol), 0.5 kg DQO_{p-cresol}/m³ d (132 mg/L de *para*-cresol) y 0.5 kg DQO_{o-cresol}/m³ d (132 mg/L de *orto*-cresol), lo que hace una relación 2:1 (fenol:cresoles)

Como se observa en la gráfica B de la figura 4.1, las eficiencias de biodegradación de fenol y *p*-cresol fueron inicialmente superiores al 95%. La eficiencia de remoción del *orto*-cresol que inicialmente tuvo valores cercanos al 70%, después de un período de adaptación de 65 días aumentó hasta llegar al 80%, cuando alcanzó una fase estacionaria. En ésta, el fenol y *para*-cresol alcanzaron eficiencias de hasta 100% de remoción.

Como se muestra en la tabla 4.1 y en la gráfica C de la figura 4.1, la eficiencia de remoción de DQO fue de alrededor del 82% durante la fase estacionaria de esta etapa. La DQO residual promedio fue de **481 mg DQO/L d** (337 mg/L), que es significativamente mayor que la totalidad del *orto*-cresol alimentado, es decir **440 mg DQO/L d** (301 mg DQO/L). En la figura A2.12 se muestra gráficamente la similitud entre ambos valores: DQO residual y *orto*-cresol alimentado, expresado como DQO. Aunque en el análisis cromatográfico no se observó la aparición de picos diferentes a los correspondientes a los compuestos alimentados y en el efluente no se detectaron compuestos que absorben luz en el espectro UV (lo que indica la ausencia de compuestos aromáticos), la diferencia del 10% entre ambos valores, sugiere que posiblemente el *orto*-cresol no sea mineralizando sino únicamente transformando. La eficiencia de formación de metano en esta etapa, fue del 108% lo que se atribuye a algún error experimental: Hubo entrada de aire en la columna de medición a consecuencia que no estaba bien sellada o no se absorbió eficientemente el dióxido de carbono en la columna debido a que se hubiera agotado el hidróxido de sodio.

Globalmente, la eficiencia de remoción de DQO del 82% es inferior a la reportada por Hajji *et al.* (1999), del 98% empleando 0.025% de suero como cosustrato y concentraciones de 150, 35 y 35 mg/L de fenol, *para* y *orto*-cresol, respectivamente, en un reactor de biopelícula inoculado con una mezcla de dos consorcios adaptados a fenol/*orto*-cresol y *para*-cresol, con un tiempo de retención hidráulica de 6 horas a 29°C. Tampoco encontraron metabolitos intermediarios. La diferencia con los resultados reportados por Hajji se puede deber a que la concentración de

orto-cresol que se alimenta en el presente estudio es mayor (132 mg/L) y, siendo el compuesto que se remueve con menor eficiencia y que, aparentemente no se mineraliza, afecta de manera global a la remoción de DQO.

Hajji *et al.* (2000) encontraron, después de 276 días de adaptación para un lodo granular anaerobio en un reactor UASB, eficiencias de remoción del 100, 56 y 100% respectivamente para el fenol, *orto* y *para*-cresol, encontrando 50 mg/L de ácido 4-hidroxi-3-metil benzoico y 18 mg/L de ácido *meta*-toluico. Un reactor bioaumentado con 1.8 g SSV/L_{reactor} de lodo adaptado a fenol, *para* y *orto*-cresol alcanzó eficiencias de remoción de hasta el 100% del fenol y 95% del *para*-cresol, respectivamente, en 36 días. Para el *orto*-cresol se alcanzó una eficiencia de remoción hasta del 77% en 276 días, encontrando trazas de ácido *m*-toluico intermitentemente. Los resultados experimentales de este estudio se asemejan a los del reactor bioaumentado por Hajji *et al.*,(2000) en las eficiencias de remoción: El lodo inoculado inicialmente removió cerca del 100 de fenol y *para*-cresol y a los 60 días de adaptación era capaz de remover cerca del 80% del *orto*-cresol (ver figura 4.1 B). El corto tiempo de adaptación del *orto*-cresol se puede deber a que la capacidad de degradar al fenol, es decir la capacidad de llevar a cabo reacciones de carboxilación y deshidroxilación, ya se encontraba desarrollada en el lodo al inocular y éstas son el mismo tipo de reacciones que las empleadas en la ruta de degradación del *orto*-cresol. (Bisaillon, 1991, Schie *et al.*, 2000)

Suponiendo que el *orto*-cresol sigue la ruta de biodegradación propuesta por Bisaillon *et al.* (1993) en la que hay una carboxilación inicial seguida de una deshidroxilación, se tiene la formación de un metabolito que se ha identificado como ácido 3-metil benzoico (*m*-toluico) que inhibe la subsecuente transformación. Iniestra (2001) reportó que un lodo aclimatado transformó en pruebas por lotes 150 mg/L *orto*-cresol (como única fuente de carbono y energía) en un metabolito que no identificó y que presuntamente se trata del mismo ácido *m*-toluico.

En ninguna referencia consultada se reporta más del 80% de remoción de *o*-cresol, lo se puede deber que sigue una ruta de biodegradación muy semejante a la del fenol y presuntamente realizada por los mismos microorganismos de la población mixta, de manera que compiten. Este último se degrada a una velocidad mayor en sistemas por lotes (Iniestra, 2000), por lo que es “preferido” sobre el *orto*-cresol, lo que explica que quede remanente a la salida del reactor.

Aunque se sabe que la presencia de *orto*-cresol disminuye las velocidades de degradación del fenol y *para*-cresol en sistemas por lotes (Iniestra, 2001), no alteró la biodegradabilidad de la

mezcla en el Reactor **A**, a las condiciones de este experimento, ya que el fenol y *para*-cresol se degradaron hasta a un 100% con una relación fenol:cresoles de 2:1, hecho que coincide con las observaciones de Hajji *et al.*, 2000.

Etapa II-A

Como se aprecia en la gráfica **A** de la figura 4.1, en esta etapa (días 142-180) el reactor se sometió a una carga orgánica promedio de 5 kg DQO/m³ d, con cargas individuales de 2.56 kg DQO_{fenol}/m³ d : (610 mg/L de fenol), 1.16 kg DQO_{p-cresol}/m³ d (310 mg/L de *p*-cresol) y 1.27 kg DQO_{o-cresol}/m³ d (310 mg/L de *o*-cresol), haciendo una relación 1:1 (fenol:cresoles)

Este cambio en la carga orgánica trajo como consecuencia una caída en las eficiencias de remoción, llegando a ser tan bajas como el 55% para el fenol y 40% para ambos isómeros de cresol, respectivamente, como se aprecia en la gráfica **B** de la figura 4.1. Después de 34 días en estas condiciones se observó una creciente y rápida recuperación del reactor (día 175). Al final de esta etapa la eliminación del fenol y ambos isómeros de cresol aumentó a niveles de 75 y 60%, respectivamente.

Como se aprecia en la gráfica **C** de la figura 4.1, la eficiencia en la remoción de DQO bajó hasta niveles del 50% al día 170 y al final de esta etapa alcanzó hasta un 60%. El rendimiento de producción de metano respecto del teórico fue hasta del 60% al final de la etapa. (Tabla 4.1)

Las máximas concentraciones de compuestos fenólicos alimentadas a los reactores en esta etapa se encuentran por debajo de las concentraciones de inhibición del 50% de la actividad metanogénica acetoclasta reportadas por Olguín-Lora *et al.*(2001) y Puig-Grajales *et al.* (2000) : IC₅₀ = 2916 mg/L, 856 mg/L, 1054 mg/L.(fenol, *orto*- y *para*-cresol respectivamente)

Fang y Zhou (2000) utilizaron un reactor UASB con lodo adaptado con un TRH de 24 horas y encontraron que la eficiencia de remoción bajó drásticamente al alimentar una carga de 5.2 kg/m³ d .(1430/500 mg/L, respectivamente fenol/*p*-cresol) Al reducir la carga a 2.2 kg/m³ d, el reactor recobró su eficiencia de remoción del 98% de DQO después de 10 días. Esto indica que la inhibición en la bioactividad debido a un aumento intempestivo en la concentración de fenol y *p*-cresol no es permanente y la biomasa es capaz de recuperar su actividad plenamente cuando la concentración de compuestos fenólicos es reducida.

Etapa III-A

Durante esta etapa, que abarcó del día 186 hasta el 228, el reactor se sometió nuevamente a una carga de 3 kg DQO / m³ d, como se muestra en la gráfica **A** de la figura 4.1 y en la tabla 4.1. Se alimentaron las mismas concentraciones que en la Etapa IA: 550 mg/L de fenol, 132 mg/L de *para*-cresol y 132 mg/L de *orto*-cresol, lo que hace una relación fenol:cresoles de 2:1

La recuperación del reactor fue inmediata y se alcanzaron eficiencias de remoción promedio de 95, 91 y 70% para el fenol, *p*- y *o*-cresol, respectivamente. La eficiencia de remoción global fue del 72% de la DQO y se formó metano con una eficiencia del 75%, respecto al teórico.

Al regresar el reactor a las condiciones iniciales no hubo una completa recuperación, como se aprecia de comparar las eficiencias de remoción global 82% vs 72% de la DQO, etapas IA y III-A, lo que se debe a que las eficiencias de remoción no alcanzaron los mismos valores que en la etapa inicial.

2. Efecto del extracto de levadura en la biodegradabilidad del *orto*-cresol

Etapa IV-A

El día 229 se eliminó el extracto de levadura de la composición del medio de alimentación del Reactor **A** para determinar su efecto en la biodegradación del *orto*-cresol. Se alimentó la misma carga de 3kg/m³ d, con la misma relación 2:1 (fenol: cresoles) y las mismas concentraciones de **CAF** que en la etapa anterior. Se mantuvieron estas condiciones hasta el día 278. Las concentraciones de alimentación, expresadas como carga orgánica se muestran en la tabla 4.1. En la gráfica **A** de la figura 4.2 se muestra la concentración de compuestos fenólicos a la entrada individual y globalmente, expresados como carga orgánica, en la gráfica **B** se compara la eficiencia de remoción, por compuesto y en la gráfica **C** se muestra la DQO a la salida y la eficiencia de remoción global.

La biodegradación del fenol, *p*-cresol y *o*-cresol disminuyó inmediatamente, siendo la de este último compuesto la más afectada: su eficiencia de remoción se redujo a niveles tan bajos como el 40%, como se puede ver en la gráfica **B** de la figura 4.2. Las eficiencias de degradación del fenol y *para*-cresol bajaron a niveles del 95 y 90%, respectivamente.

