

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

**TRATAMIENTO ANAEROBIO DE UN SURFACTANTE NO
IÓNICO Y LOS EFLUENTES DEL LAVADO DE UN SUELO
CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS**

**T E S I S
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A
ANGÉLICA JIMÉNEZ GONZÁLEZ**

MÉXICO D.F

JUNIO 1999

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología

**TRATAMIENTO ANAEROBIO DE UN SURFACTANTE NO IÓNICO Y LOS
EFLUENTES DEL LAVADO DE UN SUELO CONTAMINADO CON
HIDROCARBUROS**

T E S I S
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

Angélica Jiménez González

Comité Tutorial:

Cotutor: Dra. Margarita Salazar González

Cotutor: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor: Dr. Oscar Monroy Hermosillo

Sinodal: M. en C. Gloria Moreno Rodríguez

Sinodal: Dr. Frederic Thalasso Siret

MÉXICO D.F

JUNIO 1999

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores Dra. Margarita Salazar y Dr. Mariano Gutiérrez por sus valiosas aportaciones en la elaboración del presente trabajo y tiempo dedicado a las revisiones, además quisiera hacer un agradecimiento especial al Dr. Oscar Monroy por su asesoría y apoyo en la elaboración de la tesis.

Agradezco a la M. en B. Florina Ramírez por su disposición y sus comentarios que ayudaron a enriquecer el trabajo. A la Dra. Mónica Meraz por sus aportaciones especialmente en la última etapa del trabajo y a la M. en C. Carmen Fajardo que invirtió un gran número de horas en apoyarme en el establecimiento de la técnica analítica (HPLC), de manera paciente y entusiasta.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio de los que siempre obtuve una respuesta positiva cuando requerí su ayuda en especial a Zenia, Paty, Julieta, Antonieta y Martha.

Agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) el financiamiento proporcionado para realizar mis estudios de Maestría.

A mis padres Adolfo y Verónica

Por su amor y apoyo que siempre me han brindado.

Gracias.

A Alejandro Medina

En la vastitud del espacio y en la inmensidad del tiempo

Mi alegría es compartir

Un planeta y una época con Alex el amor de mi vida.

CONTENIDO

Resumen.....	i
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación.....	1
1.2 Lavado de suelos contaminados con petróleo.....	1
1.3	
Surfactantes.....	3
1.3.1 Definición.....	3
1.3.2 Clasificación de los surfactantes.....	5
1.3.3 Estructura de las micelas.....	8
1.3.4 Interacción del surfactante con los componentes de la membrana celular.....	9
1.3.5 Tritón X-100.....	12
1.3.6 Biodegradación de surfactantes.....	14
1.4 Digestión anaerobia.....	15
1.4.1 Bioquímica y microbiología.....	15
I. Etapa de hidrólisis y fermentación.....	17
II. Etapa de acetogénesis y homoacetogénesis.....	18
III. Etapa de metanogénesis.....	18
1.4.2 Reactor UASB.....	21
1.4.3 Distribución de los microorganismos en el gránulo.....	22
1.4.4 Balance de materia en el reactor continuo.....	23
2. OBJETIVOS.....	29
2.2	
Objetivos.....	29
2.2.1 Objetivo General.....	29
2.2.2 Objetivos particulares.....	29

3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
3.1 Reactor anaerobio de flujo ascendente con lecho de lodos (UASB).....	30
3.1.1 Arranque del reactor.....	30
3.2 Microorganismos y medio mineral.....	31
3.2.1	
Microorganismos.....	31
3.2.2 Medio mineral	32
3.3 Alimentación del reactor UASB.....	32
3.4 Tratamiento de las muestras.....	33
3.5 Técnicas Analíticas.....	33
3.5.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	33
3.5.2 DQO teórico.....	35
3.5.3 Cuantificación del metano.....	36
3.5.4 Metano teórico.....	37
3.5.5 Cuantificación del biogas.....	39
3.5.6 Cuantificación del surfactante.....	40
3.5.7 Relación de alcalinidad.....	42
3.5.8 Azúcares Totales.....	44
3.5.9 pH.....	45
3.5.10 Sólidos.....	45
I. Sólidos Suspendidos Totales(SST).....	45
II. Sólidos Suspendidos Fijos (SSF).....	45
III. Sólidos suspendidos volátiles (SSV).....	46
3.5.11 Determinación de la actividad metanogénica.....	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
4.1 Biodegradación anaerobia de un surfactante no iónico.....	48
4.1.1 Efecto del surfactante en la demanda química de oxígeno(DQO)	48
4.1.2 Surfactante.....	50
I. Surfactante en la fase acuosa.....	50

II Surfactante en los gránulos.....	51
4.1.3 Producción de metano.....	55
4.1.4 Relación de alcalinidad.....	57
4.1.5 Conclusiones parciales.....	59
4.2 Efecto en la digestión anaerobia de los lixiviados del lavado de un suelo contaminado con hidrocarburos.....	60
4.2.1 Efecto de los lixiviados en la demanda Química de oxígeno(DQO).....	60
4.2.2 Surfactante en la fase acuosa.....	63
4.2.3 Producción de metano.....	66
4.2.4 Relación de alcalinidad.....	67
4.2.5 Conclusiones parciales.....	69
4.3 Efecto inhibitorio del surfactante en la digestión anaerobia.....	70
4.3.1 Efecto inhibidor del surfactante en la cinética de la degradación de lactosa.....	70
4.3.2 Actividad metanogénica en los gránulos.....	74
4.3.3 Conclusiones parciales.....	76
5.CONCLUSIONES GENERALES.....	78
5.1 Perspectivas.....	79
6.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

RESUMEN

En este trabajo se presenta la evaluación de la biodegradación anaerobia de un surfactante no iónico (Tritón X-100) y de los lixiviados del lavado de un suelo contaminado con hidrocarburos.

Se empleó un reactor anaerobio con lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) de 1450 mL, el cual tuvo tres etapas. En la primera se alimentó con diferentes concentraciones de Tritón X-100 (5, 20 50 y 100 mg/L) obteniéndose una desaparición del surfactante del 82 %. Se encontró que hay una sorción del surfactante en los gránulos anaerobios de $0.69854 \text{ mg}_{\text{Tritón retenido}}/\text{gSSV}$, que se mantuvo constante en las muestras analizadas.

En la segunda etapa, el reactor se alimentó con dos concentraciones de lixiviados (200 y 400 mgDQO/L), procedentes del lavado con Tritón X-100, de un suelo contaminado con hidrocarburos. Ambas concentraciones tuvieron un efecto negativo en la actividad de la comunidad microbiana que interviene en la digestión anaerobia.

Posteriormente en la tercera etapa, se alimentó el reactor con lactosa (1 g/L) y a diferentes concentraciones del surfactante (0, 100, 250 y 350 mg/L) variando los tiempos de retención hidráulica (0.5, 1.0 y 1.5 días). Se encontró que el Tritón X-100 actúa como un inhibidor de tipo no competitivo de orden 0.41 y la constante de inhibición (K_i) fue de 259 mg/L.

Con el propósito de evaluar las poblaciones del gránulo inhibidas por el Tritón X-100, se cuantificaron las actividades metanogénicas (hidrogenótrofas, acetoclasta) y las acetogénicas (propiónica y butírica). Las bacterias que presentaron actividad metanogénica fueron las fermentativas (30 % del CH_4 esperado) y las hidrogenótrofas (90 % del CH_4 esperado), mientras que en las acetoclastas y acetogénicas las actividades fueron nulas.

La presente tesis tiene la siguiente estructura. En el capítulo 1, se hace una revisión bibliográfica, los temas principales que se abordan son: los surfactantes, su definición, clasificación y biodegradación, así como algunas características del Tritón X-100. Además la digestión anaerobia, su bioquímica, microorganismos que intervienen en el proceso y el reactor (UASB) empleado en este sistema.