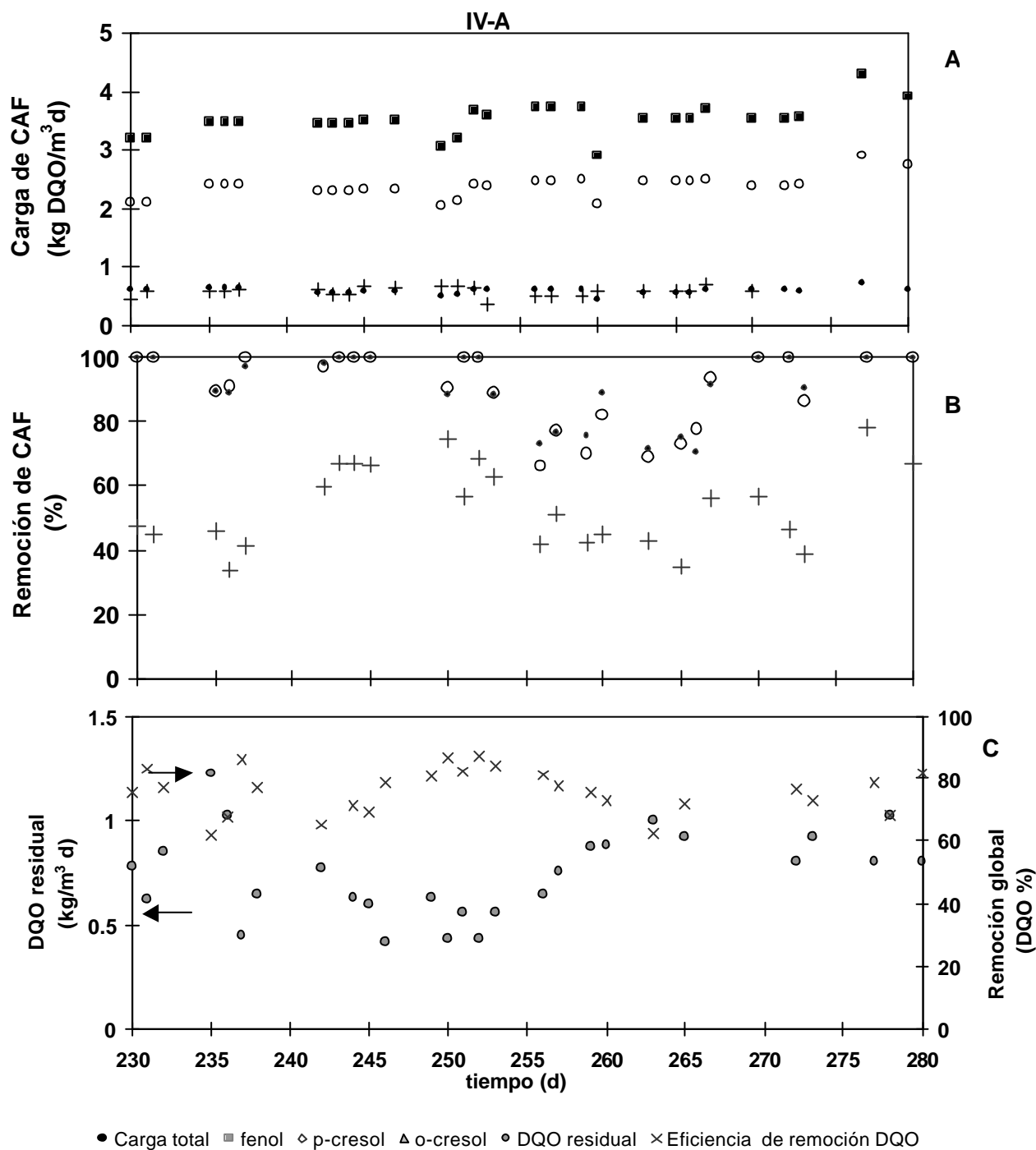


Figura 4.2 Efecto del extracto de levadura en la remoción de *o*-cresol. A. Carga orgánica de compuestos *alquil*-fenólicos por compuesto B. Eficiencias de remoción de los compuestos *alquil*-fenólicos C. Eficiencia de remoción global y DQO en el efluente

Después de cinco días de iniciada esta etapa se recuperó la eficiencia de remoción de fenol y *para*-cresol a niveles de 100% y después de 21 días de hecho el cambio en la composición del medio, removi6 hasta en un 60% la concentración de *orto*-cresol, aunque no se alcanz6 una fase estacionaria. Este hecho es muy relevante ya que adem6s de reportarse como el is6mero m6s recalcitrante, se menciona como indispensable la adici6n de alg6n sustrato de enriquecimiento, ya sea peptona o extracto de levadura, para su metabolizaci6n. (Bisaillon *et al.*, 1991b)

La eficiencia de remoci6n global fue de 76% de la DQO, como se muestra en la tabla 4.2 y en la gr6fica **C** de la figura 4.2. De la misma manera que en la etapa I-A, la cantidad de *orto*-cresol alimentada (342 mg DQO/L) es muy semejante a la DQO remanente, a la salida del reactor (375 mg DQO/L). La semejanza de estos valores, sugiere que este compuesto no se mineraliza, sino 6nicamente se transforma. La producci6n de metano tuvo una eficiencia del 75% (Tabla 4.1), respecto del te6rico. Al final del per6odo se alcanz6 una remoci6n superior al 70% de *orto*-cresol, lo que demuestra la posibilidad de que en ausencia de extracto de levadura, los organismos capaces de degradar el *orto*-cresol y fenol puedan adaptarse.

En el an6lisis cromatogr6fico tampoco se identific6 la aparici6n de picos diferentes a los correspondientes a los compuestos alimentados. Aunado a la ausencia de compuestos que absorben luz en el intervalo UV se confirma la ausencia de metabolitos intermediarios arom6ticos. Esto sugiere que los compuestos que se acumulan en el medio (DQO) son 6cidos grasos.

Bisaillon *et al.* (1991, b) mencionan la necesidad de adicionar sustratos de enriquecimiento como lo es la peptona (0.05% p/v), el extracto de levadura (0.05% p/v) o una mezcla de amino6cidos (lisina y triptofano) para adaptar un consorcio al fenol, aunque despu6s de la aclimataci6n ya no es necesario. El extracto de levadura contiene una gran cantidad de prote6inas, amino6cidos y p6ptidos (45-60%) y contiene adem6s l6pidos, nucle6tidos (ARN), vitaminas y minerales por lo que es una fuente de nutrientes relativamente barata (Jeong Chae *et al.*, 2001). Schie *et al.* (2000) mencionan la necesidad de amino6cidos y factores de crecimiento para que los microorganismos involucrados en la biodegradaci6n de compuestos fen6licos lleven a cabo la reacci6n de carboxilaci6n, que es el inicio de la ruta de biodegradaci6n del fenol y *orto*-cresol. Tambi6n mencionan que una vez desarrollada la capacidad de llevar a cabo esta reacci6n, el suministro de amino6cidos deja de ser

indispensable. En este sentido puede pensarse que el papel de este sustrato de enriquecimiento es de inductor.

Después de un largo período de adaptación (230 días) y que se han desarrollado los sistemas enzimáticos necesarios, los compuestos adicionados se integran al metabolismo de la población microbiana como fuente de carbono y energía. Tal es el caso del fenol y *para*-cresol en lodos adaptados (Fang y Zhou. 2000; Iniestra , 2001). Es posible que la adición del extracto de levadura no sea necesaria porque el consorcio microbiano presente en el lodo ya ha desarrollado la capacidad de llevar a cabo reacciones de carboxilación-deshidroxilación en moléculas semejantes al fenol. De esta manera, estos dos compuestos o sus intermediarios pueden jugar un papel de cosustratos en la ruta de metabolización del *orto*-cresol, siendo las enzimas relativamente inespecíficas, actuando sobre una serie de moléculas íntimamente relacionadas. De cualquier manera este hecho es relevante dado que para lograr la metabolización de una mezcla de fenol, *para* y *orto*-cresol no es necesario agregar un cosustrato o sustrato de enriquecimiento, que pudiera elevar el costo del tratamiento del agua. Sin embargo, este efecto aún debe evaluarse a largo plazo.

4.1.2 Reactor B

El reactor se operó por más de 340 días. Su funcionamiento se dividió a su vez en tres etapas debido a cambios en la composición de alimentación, en las que se estudiaron:

3. El efecto del *meta*-cresol en la biodegradación del fenol y *para*-cresol.
4. La biodegradabilidad de una mezcla cuaternaria con fenol y los isómeros de cresol.

El pH se mantuvo constante a valores de 6.9, a lo largo del tiempo de operación y lo mismo que el tiempo de retención, a valores de 0.6 d. Estos resultados se muestran en la tabla 4.2. Los valores de carga corresponden a la concentración de cada compuesto, cuantificada por cromatografía y expresada como DQO por volumen de reactor y unidad de tiempo.

En el anexo 1 se muestra una comparación entre el metano teórico, calculado a partir de la remoción de compuestos fenólicos, el calculado a partir de la DQO y el experimental.

En el anexo 2 se muestran comparativamente las concentraciones a la entrada y a la salida del reactor B, para cada compuesto, así como de la concentración global, expresada como DQO teórico y la DQO (figuras A2-6, A2-7, A2-8, A2-9 y A2-10).

Tabla 4.2 Resumen de resultados obtenidos al operar el reactor B, por etapas.

	Etapa I		Etapa II		Etapa III
Duración (días)	141		41		165
Tiempo de retención (días)	0.66	±0.05	0.66	±0.15	0.63 ±0.07
pH de efluente	6.95	±0.25	6.89	±0.22	6.90 ±0.25
carga fenol (kg DQO/m ³ d)*	2.22	±0.21	1.12	±0.15	1.02 ±0.17
carga p-cresol (kg DQO/m ³ d)*	0.45	±0.07	0.51	±0.05	0.33 ±0.06
carga m-cresol (kg DQO/m ³ d)*	0.46	±0.08	0.48	±0.05	0.30 ±0.05
carga o-cresol (kg DQO/m ³ d)*					0.30 ±0.08
carga total (kg DQO/m ³ d)*	3.13	±0.31	2.13	±0.18	1.95 ±0.33
Eficiencia de remoción DQO**	80.04	±6.03	90.00	±5.14	78.8 ±14.6
Eficiencia de producción de metano (%)***	76		100		72

*Concentración expresada como carga orgánica

** DQO experimental (mic roDQO)

*** Calculado respecto a la DQO alimentada.

3. Efecto del meta-cresol en la biodegradabilidad de una mezcla fenol / p-cresol

Se estudió en el efecto de la adición del isómero *meta*-cresol a una mezcla de fenol y *p*-cresol en el Reactor **B** en las dos primeras etapas de operación del reactor **B**, durante un período de 182 días.

En la gráfica A de la figura 4.3 se muestran las concentraciones de alimentación, individuales y global, expresadas como carga orgánica, en la gráfica **B** se compara la eficiencia de remoción, por compuesto y en la gráfica **C** se muestra la concentración de DQO a la salida y la eficiencia de remoción global.

Etapa I-B

Al inicio de la operación se alimentó una carga de 3 kg DQO/m³ d. Las concentraciones individuales que se alimentaron fueron de 2.2 kg DQO_{fenol}/m³ d (550mg/L de fenol), 0.45 kg DQO_{p-cresol}/m³ d (132 mg/L (*para*-cresol) y 0.45 kg DQO_{m-cresol}/m³ d (132 mg/L (*meta*-cresol). Estos valores se muestran en la tabla 4.2 y en la gráfica **A** de la figura 4.3. Estas concentraciones corresponden a una relación fenol:cresoles de 2:1 y se mantuvieron por 141 días.

Como se aprecia de la gráfica B de la figura 4.3, la eficiencia en la remoción de fenol al inicio de esta primer etapa es menor al 10% y aumenta lentamente conforme transcurre el tiempo de operación. Después de 60 días de adaptación la eficiencia de remoción alcanza un nivel del 95%, en el que permanece el resto de la etapa. El *para*-cresol se remueve inicialmente a una eficiencia del 80% y después de 10 días se alcanza el 99%, nivel al que permanece el resto de la etapa. La biodegradación del *meta*-cresol no se alcanza a estabilizar y oscila alrededor del 31%. Como se aprecia en la gráfica C de la figura 4.3, la eficiencia de remoción de DQO se mantiene a niveles del 83%. La concentración de *meta*-cresol que se alimentó al reactor, expresada como DQO fue de 304 mg DQO/L y la DQO en el efluente de 382 mgDQO/L (figura A2.13), lo que sugiere que el *meta*-cresol, al igual que el *orto*-cresol del reactor 1 solamente se transforma, de manera que se acumulan compuestos intermediarios en el medio, sin llegar a la mineralización.

En esta primera etapa se produjo metano con una eficiencia del 76% respecto del teórico calculado en base a la remoción de la DQO. En el análisis cromatográfico no existe la aparición de picos diferentes a los correspondientes a los compuestos alimentados, lo que aunado a que no hay acumulación de compuestos que absorban luz en el espectro UV lleva a deducir que los intermediarios que se acumulan no son de naturaleza aromática.

En estos resultados se aprecia que el *meta*-cresol afecta la biodegradación del fenol, ya que a diferencia del reactor **A**, en que se alimenta *orto*-cresol, la eficiencia de remoción es inicialmente muy inferior. El efecto negativo del *meta*-cresol sobre el fenol disminuye con el tiempo, logrando la adaptación en 60 días.

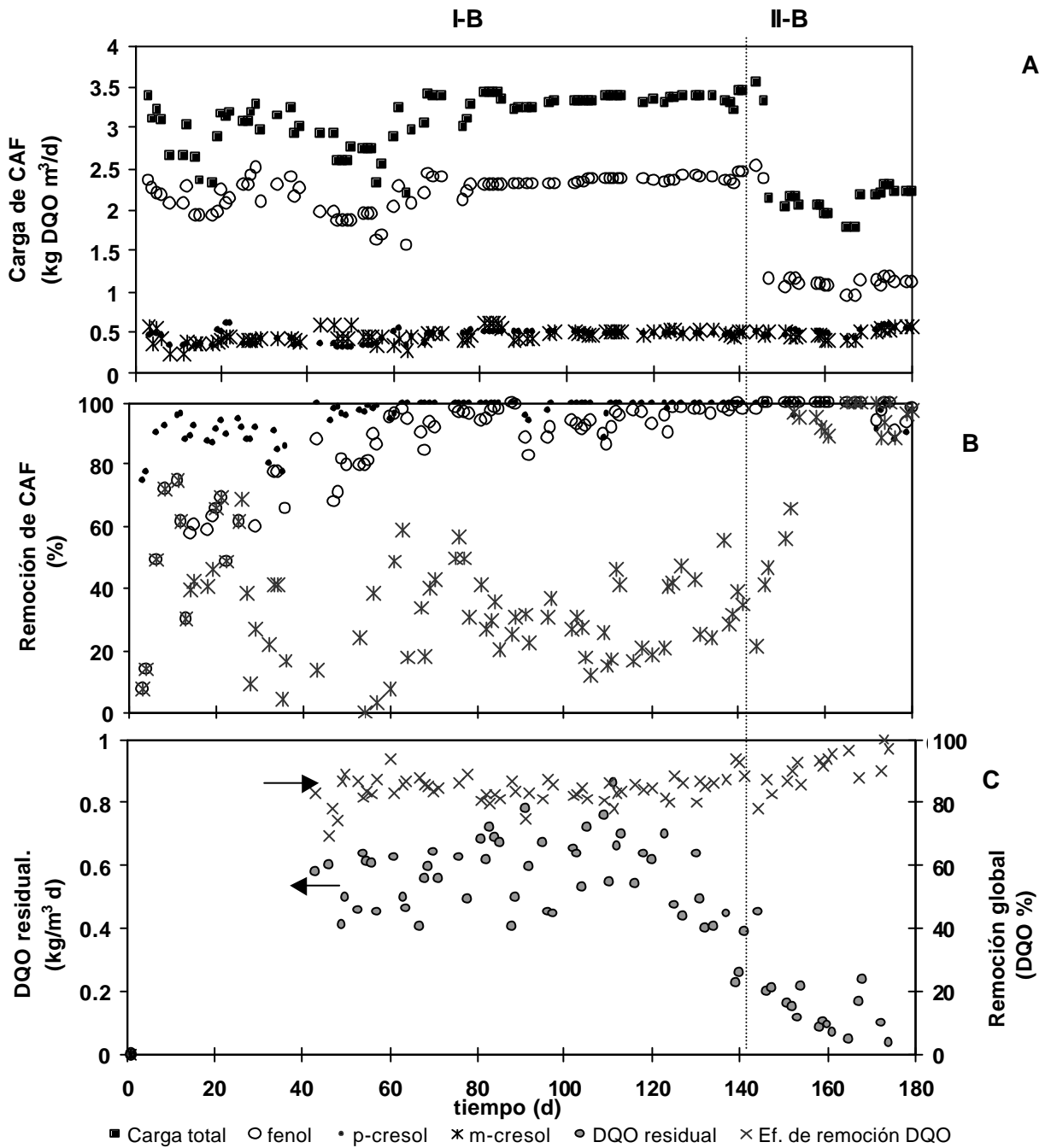


Figura 4.3 Efecto del m-cresol en la biodegradabilidad de fenol y p-cresol **A**. Carga orgánica de compuestos alquil-fenólicos por compuesto. **B** Eficiencias de remoción de los compuestos alquil-fenólicos **C**. Eficiencia de remoción global y DDO en el efluente

Zhou y Fang (1997) reportan una remoción del 98 % y 20% para fenol y meta-cresol a concentraciones de 900 y 320 mg/L, respectivamente, a 37°C y un tiempo de retención hidráulica de 1 día con recirculación. Reportan también que la eficiencia de remoción de fenol no se afecta por la misma concentración de meta-cresol, a 600 mg/L. Sin embargo, por encima de 800 mg/L comienza a deteriorarse. La actividad metanogénica específica disminuye al aumentar la concentración de meta-cresol, lo que indica que inhibe la degradación del fenol.

El consorcio que degrada *m*-cresol, degrada el *p*-cresol con facilidad (Ramanand y Suflita, 1991). Esto se debe a que el *p*-hidroxibenzoato (**4-OHBz**) es metabolizado por el consorcio y es un metabolito común en las rutas de degradación de ambos compuestos. La biodegradación de *para*-cresol no se ve afectada por la presencia de meta-cresol, lo que sugiere que las rutas de degradación del *meta* y *para*-cresol son esencialmente diferentes y que las del *meta*-cresol y el fenol están relacionadas.

La ruta metabólica por la cual es degradado el *m*-cresol en condiciones metanogénicas, es vía una *para*-carboxilación inicial, seguida de una aparente desmetilación y deshidroxilación para producir ácido benzoico (Schie *et al.*, 2000; Londry *et al.*, 1993, Ramanand y Suflita, 1991). En esta ruta metabólica se tiene la formación de un intermediario, el 4-hidroxi-2-metilbenzoato, que inhibe la subsecuente transformación del cresol (prefiriéndose el metabolismo de este intermediario). También la baja eficiencia en la remoción del *m*-cresol se debe a que el *para*-hidroxibenzoato, que es un intermediario común, inhibe la subsecuente transformación de manera que la degradación de este intermediario es preferida: Cuando estos dos compuestos están presentes (*meta*-cresol y *para*-hidroxibenzoato) se inhibe la carboxilación del *meta*-cresol hasta que sea removido por completo este intermediario (Ramanand y Suflita, 1991).

Etapa II-B

Debido a la falta de estabilidad del reactor, en lo que se refiere a la remoción de *m*-cresol en la etapa anterior, durante la segunda fase o etapa II-B se disminuyó la carga orgánica, reduciendo a la mitad la concentración de fenol, compuesto que se sabe afecta de manera directa la degradación del *m*-cresol (Ramanand y Suflita, 1991).

A partir del día 144 se alimentó una carga orgánica de $2.1 \text{ kgDQO/m}^3 \text{ d}$, con concentraciones individuales (expresadas como carga orgánica) de $1.1 \text{ kg DQO}_{\text{fenol}}/\text{m}^3 \text{ d}$ (250 mg/L de fenol), $0.5 \text{ kg DQO}_{\text{p-cresol}}/\text{m}^3 \text{ d}$ (125 mg/L de *para*-cresol) y $0.5 \text{ kg DQO}_{\text{m-cresol}}/\text{m}^3 \text{ d}$ (125 mg/L de *orto*-cresol). Estos valores se muestran en la tabla 4.2 y en la gráfica **A** de la figura 4.3. Las concentraciones alimentadas corresponden a una relación fenol:cresoles de 1:1, El reactor se operó en estas condiciones hasta el día 178.

Como se aprecia en la gráfica **B** de la figura 4.3, de inmediato se observó un efecto positivo sobre la eficiencia de eliminación del fenol y *m*-cresol a consecuencia del cambio: después de un período de 10 días la eficiencia de remoción para estos compuestos en promedio fue del 98% y 95%, respectivamente (figura 4.3 B). El *p*-cresol no se vio afectado por este cambio manteniendo valores de degradación de alrededor del 100%.

Después de un período de 20 días de iniciada esta etapa se alcanzaron eficiencias de remoción de hasta el 100% para todos los compuestos involucrados: fenol, *p*- y *m*-cresol, tiempo en el que se alcanzó una fase estacionaria, como se aprecia en la gráfica **B** de la figura 4.3.

En la gráfica **C** de la figura 4.3 se aprecia el aumento abrupto en la eficiencia de remoción de DQO, alcanzando después de un período de 20 días una eficiencia del 90%, hecho que aunado a la eficiencia de formación de metano del 100%, demuestra la mineralización de estos compuestos bajo condiciones de metanogénesis.

Al disminuir la carga, reduciendo la concentración de fenol, se logró la completa biodegradación de los compuestos involucrados. Esto puede deberse a que, al tener el afluente menor concentración de fenol, hubo por consiguiente menor producción de *para*-hidroxibenzoato, de manera que en el equilibrio dentro del reactor no afectó a la degradación del *meta*-cresol.

A diferencia del *orto*-cresol en el Reactor **A**, el isómero *meta* interfiere inicialmente con la eficiencia de degradación del fenol, aunque después de un período de adaptación deja de afectarla. Al igual que el *orto*-cresol tampoco afecta la biodegradabilidad del *para*-cresol en el Reactor **B**.

4. Biodegradabilidad de una mezcla cuaternaria de fenol , p-, m- y o-cresol

Etapa III-B

Se adicionó *orto*-cresol a la mezcla terciaria del reactor **B** y alimentó una carga de casi 2 kg DQO / m³ d, con concentraciones de 1 kg DQO_{fenol} / m³ d (250 mg/L de fenol), 0.33 kg DQO_{p-cresol} / m³ d (88 mg/L de *para*-cresol), 0.33 kg DQO_{m-cresol} / m³ d (88 mg/L de *meta*-cresol) y 0.33 kg DQO_{o-cresol} / m³ d (88 mg/L de *orto*-cresol.) Estas concentraciones componen una relación fenol:cresoles a 1:1 y se muestran en la tabla 4.2 y gráfica **A** de la figura 4.4 El reactor se dejó de operar el día 347.

Como se aprecia en la gráfica **B** de la figura 4.4, las eficiencias de remoción no se vieron afectadas por la introducción del *orto*-cresol a la mezcla terciaria en la etapa anterior. Se removieron un 99% del fenol y del *meta*-cresol, y el 100% del *p*-cresol. La eficiencia en la degradación del *orto*-cresol aumentó lentamente hasta llegar a ser hasta del 65% luego de 120 días, aunque no se estabilizó en este período.

En la gráfica **C** de la figura 4.4, se observa que la remoción de la DQO oscila alrededor del 80%. En este período se alcanza una eficiencia de formación de metano del 72%, respecto al teórico. De manera semejante que en el reactor **A**, la DQO residual de 252 mg/L, es muy semejante a la DQO alimentada como *orto*-cresol (215 mg/L), lo que sugiere que el *orto*-cresol no se mineraliza, sino únicamente se transforma (ver figura A2-13). Esta es posiblemente la razón de la baja eficiencia de formación de metano.

Tampoco en esta fase hubo la aparición de picos diferentes a los que corresponden a los compuestos alimentados y no hubo acumulación de compuestos que absorben luz en el espectro UV, lo que representa la ausencia de metabolitos aromáticos intermediarios de la biodegradación, de manera que los intermediarios que se acumulan son de naturaleza alifática, presuntamente ácidos grasos.