El capítulo 2 contiene la justificación y los objetivos de la tesis. El capítulo 3 presenta el material y métodos, principalmente el reactor, la fuente del inóculo y la descripción de las técnicas analíticas empleadas.

El capítulo 4 contiene resultados y discusión de: i) la adaptación de los gránulos anaerobios al surfactante, así como la evaluación de la mineralización del Tritón X-100. ii) la evaluación del efecto de lixiviados procedentes del lavado de un suelo contaminado con hidrocarburos, iii) la evaluación de la inhibición del surfactante en la digestión anaerobia y iv) la actividad metanogénica en los gránulos presentes en el reactor.

En el capítulo 5 se presentan las conclusiones generales y finalmente el capítulo 6 contiene las referencias bibliográficas que sirvieron de soporte a la tesis.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación

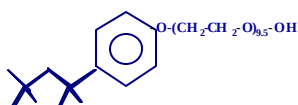
El crecimiento económico se ha basado en el uso intensivo de materias primas y energía. Bajo este contexto recursos abundantes como el agua, son utilizados indiscriminadamente ya sea como insumos o como receptores de desechos.

Como ejemplo se encuentra el lavado de suelo contaminado con hidrocarburos mediante surfactantes, en donde la relación suelo/agua empleada es hasta de un kilogramo de suelo por diez litros de agua y en donde los efluentes de este tratamiento llegan a alcanzar concentraciones del surfactante de 4,000 ppm. (Edwards *et al.*, 1991; Medina, 1999).

Existe una gran diversidad de surfactantes que la industria desecha en sus efluentes, los que por su persistencia, causan un impacto perjudicial en el medio ambiente. De esta forma, es necesario desarrollar una tecnología adecuada en costos y tiempo que permita el tratamiento de este tipo de compuestos. Un modelo de estudio interesante es la digestión anaerobia.

1.2 Lavado de suelos contaminados con hidrocarburos

Entre las tecnologías fisicoquímicas para remover los contaminantes de suelos con residuos del petróleo, se encuentra la incineración, desorción térmica y el lavado de suelos. En el caso de las dos primeras tecnologías, la excavación y su disposición en basureros son muy costosas y podrían producir a largo plazo obligaciones más grandes por los residuos generados. En el caso de lavado de suelos, los surfactantes no iónicos se han utilizado en la desorción de hidrocarburos (Ahel *et al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1991 y 1994; Medina, 1999).



Fuente: Medina, (1999)

1.3.1 Definición

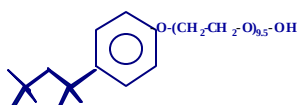
En presencia de un líquido inmiscible o poco soluble en agua, se forma una superficie líquido-líquido, donde los grupos hidrófilos se orientan hacia el agua y los grupos hidrófobos hacia el líquido inmiscible. En los sistemas multifase se logra un equilibrio en la interfase donde la molécula de surfactante continuamente se encuentra en dos regiones (Swisher, 1987).



Tabla 1.2. Grupos hidrófobos e hidrofílicos de un surfactante.

Grupo hidrófobo	Grupo hidrófilo
*Ácidos grasos $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_a-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_a-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_a-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array} \rightarrow 3\text{RCO}_2\text{H}$ *Parafinas $\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}$ *Olefinas $\text{C}-\text{C}=\text{C} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12} \rightarrow \text{C}_9\text{H}_{18}\dots\text{etc.}$ *Alquilbencenos. $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{Cl} + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{25}-\text{C}_6\text{H}_5 + \text{HCl}$ $\text{C}_{12}\text{H}_{24} + \text{C}_6\text{H}_6 \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{23}-\text{C}_6\text{H}_5$ *Alcoholes $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{CH}_2\text{OH}$ *Alquilfenoles $\text{C}_{12}\text{H}_{24} + \text{C}_6\text{H}_5\text{OH} \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{25}-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$	Sulfonato $-\text{SO}_3^-$ Sulfato $-\text{OSO}_3^-$ Carboxilato $-\text{CO}_2^-$ Sal cuaternaria de amonio $-\text{R}_4\text{N}^+$ Polioxietileno $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\dots\text{OCH}_2-\text{OCH}_2-\text{OH}$ Sacarosa $-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_7\text{O}(\text{OH})_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_7\text{O}(\text{OH})_4$

Fuente: Swisher (1987).



Debido a su capacidad de bajar la tensión interfacial, los surfactantes se utilizan como emulsificantes, detergentes, agentes dispersantes, agentes de espuma, agentes humectantes y agentes penetrantes. Los usos industriales de los surfactantes son diversos, estos se presentan en la **Tabla 1.3**.

Tabla 1.3. Aplicaciones industriales de surfactantes.

Usos	Características
*Metales	*Lubricación, inhibición de la corrosión, dispersante
*Papel	*Lavado, coloreado
*Pinturas	*Dispersante, humectante, emulsificante
*Textiles	*Solubilizante, dispersante, emulsificante
*Agricultura	*Humectante, dispersante
*Construcción	*Aumento de la fuerza de enlace entre el asfalto y grava
*Elastómeros y plásticos	*Solubilizante
*Alimentos y bebidas	*Solubilizante, control de consistencia
*Limpieza industrial	*Detergente
*Piel	*Detergente, emulsificante en desengrasantes.

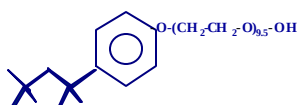
Fuente: Attwood y Florence (1983)

La diferencia entre cualquier coloide y una micela, radica en que la segunda se encuentra en un equilibrio dinámico de asociación-disociación con sus monómeros presentes en la solución.

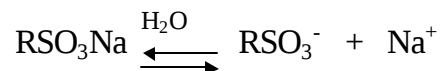
1.3.2 Clasificación de los Surfactantes

Los surfactantes se clasifican de acuerdo a la estructura química de la porción hidrófila en: catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfotéricos.

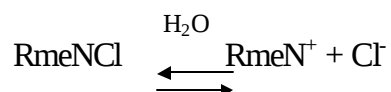
Los surfactantes aniónicos son aquellos que producen iones cargados negativamente en solución acuosa, normalmente originando grupos sulfonatos, sulfatos, o carboxilatos. Estos representan la mayor proporción de surfactantes de uso comercial, la mayor parte son producidos por sulfonación o sulfatación de los hidrófobos deseados.



Una reacción clásica de este tipo de surfactantes en solución acuosa se presenta a continuación:



Los surfactantes catiónicos son aquéllos que producen un ion cargado positivamente en solución acuosa, por ejemplo los derivados de sales cuaternarias de amonio. Estos son de interés en la industria porque actúan como suavizador de tejidos y también debido a sus propiedades germicidas. Su acción como detergentes es bastante pobre. Este tipo de surfactantes representa sólo un pequeño fragmento del total producido industrialmente (10%). Una reacción típica de disociación para estos surfactantes se presenta a continuación.



El surfactante no iónico contiene grupos hidrófilos que no ionizan en solución acuosa. Los más comunes contienen un grupo alquilfenol como la porción hidrófoba y una cadena de polioxietileno larga en la porción hidrófila. En la **Tabla 1.4** se muestran los surfactantes más comunes de cada grupo. Los surfactantes que no entran de manera clara en las tres clasificaciones antes mencionadas o que pertenecen a más de una ellas, son denominados anfotéricos y están formados por moléculas que contienen grupos aniónicos y catiónicos. Los surfactantes anfotéricos, se han diseñado con propiedades especiales por el uso tan singular que se les da y son producidos en cantidades pequeñas. Una de las principales características de los surfactantes, es su capacidad de formar agregados en la solución. En soluciones diluidas de aproximadamente 1 ppm, las moléculas de surfactante se encuentran en forma lineal o dispersa, a medida que la concentración aumenta existe un punto en el cual empiezan a formarse agregados denominados *micelas* (**Figura.1.1**), a este punto se le llama *concentración micelar critica* ó CMC. (Edwards *et al.*, 1991).