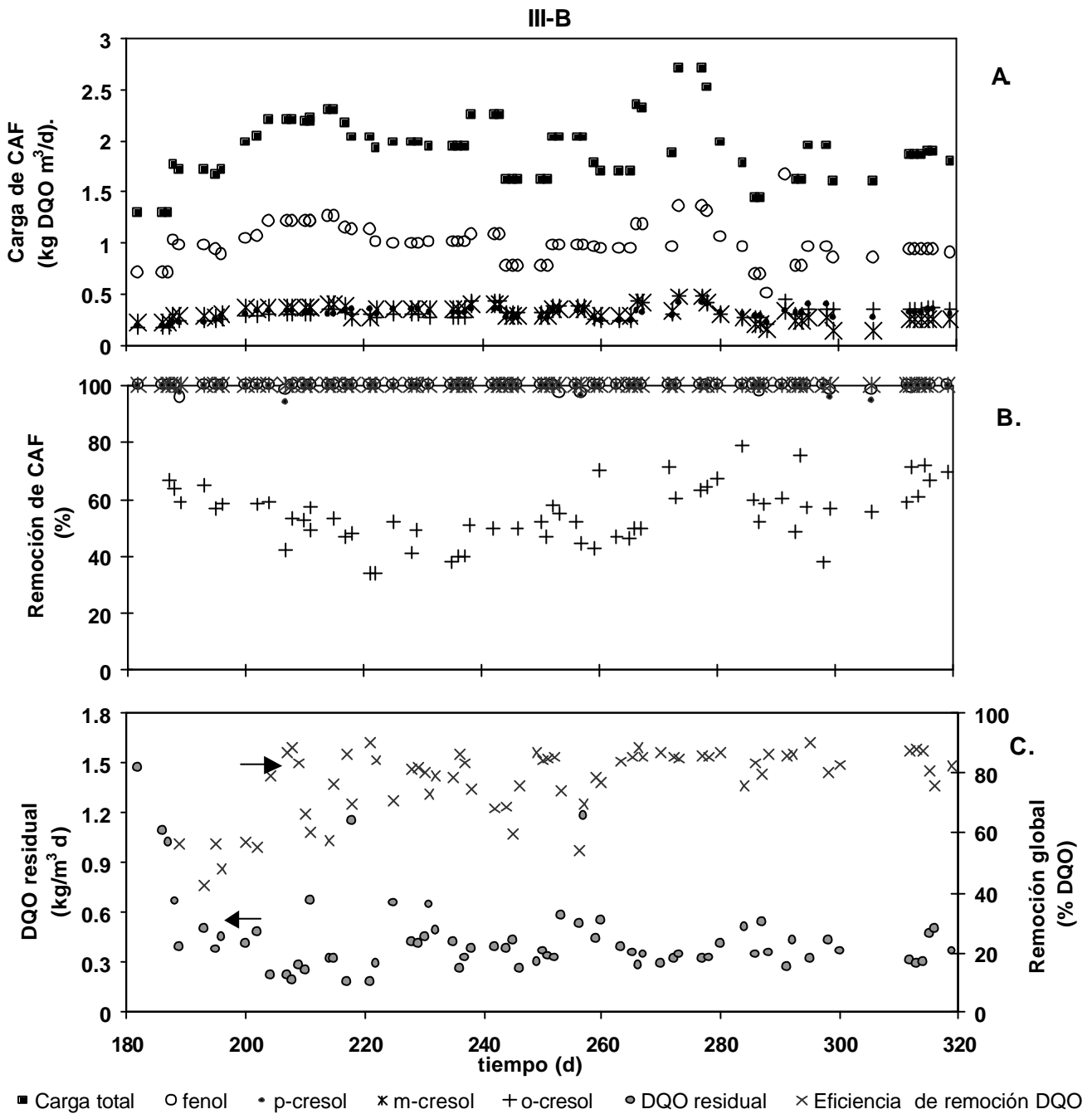


Figura 4.4 Biodegradabilidad de una mezcla cuaternaria **A.**Carga orgánica de compuestos *alquil*-fenólicos por compuesto **B.** Eficiencias de remoción de los compuestos *alquil*-fenólicos **C.**Eficiencia de remoción global y DQO en el efluente

Al adicionar el cuarto isómero a la mezcla (*orto*-cresol) no se afecta la eficiencia de degradación de los otros tres compuestos involucrados: fenol, *para* y *meta*-cresol, debido a que solamente compite con el fenol y por ello, al ser más lenta se degradación su eficiencia de remoción es baja, de entre el 40 y 65%. Aún así, este es un hecho relevante dado que Wang *et al.* (1988) y Charest *et al.*, (1999) reportan que no se degrada este compuesto en la misma mezcla cuaternaria, además que globalmente la máxima eficiencia de remoción del 70%, coincide con la reportada.

4.2 Sistemas en lotes

Con el fin de determinar la capacidad del lodo metanogénico del reactor **A** para biodegradar los compuestos alquil-fenólicos utilizados en este estudio, se realizaron pruebas por lotes, al final del experimento continuo, en botellas serológicas de 120 mL con 50 mL de medio y 1.9 g SSV/L, a 30°C. El experimento constó de cinco diferentes tratamientos: se adicionó cada compuesto individualmente y en una mezcla terciaria con las concentraciones alimentadas inicialmente al reactor **A**.

4.2.1 Compuestos fenólicos

En la figura 4.5 se muestra gráficamente la evolución en la concentración de metano y la disminución en la concentración de compuestos fenólicos. En estas gráficas se aprecian la fase de adaptación (*lag*), así como las pendientes de las curvas, correspondientes a la velocidad de degradación de los compuestos fenólicos y a la velocidad de producción de metano en su fase lineal. No se degradaron el *orto* y *meta*-cresol adicionados como única fuente de carbono y energía (tratamientos 3 y 4), razón por la que no se muestran sus resultados.

El lodo procedente del reactor **A** al momento en que cesó su funcionamiento degradó 550 mg/L de fenol adicionados como única fuente de carbono y energía (tratamiento 1) a una velocidad de **58.3 mg DQO/ g SSV d**, sin período de adaptación. El fenol desapareció del medio a las 385 horas de incubación, tiempo en el que se alcanza la máxima producción de metano, según se aprecia en la figura 4.5 A.

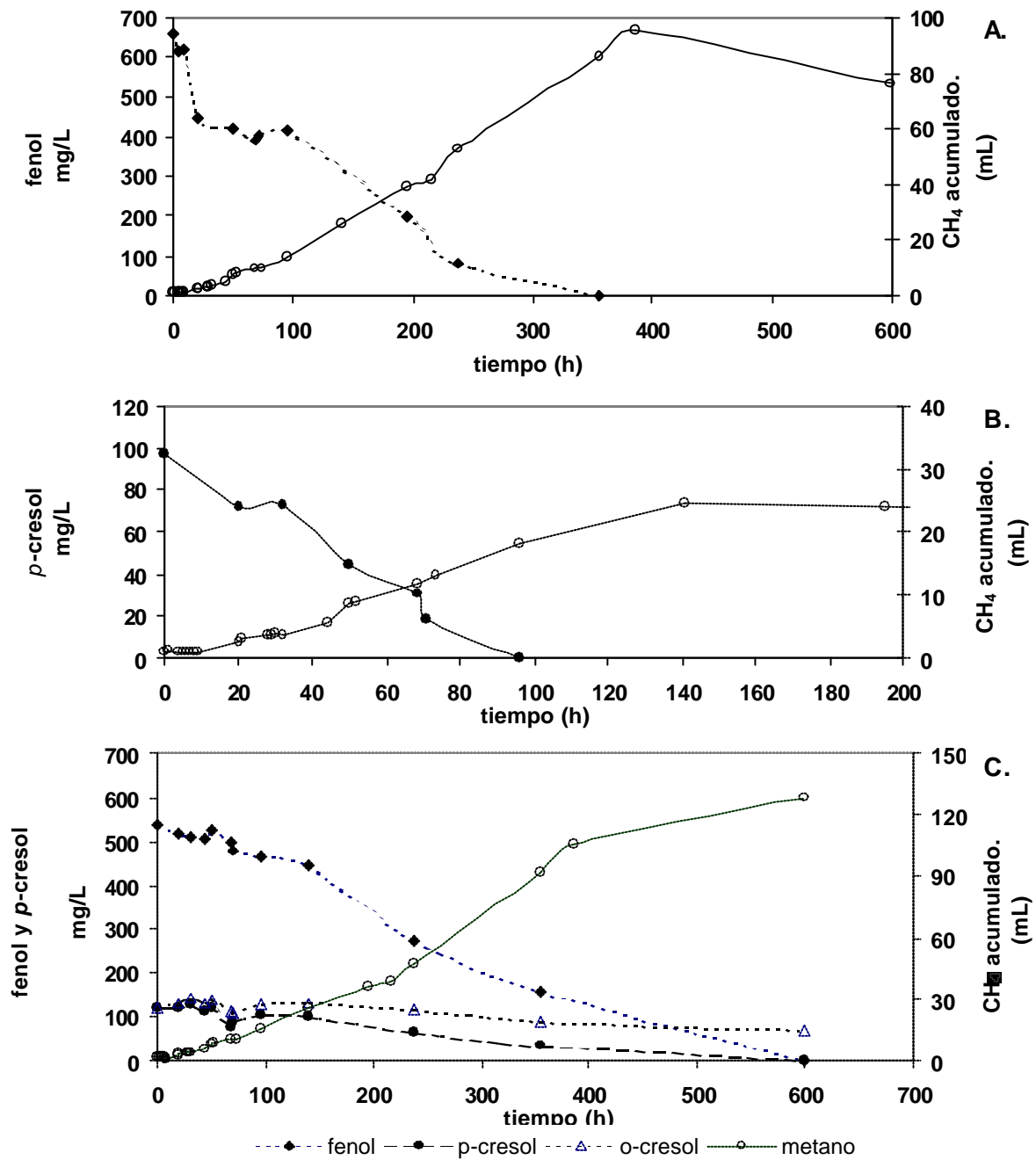


Figura 4.5 Pruebas de biodegradabilidad en lotes. **A.** Tratamiento 1 (550 mg/L de fenol), **B.** Tratamiento 2 (132 mg/L *para*-cresol) **C.** Tratamiento 5 (mezcla 550mg/L fenol, 132 mg/L *para*-cresol y 132 mg/L *orto*-cresol)

El *para*-cresol, adicionado como única fuente de carbono y energía a una concentración de 132 mg/L (tratamiento 2), fue degradado a una velocidad de **45.78 mg DQO/ g SSV d** sin mostrar tampoco una apreciable fase de adaptación. Este compuesto desapareció del medio a las 96 horas, tiempo en el que también se alcanzó la máxima producción de metano (figura 4.5 B). En la tabla 4.3 se concentran las velocidades a las que se degradaron los compuestos fenólicos estudiados.

Tabla 4.3 Velocidades de degradación de los compuestos *alquil*-fenólicos, por tratamiento.

Tratamiento	Velocidad de remoción			
	mg DQO/ gSSV d			
	o-cresol	fenol	p-cresol	m-cresol
1		58.39		
2			45.78	
3	0			
4				0
5	4.22	37.16	8.86	

En la mezcla de 550 mg/L fenol, 132 mg/L *para*-cresol y 132 mg/L de *orto*-cresol (tratamiento 5) el fenol comenzó a desaparecer del medio después de un tiempo de adaptación de 60 horas a una velocidad de **37.16 mg DQO/ g SSV d**, mientras que el *para* y *orto*-cresol se degradaron, respectivamente, a velocidades de **8.86 y 4.22 mg DQO/ g SSV d**. El *para*-cresol tuvo una fase de adaptación de 100 horas, mientras que el *orto*-cresol la tuvo de 140 horas. (figura 4.5 C). Hay una disminución del 36% en la velocidad de degradación de fenol y de 80% del *para*-cresol en mezcla terciaria con *orto*-cresol, respecto a los tratamientos en que se alimentaron solos. La remoción completa de los compuestos se dio a las 600 horas de incubación.

En el análisis cromatográfico no se observó la aparición de picos diferentes a los de los compuestos inoculados, de lo que se deduce que no hay acumulación de compuestos intermedios de la biodegradación o ésta es a concentraciones por debajo de la sensibilidad del equipo.

En las pruebas de biodegradabilidad por lote donde se adicionaron fenol y *para*-cresol como únicas fuentes de carbono y energía no se observó fase de adaptación (*lag*) debido a que los sistemas se inocularon con lodo adaptado, además de que estos dos compuestos son los más fácilmente biodegradables. Esto coincide con las observaciones de Iniestra (2001).

Aunque el lodo inoculado fue capaz de degradar el *orto*-cresol en el sistema continuo hasta con una eficiencia del 80%, no fue capaz de degradarlo en los sistemas por lotes en los que se agregó como única fuente de carbono y energía. Esto se puede deber a la ausencia de fenol y *para*-cresol que presuntamente juegan, éstos o sus intermediarios de degradación, un papel inductores. Esto mismo ocurre con el *meta*-cresol que, aunque es menos tóxico que el isómero *orto*-, el lodo no cuenta con los sistemas enzimáticos necesarios para asimilar esta molécula como fuente de carbono y energía. Estas mismas observaciones fueron reportadas por Wang *et al.*, (1988) y Zhou y Fang (1997).

El lodo degradó el fenol a una velocidad mayor que el *para*-cresol, ambos individualmente, lo que corrobora que el fenol es más fácilmente biodegradable que el fenol sustituido (O'Connor y Young, 1996).

La presencia del *orto*-cresol hace disminuir las velocidades de remoción de los demás **CAF**. En la mezcla terciaria el fenol se degradó a una velocidad mayor que ambos isómeros, *orto* y *para*-cresol, respectivamente **37.1, 4.2 y 8.8 mg DQO/g SSV·d**. La velocidad de degradación de fenol disminuye respecto a la mezcla libre de *o*-cresol, lo que puede deberse a su efecto tóxico, además que al seguir una ruta de degradación muy semejante de carboxilación y deshidroxilación compitan entre ellos (Bisailon, 1991 b). El *orto*-cresol también produce una disminución apreciable en la velocidad de degradación del *p*-cresol, lo que está de acuerdo con lo observado por Iniestra (2001).

Wang *et al.* (1988) encontraron que en mezcla, la degradación del *para*-cresol comienza solamente cuando se ha agotado el fenol, además que su velocidad de degradación es aproximadamente cinco veces menor, fenómeno que atribuyen al hecho que el lodo inoculado en su experimento había sido cultivado en fenol. En el presente estudio se coincide con lo reportado por Iniestra (2001) referente a que el fenol y *para*-cresol comienzan a degradarse simultáneamente en una mezcla y que la velocidad de degradación del fenol es mayor que la de *para*-cresol. Iniestra (2001) reporta velocidades de degradación, para una mezcla de 200

mg/L de fenol, 100 mg/L de *para*-cresol y 150 mg/L de *orto*-cresol de **116.58, 71 y 20 mg DQO/g SSV d, respectivamente**.