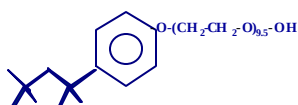
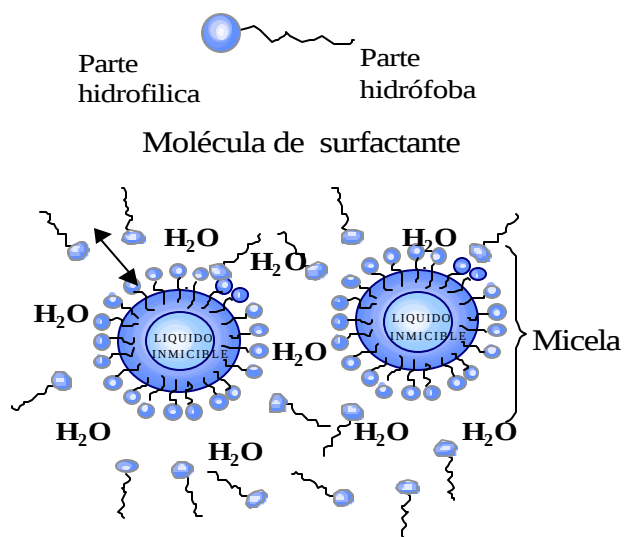
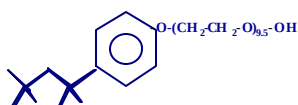


Tabla 1.4. Principales surfactantes de uso industrial.

Aniónicos	Catiónicos	No iónicos
a) Alquilbencensulfonatos * R  SO ₃ Na	a) Polioxietileno ROCH ₂ CH ₂ OH	a) Alquiltrimetilamonio R**Me ₃ N ⁺ X ⁻
b) Ester Sulfonado RCO ₂ OSO ₃ CH ₂ CH ₂ Σ (Igepon A)	b) Alcohol etoxilatos R(OC ₂ H ₄) _n OH	b) Alquilamina RNH ₂
c) Ácidos grasos sulfonados C ₁₆ H ₂₃ CHCO ₂ H	c) Alquilfenol etoxilatos CH ₂  (OC ₂ H ₄) _n OH	c) Alquilamina etoxilato RN***EmEn.

*alquil, **Metilo, ***Etoxilato. Fuente: Swisher (1987).

**Figura.1.1.** Representación esquemática de la formación y equilibrio de micelas.

1.3.3 Estructura de las micelas

McBain (1913), propuso la presencia de agregados moleculares en soluciones de surfactantes, basándose en los cambios de conductividad eléctrica que se observaban a diferentes concentraciones. Desde entonces, la estructura de micelas ha sido materia de discusión. El mismo McBain propuso que las micelas son estructuras esféricas con los grupos con carga están situados en la superficie de la micela y además sugirió que la micela coexistía con formas laminares. Estudios de radiografía realizados por Harkins (1948) sugirieron un modelo laminar en forma de sándwich, lo cual llevo a Debye y Anacker (1951) a proponer un modelo cónico en lugar del esférico (**Figura 1.2**). En la actualidad el modelo micelar propuesto por McBain es el más aceptado.

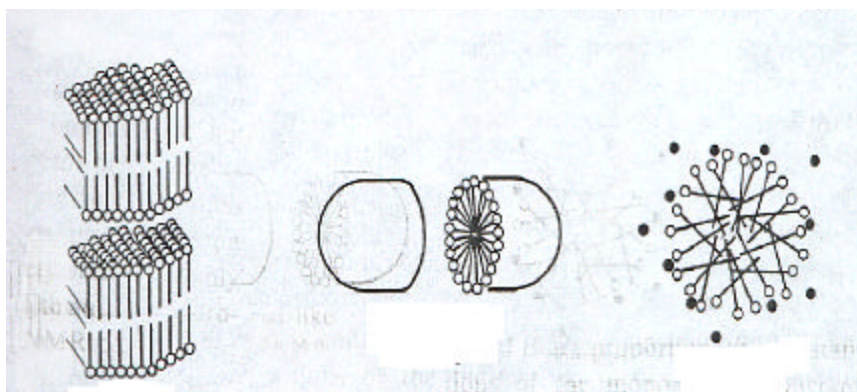
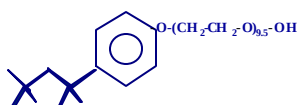


Figura 1.2. Formas propuestas de la estructura de una micela. (Moroi, 1992)

Cuando la concentración del surfactante en solución aumenta, su forma también cambia en una secuencia de laminar-hexagonal a cilíndrica-esférica (**Figura 1.3**). Al parecer, para los surfactantes no iónicos el cambio de estructura laminar a esférica es directa con el incremento de la concentración (Moroi, 1992).



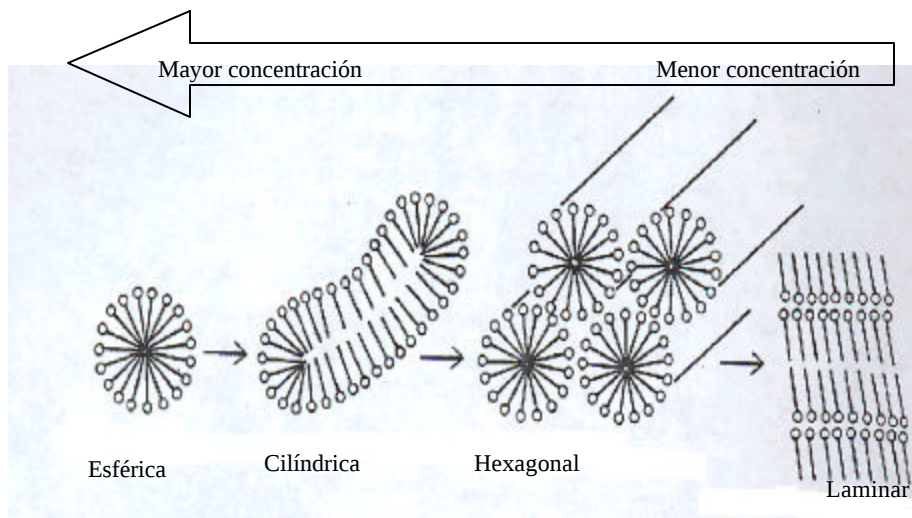


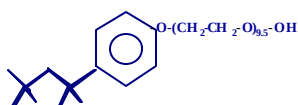
Figura 1.3. Cambios de forma de la micela, en función de la concentración del surfactante. (Moroi, 1992)

1.3.4 Interacción del surfactante con los componentes de la membrana celular

Los efectos tóxicos de los compuestos activos de superficie (surfactantes) en los sistemas biológicos se asocian con la pérdida de la función e integridad de la membrana (Attwood y Florence, 1983; Creagh *et al.*, 1993).

Se han realizado estudios de solubilización de los componentes de la membrana en presencia del Tritón X-100 (Alberts *et al.*, 1990), sugiriendo que este fenómeno ocurre en tres etapas como se ilustra en la **Figura 1.4**.

I. Todas las membranas biológicas están formadas por una doble capa continua de moléculas lipídicas en las que se encuentran inmersas varias proteínas que suelen ser anfipáticas, quedando expuestos los residuos hidrófobos de la proteína para permitir asociación con el surfactante (Alberts *et al.*, 1990).



II. El surfactante puede interaccionar con los extremos hidrófobos de la parte exterior de las proteínas de membrana desplazando a las moléculas lipídicas. Esta asociación entre proteínas y moléculas del surfactante, provoca la desnaturalización

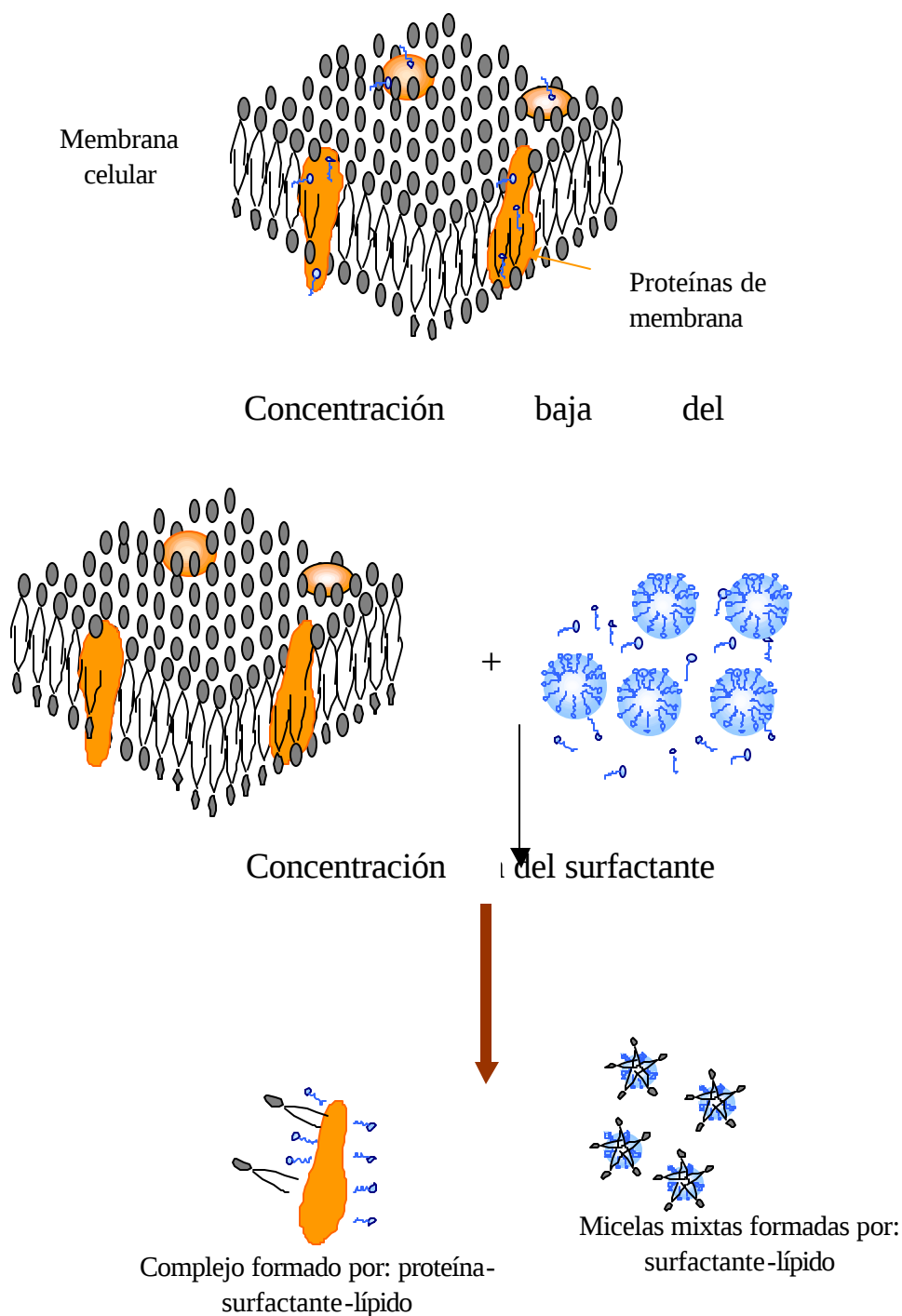
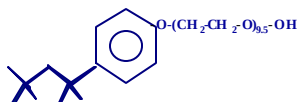


Figura 1.4. Solubilización con surfactante de las proteínas y lípidos de la membrana.



de las primeras, formando complejos surfactante-proteína. El polipeptido de la proteína se une a la micela a través del hidrógeno del grupo amino y el oxígeno del grupo etoxilato del surfactante, acomodando segmentos hidrófobos de la proteína en el interior de la micela (Creagh *et al.*, 1993).

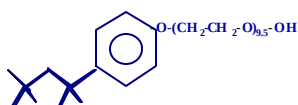
III. También como ya se ha mencionado, el surfactante puede formar micelas mixtas con los lípidos (Attwood y Florence, 1983; Alberts *et al.*, 1990), teniendo como consecuencia que los microorganismos pierdan la integridad de su membrana

Estudios químicos y de ultraestructura (Attwood y Florence, 1983) sugieren que el primer paso en el proceso de solubilización de membranas incluye la solución de sus constituyentes como la proteína asociada con la estructura de la membrana a concentraciones del surfactante de 0.1 %. En la siguiente fase los lípidos son solubilizados, prosiguiendo una liberación de los complejos de lipo-proteínas a concentraciones de 0.1 a 0.5% del surfactante.

Los resultados del estudio realizado por la acción de surfactantes no-iónicos en un fragmento de membrana (Attwood y Florence, 1983; Alberts *et al.*, 1990), sugieren que la ruptura de la membrana involucra uniones de los monómeros del surfactante a los segmentos polares expuestos de la proteína en la membrana, seguido por la formación de co-micelas de los detergentes con segmentos de la membrana.

En la **Figura 1.5**, se muestra una representación esquemática de los modos de unión de un surfactante a una proteína (Attwood y Florence, 1983).

Las interacciones son principalmente hidrófobas con los residuos de los aminoácidos y sugieren que las interacciones serían válidas para surfactantes no iónicos y catiónicos, considerando que estos últimos podrían unirse electrostáticamente a los sitios aniónicos de la proteína.



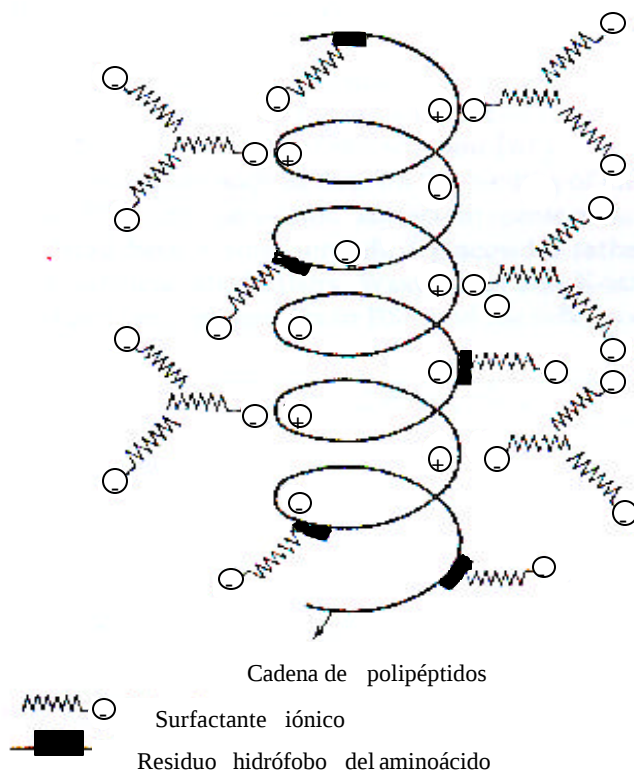
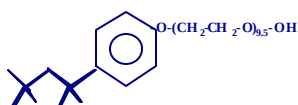


Figura 1.5. Representación esquemática de los modos de unión de un surfactante aniónico a una proteína (Attwood y Florence, 1983)

1.3.5. Tritón X-100

El Tritón X-100 es un surfactante no iónico, perteneciente a los alquil-fenol etoxilatos. Se utiliza en la solubilización de proteínas, en la preparación de detergentes, como agente emulsificante en el lavado de suelos contaminados con compuestos hidrófobos y no tiene propiedades antimicrobianas. Es considerado un surfactante suave que absorbe en la región ultravioleta del espectro, sin embargo puede presentar interferencias en la cuantificación de proteínas.