La diferencia entre las velocidades reportadas por Iniestra (2000) y las halladas en este estudio es posible que se deba a que el lodo inoculado en los sistemas por lotes, después de haber sido expuesto por un período de 280 días a *orto*-cresol haya disminuido su capacidad de biodegradación a consecuencia de la toxicidad de este compuesto.

4.2.2 Metano

El tratamiento 1, alimentado con 550 mg/L fenol, tuvo un rendimiento en la producción de metano del 99.9%, respecto al teórico, a las 385 horas, momento en que se hizo la última determinación. El tratamiento 2, alimentado con *para*-cresol, tuvo un rendimiento del 99.62%, respecto al teórico a las 140.5 horas. El tratamiento 5, alimentado con la mezcla tuvo un rendimiento del 108%, valor que se puede deber a algún error en las tomas de muestra ya que no se removió completamente el *orto*-cresol. En la tabla 4.3 se muestran estos resultados.

Los valores de eficiencia cercanos al 100%, aunados a la completa eliminación de los sustratos alimentados y la ausencia de picos diferentes a los alimentados (en el análisis cromatográfico), lleva a concluir que los compuestos se mineralizaron completamente y no hubo acumulación de intermediarios.

O'Connor y Young (1996) emplearon sedimentos del Río Este (Nueva York) como inóculo en pruebas por lotes y reportaron un rendimiento en metano superior al 96% para concentraciones de 47-141 mg/L de fenol con un tiempo de adaptación de entre 3.8 y 6.5 semanas. De la misma manera reportan eficiencias, del 95% para 54 mg/L (0.35 mmol) de *orto*-cresol, con un período de adaptación de entre 18.3 a 21.7 semanas; del 115% para 54 mg/L (0.35 mmol) de *meta*-cresol y 118% con 54 mg/L (0.35 mmol) de *para*-cresol, ambos con una fase de adaptación de entre cero y 8.5 semanas. Los intervalos en el tiempo de adaptación se deben a su espaciada frecuencia de muestreo. Concluyen que el *orto*-cresol inhibe la actividad metanogénica.

En contraste con los resultados reportados por O'Connor y Young, en el presente estudio no hubo actividad metanogénica en los tratamientos alimentados con *orto*- y *meta*-cresol como únicas fuentes de carbono y energía. Esto es debido a que el lodo inoculado no tuvo suficiente

tiempo para adaptarse ya que como reportan, el tiempo requerido es del orden de entre las 18 y 21 semanas (3000 a 3500 horas).

En la tabla 4.4 se muestran también las velocidades específicas de producción de metano, por tratamiento. El *tratamiento 1*, que contiene 550 mg/L fenol, tuvo la velocidad de producción de metano más alta: **2.89 mL/ g SSV h** (137.61 mg DQO-CH₄/ g-SSV-d), junto con el *tratamiento 5*, que contiene la mezcla de 550 mg/L de fenol, 132 mg/L de *para*-cresol y 132 mg/L de *orto*-cresol: **2.83 mL/ g SSV h** (134.76 mg DQO-CH₄/ g-SSV-d) El *tratamiento 2*, que contiene 132 mg/L de *para*-cresol desarrolló una velocidad de **1.99 mL/ g SSV h** (94.76 mg DQO-CH₄/ g-SSV-d). No se observó producción de metano en los tratamientos 3 y 4, que contienen respectivamente *orto* y *meta*-cresol individualmente. La semejanza entre las velocidades de los tratamientos 1 y 5 es posible que se deba a que se alimentaron concentraciones superiores a la saturación.

Tabla 4.4 Velocidades de Producción Específica de metano, por tratamiento.

	Producción específica de metano (mL/ g SSV h) (mg DQO-CH ₄ /g SSV d)		Rendimiento (%)
Tratamiento 1 (fenol)	2.89	137.61	99.9
Tratamiento 2 (<i>p</i> -cresol)	1.99	94.76	99.62
Tratamiento 3 (<i>o</i> -cresol)	0	0	0
Tratamiento 4 (<i>m</i> -cresol)	0	0	0
Tratamiento 5 (mezcla)	2.83	134.76	108

Zhou y Fang (1997) reportaron un lodo adaptado a fenol y *meta*-cresol con actividad metanogénica específica de 260 mg CH₄-DQO/g-SSV en pruebas por lote con 420 mg/L de fenol, así como de 70 mg CH₄-DQO/g-SSV con 159 mg/L de *para*-cresol. El mismo lodo no presentó actividad metanogénica frente a *orto* y *meta*-cresol adicionados como única fuente de carbono y energía. Estas concentraciones son semejantes a las utilizadas en este estudio y aunque el inóculo de Zhou y Fang (1997) tuvo una actividad metanogénica mayor al degradar el fenol, comparada con la de este estudio, fue inferior frente al *para*-cresol.

En el 2000 Fang y Zhou 2000 reportaron actividades metanogénicas de 250-300 mg CH₄-DQO/g-SSV y 70-80 mg CH₄-DQO/g-SSV para 420 mg/L de fenol y 159 mg/L de *para*-cresol, respectivamente, con un lodo granular metanogénico adaptado. Aunque se trata de un lodo con las mismas características de adaptación, es decir a fenol y *para*-cresol, ocurre que la actividad

metanogénica al biodegradar fenol es inferior en el presente estudio, sin embargo es mayor con el *para*-cresol.

Bisschops (2000), utilizando una mezcla de lodo granular adaptado y floculento no adaptado reporta velocidades de producción de metano de alrededor de 0.7-0.8 mL CH₄/g SSV h (33.3-38 mg CH₄-DQO/g SSV d) para fenol en concentraciones de entre 50 y 500 mg/L y de entre 0.7 y 1.4 mL mL CH₄/g SSV h (33.3-66 mg CH₄-DQO/g SSV d) con *para*-cresol a concentraciones de entre 50 y 500 mg/L.

Como se aprecia, la actividad metanogénica depende de las condiciones de aclimatación del inóculo. En el caso del presente estudio se desarrollaron las pruebas de biodegradabilidad empleando lodo con más de 280 días de adaptación a fenol, *para* y *orto*-cresol, además del tiempo que ya había estado expuesto solamente a la mezcla de fenol y *para*-cresol. No es posible dar una respuesta concluyente respecto de la capacidad de degradación del *meta* y *orto*-cresol individualmente porque posiblemente se dio por concluida la prueba antes que alcanzara la aclimatación a estos compuestos, dado que los tiempos que reportan O'Connor y Young (1996) con lodo no adaptado, son muy largos.

CAPÍTULO 5

Conclusiones

5. Conclusiones.

Acerca del efecto del *orto*-cresol sobre la mineralización del fenol y *para*-cresol se puede concluir que:

1. Alimentando una mezcla de fenol y *para*-cresol a una carga orgánica de 3 kg DQO/m³ d y una relación fenol:cresoles de 2:1 se tiene una remoción global del 80% de la DQO, lo que demuestra que es posible la mineralización de una mezcla de fenol y *para*-cresol en presencia de *orto*-cresol. El *orto*-cresol no es mineralizado por la población microbiana mixta, sino es transformado a compuestos intermedios no aromáticos, que no disminuyen la eficiencia de biodegradación.
2. La disminución en las eficiencias de biodegradación a consecuencia de un aumento en la carga orgánica de alimentación (5 kg DQO/ m³ d, fenol:cresoles (**f:c**), **2:1**), no es permanente, ya que al reducir la carga (3 kg DQO/ m³ d; **f:c** ,**2:1**) las eficiencias se recuperan inmediatamente.

Acerca del efecto del *meta*-cresol sobre la biodegradabilidad del fenol y *para*-cresol se puede concluir:

3. Alimentando una mezcla de fenol, *para* y *meta*-cresol a una carga orgánica de 3 kg DQO/m³ d y una relación **f:c** de **2:1**, se tiene una remoción global del 80% de la DQO, lo que demuestra que es posible la mineralización de una mezcla de fenol y *para*-cresol en presencia de *meta*-cresol. Al disminuir la carga a 2 kg DQO/ m³ d con una relación **f:c** de **1:1** se alcanza una remoción del 90% de la DQO, por lo que es completa la mineralización de la mezcla fenol, *para* y *meta*-cresol.
4. Después de 60 días se alcanzan eficiencias de remoción del 95%, 100% y 30% del fenol, *para* y *meta*-cresol, respectivamente. La baja eficiencia de remoción del *m*-cresol se explica por su ruta de biodegradación: Se relaciona con la del fenol convergiendo en el 4-hidroxibenzoato, compuesto que a su vez inhibe la degradación del *m*-cresol (Ramanand y Sufliita, 1991).
5. El lodo granular del reactor B necesitó de un período de adaptación de 60 días para degradar el fenol al 95% en presencia de *m*-cresol, por lo que la presencia de *m*-cresol afecta la biodegradabilidad del fenol, aumentando el tiempo de adaptación.

En lo que respecta a la biodegradabilidad de una mezcla cuaternaria de fenol, *p*, *m* y *o*-cresol puede concluirse que:

6. Es posible mineralizar una mezcla de fenol, *p*- y *m*-cresol a una carga orgánica de 2 kg DQO/ m³ d y una relación **f:c** de **1:1**, en presencia de 88 mg/L de *orto*-cresol. Este último compuesto se remueve al 65% después de un período de adaptación de 120 días. En estas condiciones el *orto*-cresol no se mineraliza sino únicamente se transforma a intermediarios no aromáticos, que no inhiben la biodegradabilidad de la mezcla.

Respecto del efecto de la ausencia del extracto de levadura en la biodegradabilidad del *orto*-cresol se puede concluir:

7. Las reacciones de biodegradación y transformación del fenol y *orto*-cresol (presuntamente carboxilación-deshidroxilación), se llevan a cabo en ausencia de extracto de levadura, por lo que no es indispensable la adición de este sustrato de enriquecimiento cuando se utiliza lodo adaptado.

De las pruebas de biodegradabilidad en lotes se puede concluir:

8. El *orto*-cresol no se degradó en un período de 650 horas al adicionarse como única fuente de carbono y energía a una concentración de 132 mg/L, debido a la ausencia de fenol y *para*-cresol, que posiblemente tengan efecto inductor.
9. El *meta*-cresol no se degradó en un período de 650 horas al adicionarse como única fuente de carbono y energía a una concentración de 132 mg/L, debido a la ausencia de fenol y *para*-cresol, que posiblemente tengan efecto inductor.
10. La velocidad de biodegradación del fenol es superior a la del *para* y *orto*-cresol en mezcla, lo que comprueba que el fenol sin sustituir se degrada más fácilmente que el sustituido.
11. En sistemas por lotes, la velocidad de biodegradación del fenol se reduce por la presencia de *orto*-cresol, lo que se puede deber a su toxicidad o a que siguen la misma ruta de biodegradación y compiten entre sí.
12. La actividad metanogénica de un lodo depende de sus características de adaptación.

En general, se puede concluir que:

- Es posible el tratamiento anaerobio y en condiciones de metanogénesis, de mezclas compuestas por fenol y cresoles (compuestos *alquil*-fenólicos), empleando lodo adaptado, adicionando o no extracto de levadura, empleando un reactor UASB.
- Se logra una remoción hasta del 100% de fenol, *p*- y *m*-cresol cuando la relación es de 1:1 (fenol:cresoles) en la mezcla alimentada. La concentración de fenol es un factor que afecta la biodegradabilidad del *meta*-cresol en sistemas continuos, por lo que debe considerarse la proporción para una remoción eficiente.
- El *orto*-cresol no se mineraliza en condiciones de metanogénesis al alimentarse en una mezcla con fenol y *para*-cresol a un sistema continuo, empleando lodo adaptado a fenol y *para*-cresol. Sin embargo, los metabolitos a los que se transforma y que no son de naturaleza aromática, no inhiben la degradación del fenol y *para*-cresol.
- Tanto el *orto*-cresol como el *meta*-cresol son compuestos para los que se tienen tiempos de adaptación muy largos cuando son adicionados como única fuente de carbono y energía en sistemas por lotes (O'Connor y Young,1996). Sin embargo, al adicionar junto a estos compuestos una fuente de carbono más accesible como lo son el fenol y *para*-cresol, se induce la biodegradación, acortándose este tiempo.

CAPÍTULO 6

Referencias

6.Referencias.

1. **Aldrich** (1998) Catálogo de productos *Sigma-Aldrich* U.S.A.
2. **APHA** (1985). Standard Methods for examination of water and wastewater, 16 ed., American Public Health Association, Washington D.C.
3. **Battersby, N. S. y Wilson, V.** (1989) Survey of anaerobic biodegradation potential of organic chemicals in digesting sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55** (2) : 433-439
4. **Bisaillon, J.-G., F. Lépine, R. Beaudet, y M. Sylvestre** (1991) Carboxylation of o-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2131–2134.
5. **Bisaillon, J. G., F. Lépine y R. Beaudet** (1991 b) Study of the methanogenic degradation of phenol via carboxylation to benzoate, *Can. J. Microbiol.*, **37**:573-576
6. **Bisaillon, J.G, F. Lépine, R. Beaudet y M. Sylvestre** (1993) Potential for Carboxylation-Dehydroxylation of Phenolic Compounds by a Methanogenic Consortium, *Can. J. Microbiol.*, **39** (7), 342-648
7. **Bisaillon, J.G.,R. Beaudet, F. Lépine y M. Sylvestre,** (1994) Microbiological study of the carboxylation of phenols by methanogenic fermentation - A summary, *Water Pollut. Res. J. Can.*, **29**(1):117-127
8. **Bisschops lemke** (2000) Effect of the presence of sulfide on the anaerobic biodegradability of phenol and *para*-cresol, Instituto Mexicano del Petróleo/Wageningen Universitet
9. **Blum, J, R. Hergenroeder, G.F. Parkin, y R.E. Speece** (1986) Anaerobic Treatment of Coal Conversion Water Constituents: Biodegradability and Toxicity, *Journal WPCF*, **58** (2):122-131
10. **Boone, D.R.** (1982) Terminal reactions in the anaerobic digestion of animal waste, *Appl. Env. Microbiol.*, **43**:57-64

11. **Charest, A., J.G. Bisailon, F. Lépine, y R. Beaudet** (1999) Removal of phenolic compounds from a petrochemical effluent with methanogenic consortium. *Can. J. Microbiol.* **45**:235-241
12. **Donlon B., Razo Flores E., Field J. y Lettinga G** (1995) Toxicity of NSustitued Aromatic to Acetoclastic Methanogenic Activity in Granular Sludge *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**:3889-3893
13. **Evans, W.C. y Fuchs G** (1988) Anaerobic degradation of aromatic compounds, *Ann. Rev. Microbiol.* **42**:289-317
14. **Fang, H** (2000) Microbial distribution in UASB granules and its resulting effects, *Water Sci. Technol* **42**:201-208
15. **Fang, H., y G.M. Zhou** (1997) Anaerobic degradation of benzoate and cresol isomers in sulfate-rich wastewater, *Wat. Sci. Tech.* **36 (6-7)**: 7-14
16. **Fang, H., y G.M. Zhou** (1999) *Degradation of Phenol and p-cresol in UASB reactors*, , “International Conference on wastes minimisation and end pipe treatment in chemical and petrochemical industries”, Mérida, Yucatán.
17. **Fang, H., y G.M. Zhou** (2000) Degradation of Phenol and p-cresol in reactors, *Water Sci. Tech* **42**:237-244
18. **Fedorak P.M. y Hudrey S.E.** (1984) The Effects of Phenol and some Alkilphenolics on Batch Anaerobic Methanogenesis. *Wat. Res.* **18(3)**:361-367
19. **Field J. y Lettinga G** (1987) The methanoghenic toxicity and anaerobic biodegradability of a hidrolizable tannin, *Wat. Res.*, **21**:367-374
20. **Franklin R. J.** (2001) Full Scale experiences with anaerobic treatment of Industrial Wastewater, *Anaeroc digestion for a sustainable development. Paper of the seminar of Prof dr. Gatzke Lettinga*, Wageningen, The Netherlands

21. **Gijzen Huub** (2001) Anaerobes, aerobes and phototrophs. A winning team for wastewater management , *Anaerobic digestion for a sustainable development. Paper of the seminar of Prof dr. Gatze Lettinga*, Wageningen, The Netherlands
22. **Guyot, J.P.** (1992) Introducción a la microbiología de los reactores anaerobios, Memorias del curso Digestión anaerobia UAM-ORSTOM-IMP,
23. **Hägglom Max M., Maria D. Rivera, Ingeborg D. Bossert, John E. Rogers y L.Y. Young** (1990) Anaerobic Biodegradation of *para*-cresol under three reducing conditions, *Microb Ecol*, **20**:141-150
24. **Hajji, KT, Lepine, F; Bisailon, J-G; Beaudet, R** (1999), Simultaneous removal of phenol, ortho- and para-cresol by mixed anaerobic consortia, *Can. J. Microbiol* **45**(4):318-325
25. **Hajji, KT, Lepine, F; Bisailon, J-G; Beaudet, R, Hawari J., Guiot S.** (2000), Effects of bioaugmentation strategies in UASB reactors with a methanogenic consortium for removal of phenolic compounds, *Biotechnology and Bioengineering*, **67**(4):417-423
26. **Harwood Caroline S., Gerhard Burchhardt, Heidrum Herrmann, George Fuchs** (1999) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway, *FEMS Microbiology reviews*, **22**:439-458
27. **Heider J. y G. Fuchs** (1997) Microbial Anaerobic Aromatic Metabolism, *Anaerobe*, **3**: 1-22
28. **Iniestra-Gonzalez M. y E. Razo-Flores** (2000) Degradation of phenol and Alkilphenols under methanogenic conditions. Memorias de Congreso Alburquerque
29. **Iniestra-González M. E.** (2001) Degradación de fenol y alquilfenoles bajo condiciones de metanogénesis en sistemas en lote y continuo, (Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ingeniería (Ambiental) presenta), Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
30. **Jeong Chae , Hyun Joo, Man-Jin In** (2001) Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract ... *Bioresource Technology*, **76**:253-258

31. **Kathleen L. Londry, Phillip M. Fedorak y Joseph M. Suflita** (1997) Anaerobic Degradation of m-Cresol by a Sulfate-Reducing Bacterium, *Appl. Environ. Microb.* **63**(8):3170-3175
32. **Kennes, Ch.,R. Méndez y J.M. Lema** (1997) Methanogenic degradation of p-cresol in batch and continuous UASB reactors, *Wat. Res.*, **31**, 1549-1554
33. **Klivanov A.M., Alberti.N, Morris. E.D. y Fleskin** (1980) Enzymatic Removal of Toxic Phenols and Anilines from Wastewater. *J. Appl. Biochem.* **2:414-421**
34. **Kishino, T. y Kobayashi, K.** (1994) Relation Between the Chemical Structures of Chlorophenols and their Dissociation Constants and Partition Coefficients in Several Solvent-Water Systems. *Wat. Res.* **28**(7):1547-1552
35. **Knoll G., J. Winter** (1989) Degradation of Phenol via Carboxylation to benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **30**:318-324
36. **Koster I.W.**, (1989) Toxicity in Anaerobic Digestion, (with emphasis on the effect of ammonia, sulfide and long-chain fatty acids on methanogenesis), Doctoral dissertation, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands
37. **Li Tong, Juteau, Beaudet, Lépine, Villemur y Bisailon** (2000) Purification and characterization of a 4-hidroxibenzoate decarboxilase from an anaerobic coculture, *Can. J. Microbiol.*, **46**:856-859
38. **Londry, K. L. y , P. M. Fedorak** (1993) Use of Fluorinated Compounds To Detect Aromatic Metabolites from m-Cresol in a Methanogenic Consortium: Evidence for a Demethylation Reaction, *Appl. Environ. Microbiol.*, Jul 1993, 2229-2238, Vol 59, No. 7
39. **Londry K.L., J.M. Sulfito y R.S. Tanner**, (1999) Cresol metabolism by the sulfate reducing bacterium *Desulfotomaculum sp.*, satrin Groll, *Can. J. Microbiol.*, **45**:458-463
40. **Macarie,H.** (1999) *Overview on the Application of Anaerobic Treatment to Chemical and Petrochemical Wastewater*, International Conference on wastes minimisation and end pipe treatment in chemical and petrochemical industries, Mérida, Yucatán

41. **MERCK y Co. Inc.** (1996) *The MERCK index (An encyclopaedia of chemicals, drugs and biologicals)*, New Jersey, USA
42. **Monroy H. Oscar** (1992) *Control de la digestión anaerobia*, Memorias del curso Bioprocesos Anaerobios para el Tratamiento de Efluentes Industriales (UAM-ORSTOM-IMP).
43. **Monroy H. Oscar (b)** (1992) *Aspectos de diseño de Reactores Anaerobios*, Memorias del curso Bioprocesos Anaerobios para el Tratamiento de Efluentes Industriales (UAM-ORSTOM - IMP).
44. **Monroy H. O, Famá G., Meraz M., Montoya L., Macarie H.,** (2000) Anaerobic Digestión for wastewater treatment in México: State of the technology, *Wat. Res.* **34**(6) 1803-1816
45. **Noyola, R. A.** (1992) *Reactores anaerobios de segunda y tercera generación*, Memorias del curso Bioprocesos Anaerobios para el Tratamiento de Efluentes Industriales (UAM-ORSTOM-IMP).
46. **O'Connor O.A., y L.Y. Young,** 1996, Effect of six different functional groups and their position on the bacterial metabolism of monosubstitued phenols under anaerobic conditions, *Environmental Science and Technology*, **30**(5), 1419-1428
47. **Olguín-Lora P. Puig-Grajales L. y Razo-Flores E.**(2001), Inhibition of the Acetoclastic Methanogenic Activity by *Alkyl*-Phenolic Compounds Present in Wastewaters from Petrochemical Processes, *Anaerobic digestion for a sustainable development. Paper of the seminar of Prof dr. Gatze Lettinga*, Wageningen, The Netherlands
48. **PEMEX,** Informe de Seguridad, Salud y Medio Ambiente, 2001 (http://www.pemex.com/seg_es2001.html#)
49. **Puig-Grajales, L. , Olguín-Lora P., Acuña-Argüeyes M. y Razo-Flores E.,** (2000 a), Toxicidad Metanogénica Acetoclasta de Diferentes Compuestos Fenólicos *Alquil*-Sustituidos, Memorias del VI Taller y Seminario Latinoamericano de Digestión Anaerobia, Pernambuco, Brasil

50. **Puig Grajales, L., T. van der Zee, E. Razo Flores y J.A. Field**, (2000), Anaerobic biodegradability of alkylphenols and fuel oxygenates in the presence of alternative electron acceptors, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **54**:692-697
51. **Ramanand, K, Suflita J.** (1991) Anaerobic Degradation of *m*-Cresol in Anoxic Aquifer Slurries.: Carboxylation Reactions in Sulfate-Reducing Bacterial Enrichment, *Appl. Environ. Microbiol*, **57(6)**: 1698-1695
52. **Razo-Flores, E., A. Svietskaya, B. Donlon, J. Field, G. Lettinga** (1996) The effect of granular sludge Source on the anaerobic biodegradability of aromatic compounds, *Bioresource Technology*, **56**: 215-220
53. **Roberts D.J, Fedorak P.M, Hudrey S.E** (1990) CO₂ incorporation and 4-hydroxy-2-methylbenzoic acid formation during anaerobic metabolism of *m*-cresol by a methanogenic consortium, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56(2)**: 472-478
54. **Schie Paula M van, Lily Y. Young** (2000) Biodegradation of phenol: Mechanisms and applications, *Bioremediation Journal* **4(1)**:1-18
55. **Seghezzo, Lucas, G. Zeeman, J. van Lier, H.V.M. Hamelers y Gatze Lettinga**, (1998) A Review: The anaerobic Treatment of Sewage in UASB and EGSB reactors, *Bioresource Technology*, **58**:176-190
56. **Sekiguchi Y., Kamagata Y., Harada H.**, (2001) Recent advances in methane fermentation technology, *Current Opinion in Biotechnology*, **12 (3)**: 277-282
57. **Sierra-Alvarez R. y G. Lettinga** (1991) The effect of Aromatic Structure on the Inhibition of Acetoclastic methanogenesis in granular Sludge, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**:544-550
58. **Singh, R.P., Surendra Kumar y C.P.S. Ojha** (1999) Nutrient requirement for UASB process: a review, *Bioch. Eng. J.*, **3**:35-54
59. **Speece, R.E.** (1996) Anaerobic Biotechnology (For industrial wastewater), Ed. Archae Press, Nashville, USA