La serie X de estos surfactantes es producida a partir del octilfenol polimerizado con óxido de etileno, el número 100 es relacionado solo indirectamente con el número de unidades de óxido de etileno. En la estructura tiene en promedio 9.5 unidades de óxido de etileno por molécula, con un peso molecular promedio de 625 g/mol, el cual



puede variar dependiendo de las condiciones de la manufactura. En la **Tabla 1.5**, se presentan las propiedades físicas del Tritón X-100. Sigma no adiciona antioxidantes en su manufactura, sin embargo, en preparaciones comerciales del Tritón X-100, se ha encontrado que contienen hasta un 0.22 % de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que puede interferir en las reacciones biológicas. En la **Figura 1.6** se presenta su estructura química.

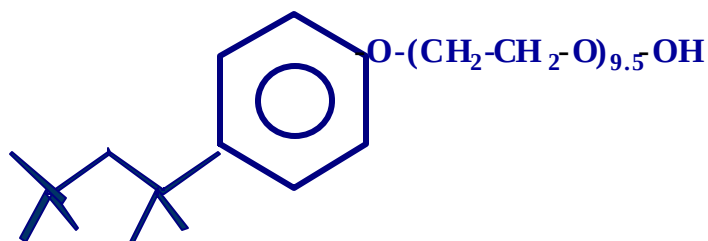


Figura.1.6. Estructura del surfactante no iónico Tritón X-100.

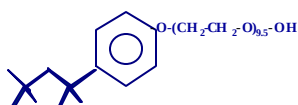
El Tritón X-100 estructuralmente es muy similar al igepal CA-630 y el nonidet P-40, sus nombres con frecuencia son reportados como sinónimos, sin embargo el Tritón es más hidrófilo.

Tabla 1.5. Propiedades físicas del Tritón X-100.

* Gravedad específica (1.065 g/mL a 25 °C)
* Absorción en UV (275 nm a 283 nm)
* Viscosidad (240 cps a 25 °C)
* pH (solución acuosa 5%) 6-8
* Peso molecular aprox. (625 g/mol.)
* Conc. Micelar Critica (110 ppm)
* Soluble en: Agua, benceno, tolueno, xileno, tricloroetileno, etilen glicol, eter etílico, etano e isopropanol.
* HLB (14)

Fuente: Sigma

En la **Tabla 1.5**, el HLB es el balance lipofílico-hidrofílico, el cual es un número empírico referente al equilibrio en tamaño y fuerza entre las partes hidrófila e hidrófoba de una molécula de surfactante. El intervalo de valores para el HLB es de 1 a 40, los



números pequeños generalmente indican solubilidad en aceite y los números cercanos a 40, muestran una mayor tendencia a la solubilidad en agua. (Moroi, 1992)

1.3.6 Biodegradación de Surfactantes

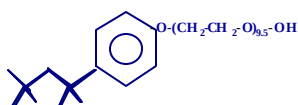
Se han realizado varios y diversos trabajos que han prestado su atención al uso de surfactantes no iónicos, para aumentar la solubilidad aparente de compuestos hidrófobos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), (Aranstein *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 1994; Tiehm, 1994; Volkering *et al.*, 1995; Guha *et al.*, 1996).

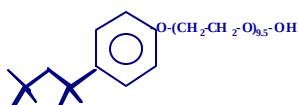
Tres son los factores esenciales en las pruebas de biodegradación de surfactantes: El tipo de surfactante, el microorganismo y el método analítico para la cuantificación del surfactante.

Los factores estructurales que más influyen en la biodegradación de surfactantes no iónicos son la longitud de la cadena de etoxilatos y la estructura del grupo hidrófobo. El aumento en la linealidad del grupo hidrófobo acelera la degradación y es retardada a medida que aumenta la etoxilación.

La evaluación de la biodegradabilidad de alquil-fenol etoxilatos (APE) ha dado lugar a más discordancia, contradicción y controversia que cualquier otra área de biodegradación de surfactantes. Las principales causas de las diferencias han sido atribuidas a las dificultades para establecer métodos analíticos que respondan a los intermediarios de la biodegradación y el fracaso por no dejar suficiente tiempo para la aclimatación microbiana.

Larson y Gamez, (1981), realizaron estudios de biodegradación de surfactantes pertenecientes a la familia de alcohol etoxilatos, para lo cual emplearon surfactante marcados radiactivamente con ^{14}C , utilizando concentraciones de 1-100 $\mu\text{g/L}$. Encontraron que este tipo de surfactantes con cadenas lineales 3 a 9 etoxilatos y cadenas de alquilo de 12 a 16 carbonos son altamente susceptibles a la biodegradación (98 %), en donde la velocidad de degradación es directamente proporcional a la concentración del surfactante.





estabilidad al sistema. El estudio de las interacciones entre las bacterias ha permitido el establecimiento de un modelo con tres etapas: i) etapa de hidrólisis y fermentación, ii) etapa de acetogénesis y homoacetogénesis y iii) etapa metanogénica (Figura 1.7).

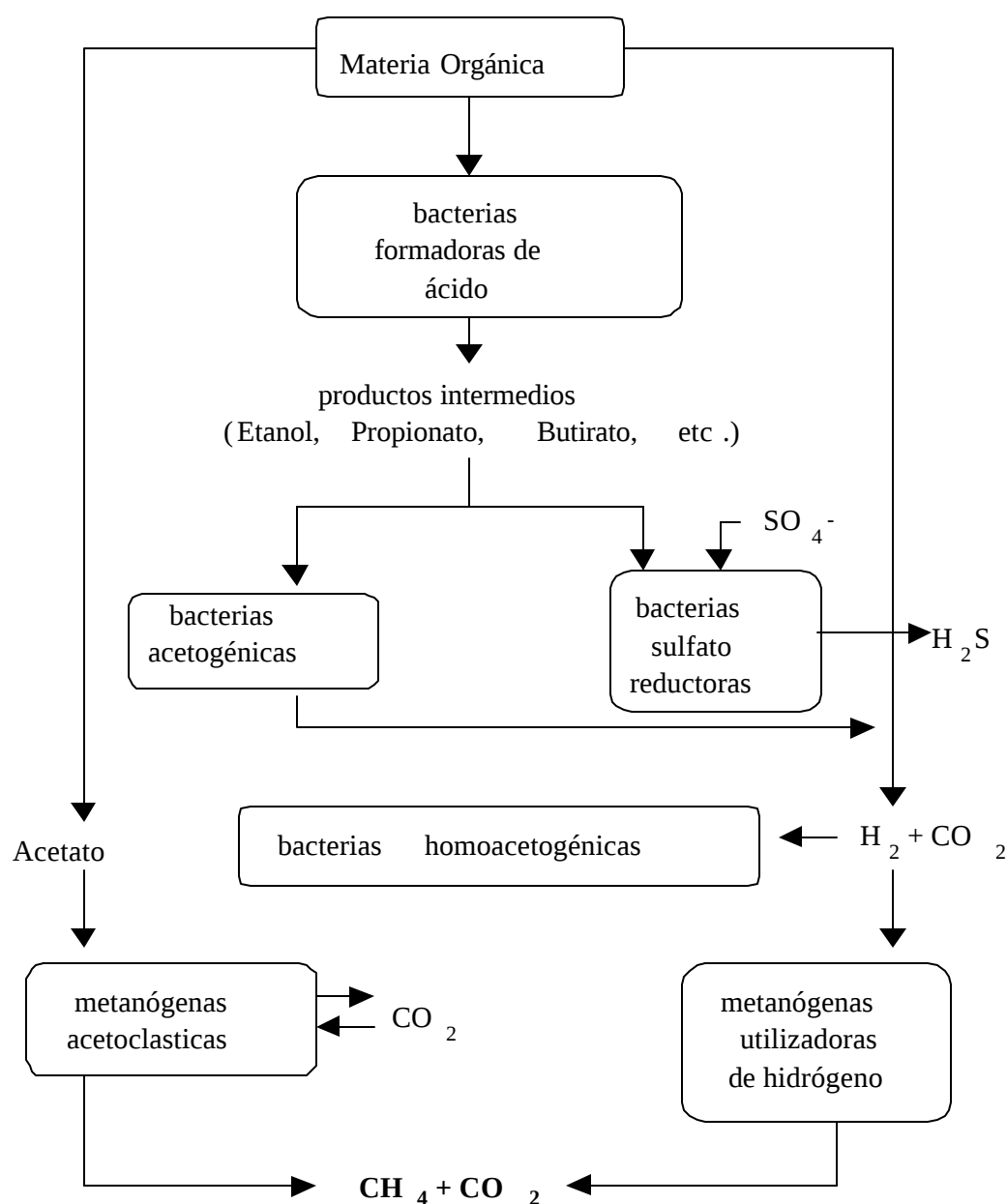
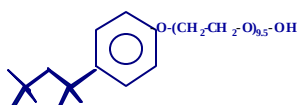