60. **Sulfita J.M., L.A. Saxena** (1989) The anaerobic biodegradation of *o*-, *m*-, and *p*-cresol by sulfate reducing bacterial enrichment cultures obtained from a shallow anoxic aquifer, *Journal of Industrial Microbiology*, **4**:255-266
61. **Toerien, D.F. y W.H.J. Hattingh** (1969) Anaerobic Digestion. I. The microbiology of anaerobic digestion, *Water Res.*, **3**:385-416
62. **Tay J H , Yan Y G**, (2001), Improved anaerobic degradation of phenol with supplemental glucose, *J. Environ. Eng.-ASCE*, **127**:38-45
63. **Wang Yi-Tin, Suidan M., Pfeffer, J. y Najm I.** (1988) Effects of Some Alkyl Phenols on Methanogenic Degradation of Phenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **54(5)**:1277-1279
64. **Wise D.L.** (1987) Bioenvironmental systems, v. I y II, ed. CRC Press Inc., Boca Ratón, Fl.
65. **Young L. Y. y M.D. Rivera** (1985) Methanogenic Degradation of four Phenolic Compounds, *Wat. Res.*, **19**:1325-1332
66. **Zhou Gong-Ming y Herbert H. P. Fang** (1997), Co-degradation of phenol and M-cresol in a UASB reactor, *Bioresour. Technol*, **61(1)**:47-52
67. **Zhou Gong-Ming y Herbert H. P. Fang** (1998), Competition between methanogenesis and sulfidogenesis in anaerobic wastewater treatment, *Wat. Sci. Tech.*, **38(8-9)**317-324

ANEXOS

A1. Cálculo del metano teórico y eficiencia

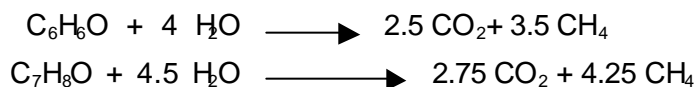
En este anexo se detalla la manera cómo se hicieron los cálculos para determinar el metano teórico, basado en la remoción tanto de compuestos fenólicos como de la DQO y el experimental. Para los sistemas por lotes el metano teórico se calculo solo en base a los compuestos fenólicos alimentados (estequiométricamente).

Metano teórico según la DQO

De acuerdo a la DQO alimentada (mg/L), al flujo (0.7 mL/min) y a la relación 0.504 mL CH₄/g DQO (capítulo 1) se calculó el volumen de metano **V**. Utilizando los mismos valores que para el cálculo anterior y de acuerdo a la ley de los gases ideales se obtuvo **n** (mmol/d).

Metano experimental según compuestos fenólicos

Considerando las relaciones estequiométricas:



Y los siguientes valores:

- $p = 585 \text{ mm Hg}$
- $T = 30^\circ\text{C} = 303^\circ\text{K}$
- $R = 0.082 \text{ L atm / mol }^\circ\text{K}$
- $94.11 \text{ g fenol} = 1 \text{ g-mol fenol}$
- $108 \text{ g cresol} = 1 \text{ g-mol cresol}$
- $\text{Flujo} = 0.7 \text{ mL/min}$

De acuerdo a ley de los gases Ideales ($pV = nRT$), se calculó **n** (mmol/d).

Metano experimental según la DQO removida

De acuerdo a la DQO removida (mg/L), al flujo (0.7 mL/min) y a la relación 0.504 mL CH₄/g DQO (capítulo 1) se calculó el volumen de metano **V**. Utilizando los mismos valores que para el cálculo anterior y de acuerdo a la ley de los gases ideales se obtuvo **n** (mmol/d).

Metano experimental en columna

Este se calculó transformando el volumen desplazado en la columna (producto de la altura de la columna y el área de 23.78cm^2) en mmol, empleando la relación de los gases ideales y las mismas constantes, tomando como base un día.

Eficiencia

De acuerdo a los promedios en fase estacionaria, para cada etapa (figuras A1-1 y A2-2) se calcularon las eficiencias. Los valores respectivos y su desviación estándar se muestran en la tablas A1-1 y A2-2.

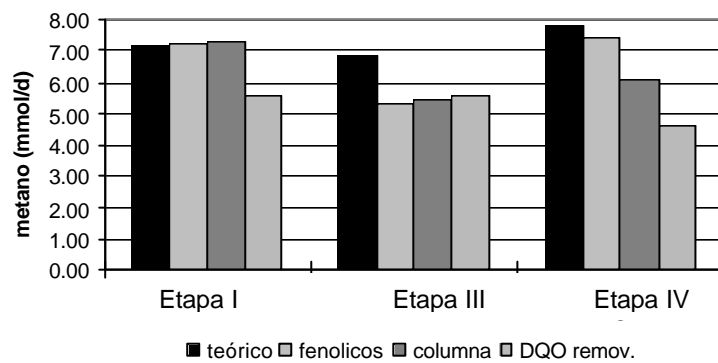


Figura A1-1 Metano producido en el reactor A, por etapa ($p=585\text{ mmHg}$, $T=303\text{K}$)

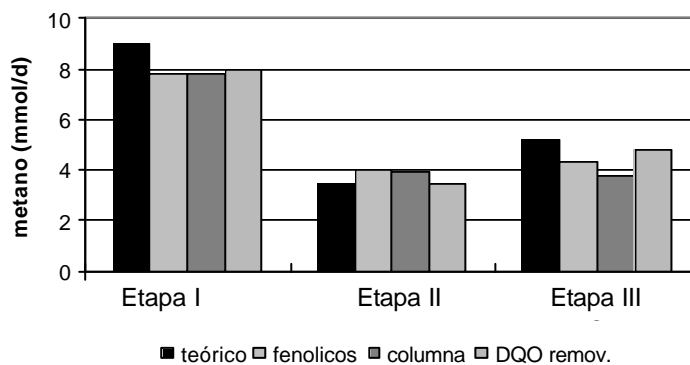


Figura A1-2 Metano producido en el reactor B, por etapa ($p=585\text{ mmHg}$, $T=303\text{K}$)

Tabla A1-1 Comparación de metano teórico y experimental en el reactor A
(p=585 mmHg, T=303K)

	Etapa I-A		Etapa III-A		Etapa IV-A	
	Media	d. est	media	d. est	media	d. est
fenolicos	7.25	0.61	5.28	0.62	7.47	1.65
experimental	7.30	0.89	5.45	0.47	6.07	1.06
DQO removida	5.57	0.58	5.65	0.68	4.59	1.46
Teórico	7.23	0.9	6.84	1.53	7.84	0.94

Tabla A1-2 Comparación de metano teórico y experimental en el reactor B
(p=585 mmHg, T=303K)

	Etapa I-B		Etapa II-B		Etapa III-B	
	media	d. Est.	media	d. Est.	media	d. Est.
experimental	7.81	4.95	6.32	0.78	3.78	0.38
fenolicos	7.81	4.55	4.82	0.79	4.33	0.62
DQO removida	8.62	4.52	3.44	0.64	4.74	1.43
teórico	8.99	4.23	3.09	0.63	5.26	1.39

Metano en sistemas por lotes

Según los compuestos adicionados a cada tratamiento (tabla A1-3), se calculó el metano teórico, basado en las consideraciones que se plantean al inicio del anexo: estequiométricas, de presión y temperatura. Los valores de metano teórico se muestran en la tabla A1-4

Tabla A1-3 Compuestos adicionados por tratamiento

Tratamiento	fenol mg/L	para-cresol mg/L	o-cresol Mg/L
1	656		
2		97	
5	537	118	119

Tabla A1-4 Metano teórico mmol

Cálculo de metano teórico				
Tratamiento	fenol	<i>para</i> -cresol	<i>o</i> -cresol	TOTAL
	mmol	mmol	mmol	mmol
1	2.92			2.92
2		0.377		0.37
5	2.39	0.45	0.46	3.31

Al metano experimental cuantificado por cromatografía, por tratamiento, se le restó el metano endógeno (control), resultando la producción neta (Tabla A1-5). La relación entre esta cantidad y el metano teórico se muestra en la tabla A2-5

Tabla A1-5 Eficiencia de producción de metano

Tiempo (horas)	Tratamiento	Experimental (mmol)	Neto	relación %
385	1	3.31	2.92	99.9
140.5	2	0.75	0.36	99.6
599	5	3.98	3.59	108.4
599	6	0.38		

A2. Comparación de concentraciones

En el presente anexo se detalla el funcionamiento de los reactores comparando las entradas y salidas, en DQO experimental, global expresada como DQO y concentración por compuesto. Así mismo se ofrece también una comparación gráfica entre la concentración de *orto*-cresol alimentado, expresado como DQO y la DQO remanente, en el reactor 1, así como la de *meta*-cresol y *orto*-cresol en el reactor 2.