Figura 1.7. Esquema de las etapas que comprende al proceso de digestión anaerobia.



I. Etapa de hidrólisis y fermentación

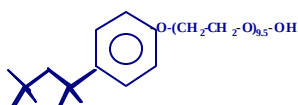
En esta etapa los polímeros como carbohidratos, proteínas compuestos aromáticos y lípidos son transformados por hidrólisis y fermentación en ácidos carboxílicos (principalmente ácidos grasos volátiles), en alcoholes, hidrógeno y bióxido de carbono. En la **Tabla 1.6**, se presentan las reacciones que intervienen en cada una de las etapas. (Toerlin y Hattingh, 1969; Rivera *et al.*, 1993).

Tabla 1.6. Reacciones de la digestión anaerobia.

Etapa	Reacciones
Hidrólisis y Fermentación	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}^- + \text{H}_2 + \text{CO}_2$
Acetogénica Homoacetogénica	Acetogénica $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \longrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2$ Homoacetogénica $\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{COO}^-$
Metanogénica	Acetoclástica $\text{CH}_3\text{COO}^- \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ Hidrogenoclástica $\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$

Fuente: Rivera *et al.*, (1993).

Las bacterias que intervienen, pertenecen a diferentes grupos, pueden ser anaerobias facultativas o estrictas, como *Enterobacteriaceae*, *Pelobacter*, *Acetobacterium*, *Clostridium*. En el caso de la fermentación de moléculas solubles fácilmente hidrolizables, tal como algunos compuestos naturales que se encuentran en muchos efluentes de la industria agroalimenticia, la hidrólisis y la fermentación no presentan un problema mayor, al contrario habrá que controlar esta etapa para evitar una acidificación rápida del reactor.



Si no existe un control puede generarse una desestabilización del proceso completo, dado que en caso de sobrecarga de la materia orgánica, la hidrólisis de ésta provoca una mayor producción de ácidos disminuyendo el pH del medio hasta niveles inhibitorios.

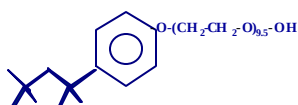
II. Etapa de acetogénesis y homoacetogénesis

Durante esta etapa, los productos de la fermentación previa son convertidos en acetato, hidrógeno y bióxido de carbono, las bacterias que intervienen son las productoras obligadas de hidrógeno y acetato (POHA).

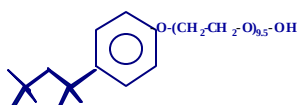
La peculiaridad de estas bacterias reside en que las reacciones que realizan son inhibidas por el hidrógeno que producen, por lo que es necesario que este no se acumule en el medio. Por esa razón las bacterias POHA, tienen una estrecha relación con bacterias que utilizan el hidrógeno (bacterias hidrogenofílicas). Debido a esta asociación es posible mantener un balance energético favorable para llevar a cabo las reacciones de acetogénesis a partir de los compuestos de la primera etapa, así una sobrecarga de un digestor anaerobio o una inhibición del crecimiento de las bacterias hidrogenofílicas, puede conducir a una sobreproducción de hidrógeno, modificando el pH del medio.

Se han encontrado cuatro géneros de bacterias POHA capaces de llevar a cabo la degradación de ácidos grasos, la *Syntrophomona wolfei*, *Syntrophomona sapovorans*, *Syntrophosphora bryantii* y la *Syntrophus buswelli*.

Las bacterias homoacetogénicas son capaces de transformar una mezcla de H_2/CO_2 en acetato, entre las que se encuentran *Clostridium formicoaceticum* y *Acebacterium woodii*. (Toeriln y Hattingh, 1969).



NADPH y el CO_2 se une a una metanopterina (MP) para originar MP-COOH, que es reducido por un donador de electrones desconocido a MP-CHO, posteriormente el grupo aldehído CHO ligado a MP, o bien a un acarreador no identificado, se reduce al nivel de $-\text{CH}_2\text{OH}$ donde la fuente de electrones probable es F_{420} o NADPH, el grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ se transfiere a SH-CoM para producir $\text{HOCH}_3\text{-S-CoM}$ reduciéndose a $\text{H}_3\text{C-S-CoM}$ por el F_{420} , para finalmente ser reducido a HS-CoM y CH_4 por el complejo metil reductasa F_{420} , estos pasos se resumen en la **Figura 1.8** (Brock *et al.*, 1987).



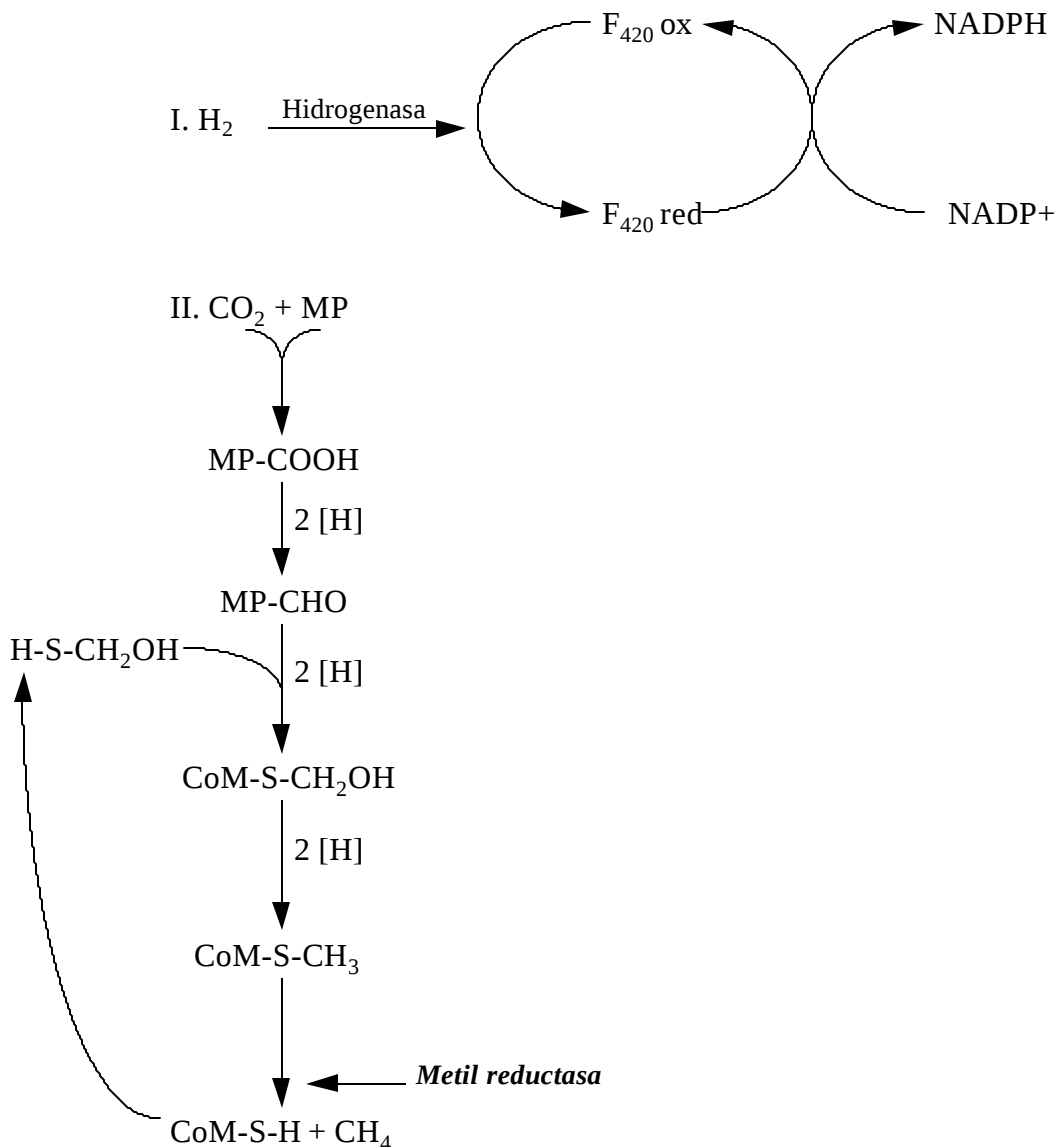
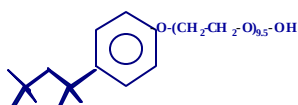


Figura 1.8 Reducción de dióxido de carbono a metano. F_{420} =factor 420, F_{430} = factor 430, MP=metanopterina, HS-CoM= coenzima reducida. Brock *et al.*, (1987)

Las bacterias metanogénicas acetoclásticas producen metano a partir del grupo metilo del acetato, esta reacción es fundamental ya que aproximadamente el 73% del metano proviene del acetato. Las bacterias de baja afinidad por el acetato son del género *Methanosarcina*. Además de acetato estas bacterias pueden utilizar como fuente de energía y carbono las metilaminas, metanol y algunas el H_2 , las especies más representativas son *Methanosarcina bakeri*, *M. mazei* y *M. thermophila*. El intervalo de



Para los sistemas anaerobios ha sido necesario el desarrollo de una nueva generación de reactores, en donde el problema era la baja velocidad del crecimiento celular.

1.4.2 Reactor UASB

La configuración granular tiene ventajas entre las que se encuentran: i) Los microorganismos se compactan densamente, sin perder espacio por adición de un soporte inerte, ii) el gránulo esférico proporciona al microorganismo un máximo de espacio, iii) los gránulos muestran propiedades de sedimentación excelentes debido a su gran tamaño comparado con una célula libre y iv) el área de reacción aumenta, es decir aumenta la cantidad de biomasa viable (Guiot *et al.*, 1992) incrementando la productividad volumétrica.



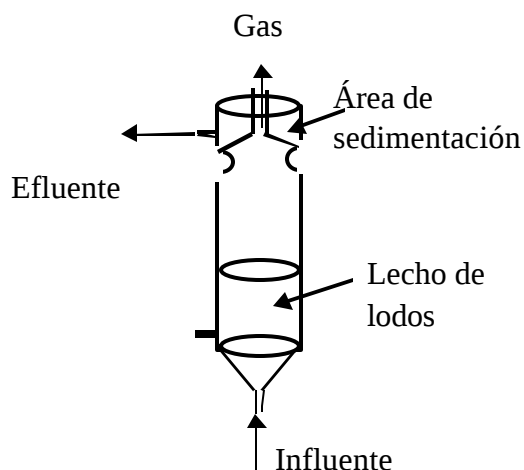
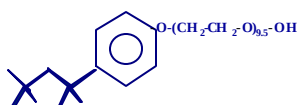


Figura 1.10 Representación del reactor UASB.

Las bacterias presentes en reactores UASB tienen la habilidad de formar partículas macroscópicas que contienen gran cantidad de células o microorganismos denominados gránulos; estos pueden aglomerarse naturalmente en forma de agregados celulares que se mantienen unidos por la generación de exopolímeros o artificialmente mediante la inmovilización de células en soportes sólidos (Bonet *et al.*, 1993; Schmidt y Ahring, 1994; Bhatti *et al.*, 1995). Entre las ventajas que ofrecen estos sistemas se encuentra el incrementar la extensión de la reacción y la productividad volumétrica, disminuyendo la concentración del sustrato en la corriente de salida.

1.4.3 Distribución de los microorganismos en el gránulo

Para el consumo del sustrato (lactosa, acetato, sacarosa, surfactante etc.) alimentado al reactor, el sustrato debe ser transportado del seno del líquido a la superficie del gránulo, por difusión, donde es transformado a propionato, acetato e hidrógeno. Como respuesta al gradiente generado los compuestos son transportados en sentido contrario al seno del líquido y su difusión disminuye en el centro del gránulo. En la **Figura 1.9** se muestra el modelo propuesto para las poblaciones contenidas en un gránulo, relacionadas con la difusión del sustrato y los productos. (Guiot *et al.*, 1992; Fang *et al.*, 1995).



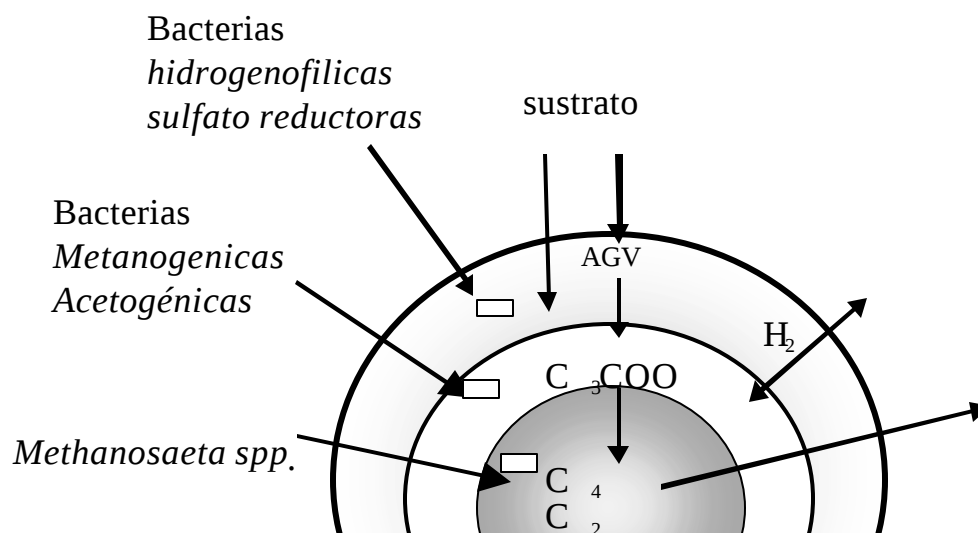
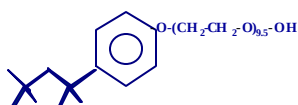


Figura 1.9. Modelo propuesto (Guiot *et al.*, 1992) de las poblaciones contenidas en un gránulo de un reactor UASB.

Durante los últimos 20 años los procesos biológicos por digestión anaerobia han aumentado como una tecnología atractiva en el tratamiento de aguas residuales, debido a sus bajos costos comparados con otras tecnologías como los tratamientos físico-químicos y los aerobios.



1.4.4 Balance de materia en un reactor continuo

Un reactor UASB puede ser modelado como un reactor de flujo mezclado debido a la generación de gas en el lecho de lodos que permite un mezclado completo del sustrato y producto de reacción.