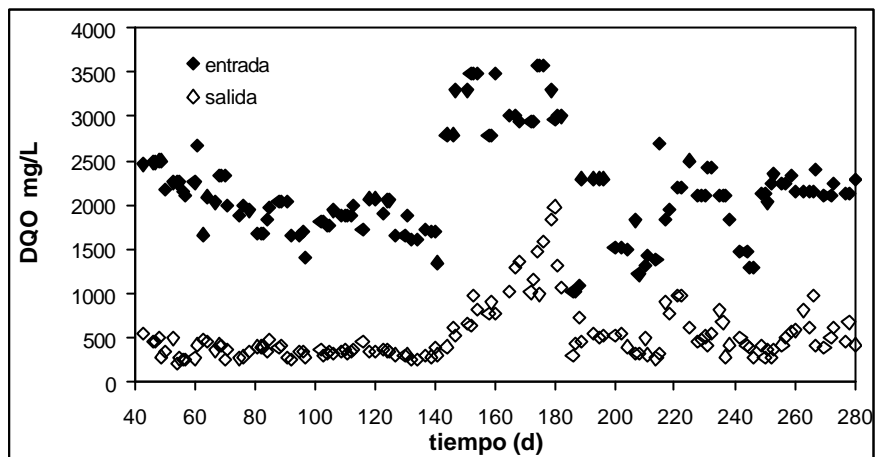


Figura A2-1 DQO experimental en el reactor A

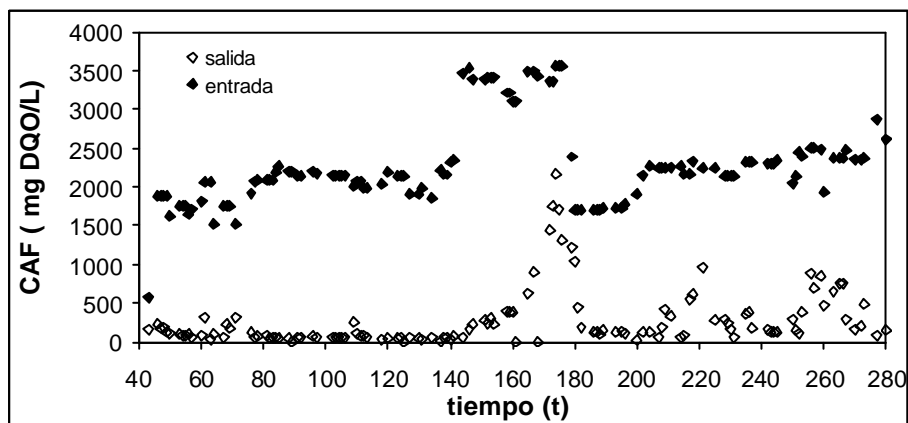


Figura A-2-2 Concentraciones globales en R-A, expresadas como DQO

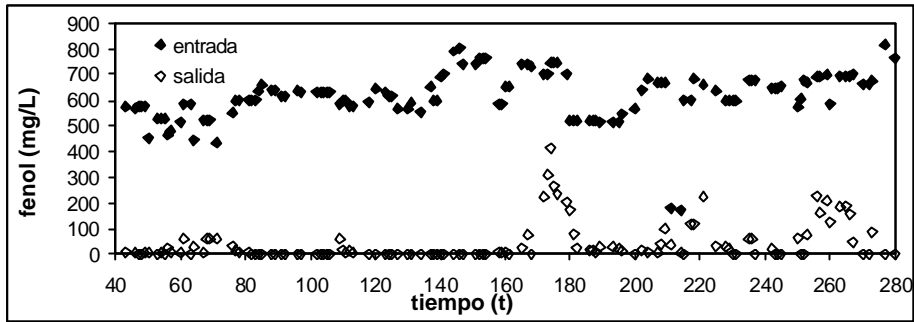


Figura A2-3 Concentración de fenol, a la entrada y salida del R-A

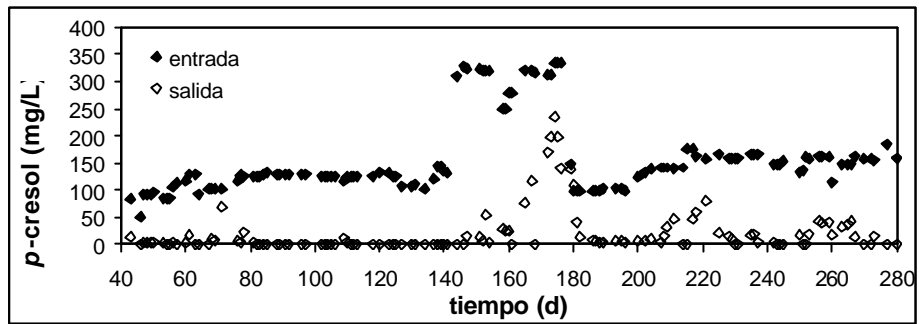


Figura A2-4 Concentración de *para*-cresol a la entrada y salida del R-A

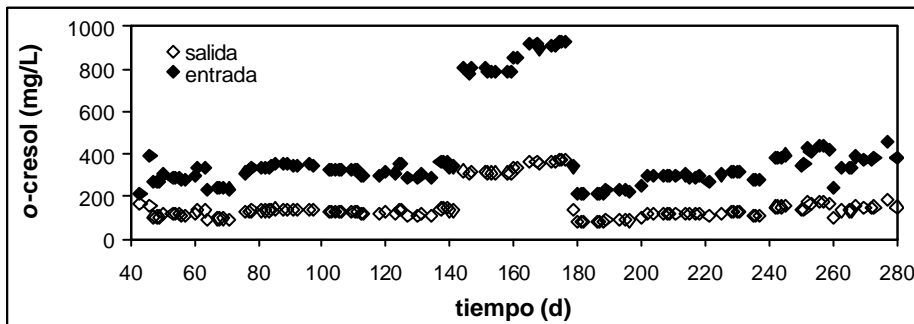


Figura A2-5 Concentración de *orto*-cresol a la entrada y salida del R-A

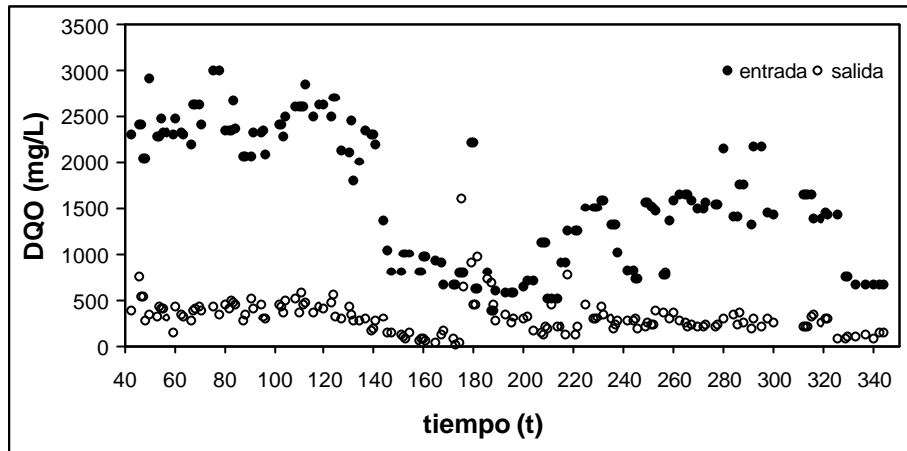


Figura A2-6 Demanda Química de Oxígeno experimental en el Reactor R-B

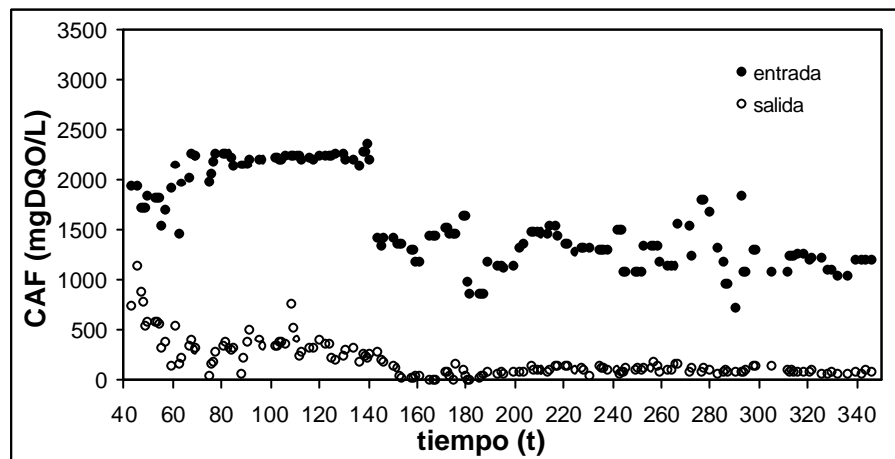


Figura A2-7 Concentraciones globales en R-B, expresadas como DQO

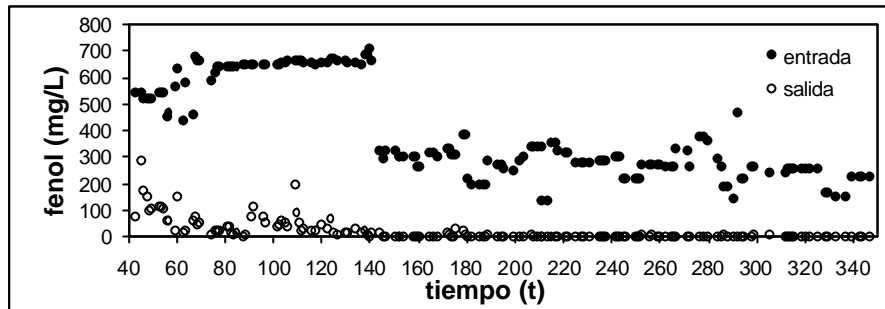


Figura A2-8 Concentración de fenol en el R-B

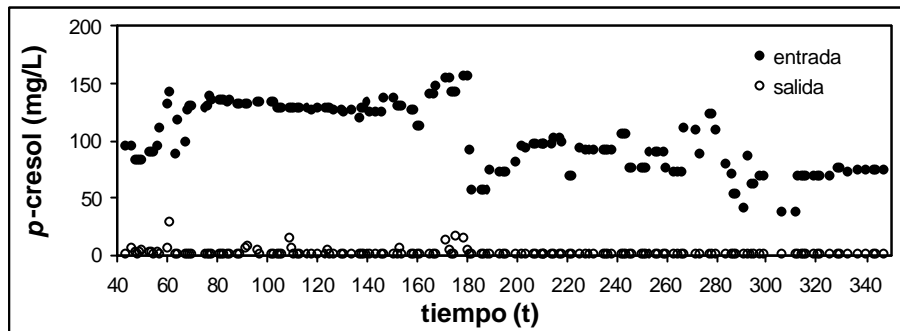


Figura A2-9 Concentración de *para*-cresol en el R-B

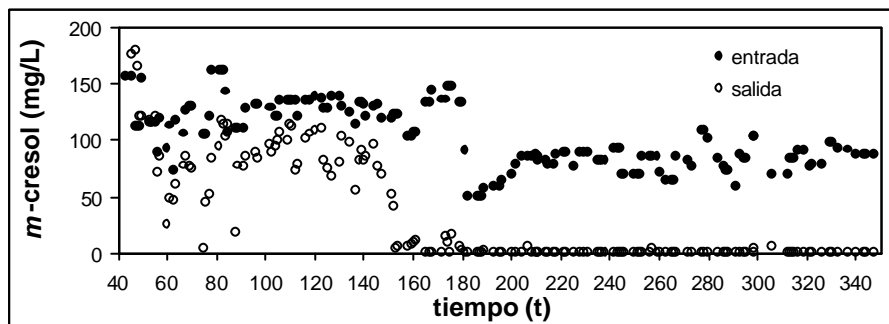


Figura A2-10 Concentración de *meta*-cresol en el R-B

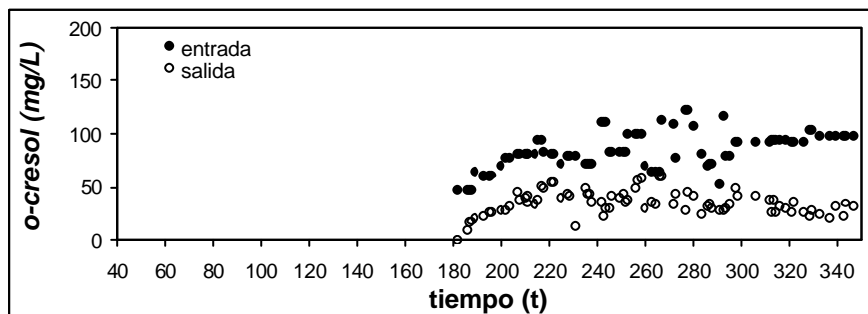


Figura A2-11 Concentración de *orto*-cresol en el R-B

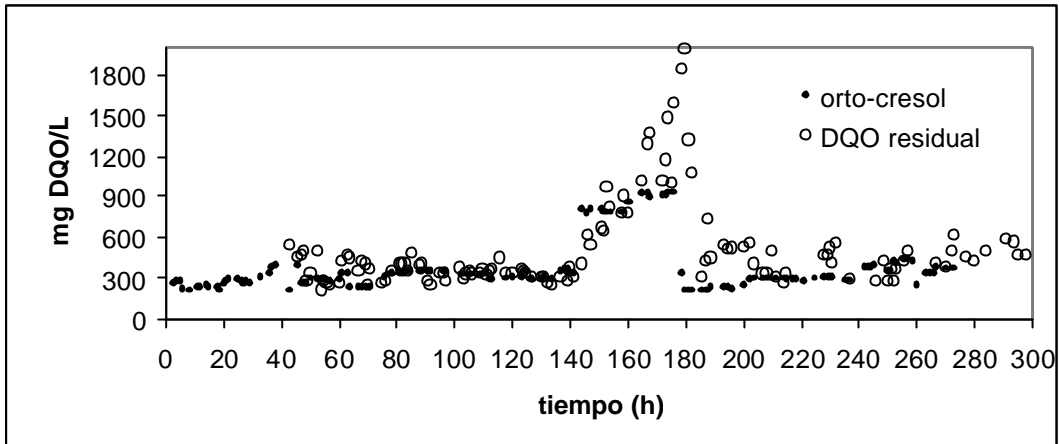


Figura A2.12 Comparación del *orto*-cresol alimentado y la DQO residual en el Reactor A

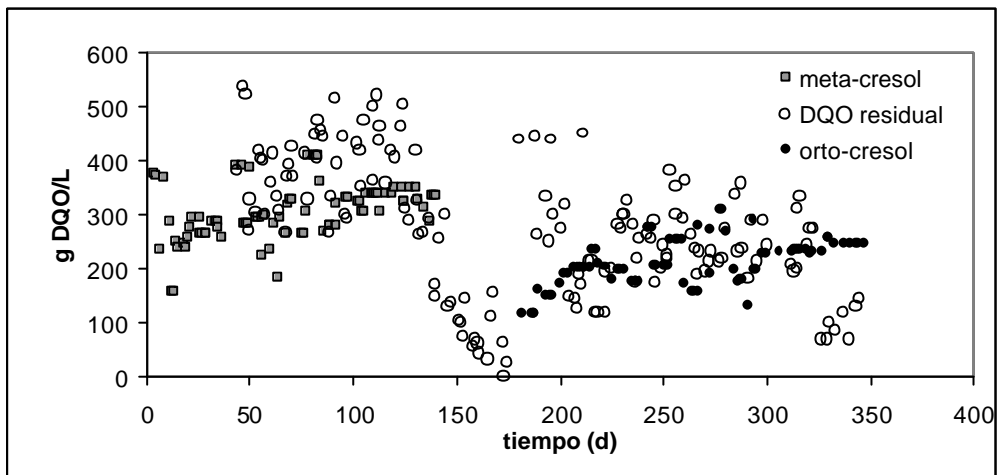


Figura A2.13 Comparación del *meta* y *orto*-cresol alimentado y la DQO residual en el Reactor B