El balance general del sustrato en un reactor de flujo mezclado viene dado por (Pirt, 1975):

$$\{ACUMULACIÓN\} = \{ENTRADA\} - \{SALIDA\} - \{CONSUMO POR REACCIÓN\}$$

Este balance puede ser expresado como:

$$V \frac{dS}{dt} = F(S_o - S) - gV \quad \text{----- (1.1)}$$

donde:

S_o : concentración del sustrato en la alimentación (g/L)

S : concentración del sustrato en el reactor(g/L)

F : flujo (L/día)

V : volumen del reactor (L)

t : tiempo (días)

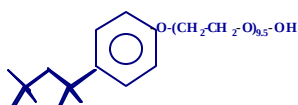
$$g : \text{velocidad de consumo} = \frac{n_{max} S}{K_s + S}$$

$$n_{max} = \text{velocidad específica máxima de consumo de sustrato} \left[\frac{gS}{L * día} \right]$$

K_s = constante de afinidad (g/L)

Dado que el tiempo de retención hidráulica (TRH) viene dado por $TRH=V/F$ y como en estado estacionario no hay acumulación ($VdS/dt = 0$), la ecuación (1.1) se puede escribir como:

$$g = \frac{(S_o - S)}{TRH} \quad \text{----- (1.2)}$$



Sustituyendo la expresión de Monod para g en la ecuación (1.2), se obtiene:

$$\frac{n_{\max} S}{K_s + S} = \frac{(S_o - S)}{TRH} \text{ ----- (1.3)}$$

Reacomodando

$$S = n_{\max} \cdot TRH \frac{S}{(S_o - S)} - K_s \text{ ----- (1.4)}$$

La ecuación (1.4) es una recta de S contra $TRH \frac{S}{(S_o - S)}$ con pendiente $n_{\max}$ y ordenada al origen K_s . Sin embargo, hay sustancias que pueden alterar la actividad de los microorganismos de una forma que afectan la $n_{\max}$ y la K_s . A estas sustancias se le denomina inhibidores. Se conocen una extensa variedad de inhibidores con acciones diferentes. Los modelos más sencillos de inhibición son el competitivo y no competitivo.

Para un inhibidor *no competitivo* de orden “ n ” en un reactor de flujo mezclado, la velocidad de consumo de sustrato se expresa de acuerdo a la siguiente ecuación (Levenspiel, 1986):

$$g = \frac{an_{\max} S}{K_s + S} \text{ ----- (1.5)}$$

el parámetro a viene dado por:

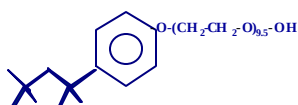
$$a = \left(\frac{1}{1 + \left[\frac{I}{K_i} \right]^n} \right) \text{ ----- (1.6)}$$

donde:

K_i : Constante de inhibición. (mg/L)

I : Concentración del inhibidor.(mg/L)

n : Orden de inhibición



definiendo:

$$n_{\text{máx}}^* = a \cdot n_{\text{máx}} = \frac{n_{\text{máx}}}{1 + \left[\frac{I}{K_i} \right]^n} \text{-----} (1.7)$$

Basándose en esta definición y reacomodando la ecuación (1.5), se obtiene:

$$\frac{1}{g} = \frac{K_s}{n_{\text{máx}}^*} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{n_{\text{máx}}^*} \text{-----} (1.8)$$

La ecuación (1.8) es una recta de $1/g$ contra $1/S$, con pendiente $K_s/n_{\text{máx}}^*$ y ordenada al origen $1/n_{\text{máx}}^*$. En la inhibición no competitiva, la velocidad máxima disminuye por efecto del inhibidor, mientras que la constante de afinidad permanece constante (**Figura 1.11**).

Para un *inhibidor competitivo* de orden “ n ”, la velocidad de consumo del sustrato vendrá dada por (Levenspiel, 1986):

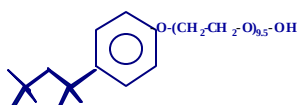
$$g = \frac{n_{\text{máx}} S}{bK_s + S} \text{-----} (1.9)$$

el parámetro b viene dado por:

$$b = 1 + \left[\frac{I}{K_i} \right]^n \text{-----} (1.10)$$

definiendo:

$$K_s^* = bK_s = \left(1 + \left[\frac{I}{K_i} \right]^n \right) K_s \text{-----} (1.11)$$



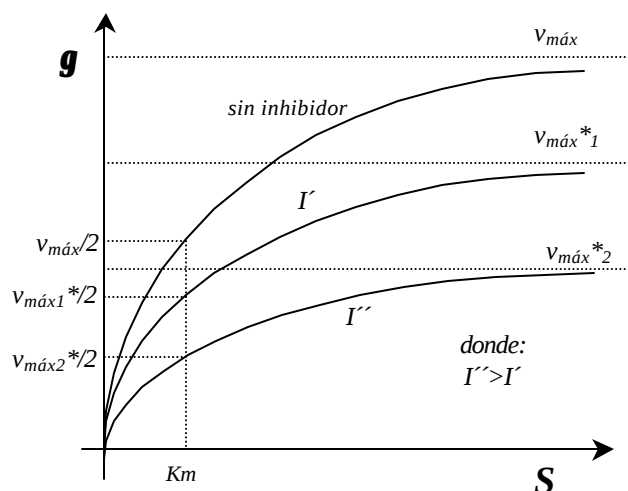


Figura.1.11. Efecto de un inhibidor no competitivo en la velocidad máxima de consumo de sustrato.

Basándose en esta definición y reacomodando la ecuación (1.9), se obtiene:

$$\frac{1}{g} = \frac{Ks^*}{n_{\text{máx}}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{n_{\text{máx}}} \quad \text{----- (1.12)}$$

Las ecuaciones para este tipo de inhibición, muestran que la afinidad por el sustrato disminuye por efecto del inhibidor (aumentando el valor de la constante de afinidad), mientras que la velocidad máxima de consumo de sustrato no es modificada (**Figura 1.12**).

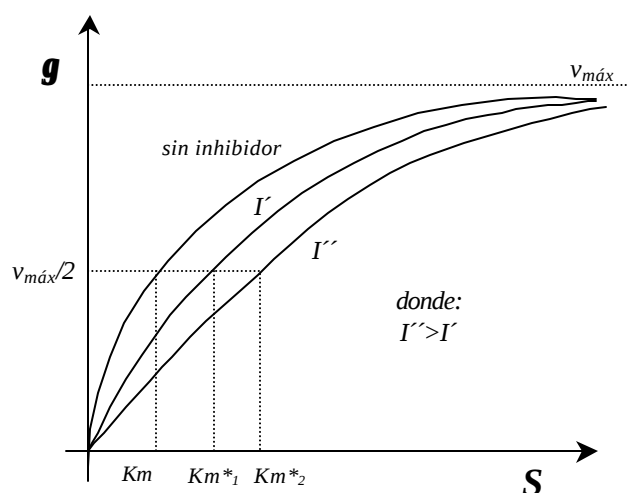
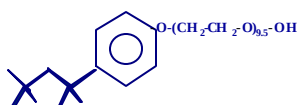


Figura.1.12. Efecto de un inhibidor competitivo en la afinidad por el sustrato.



OBJETIVOS

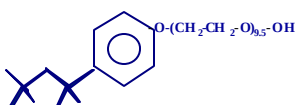
OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar la biodegradación anaerobia de un surfactante no iónico y los efluentes del lavado de un suelo contaminado con hidrocarburos.

2.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la biodegradación anaerobia del surfactante no iónico Tritón X-100.
2. Evaluar el tratamiento anaerobio de los lixiviados de un suelo lavado, que contienen al surfactante Tritón X-100 e hidrocarburos.
3. Evaluar el efecto inhibitorio del surfactante Tritón X-100 en la digestión anaerobia, determinando la constante de inhibición.
4. Evaluar el efecto del surfactante en la actividad metanogénica de los diferentes grupos de bacterias presentes en los gránulos del reactor UASB.



MATERIAL Y MÉTODOS

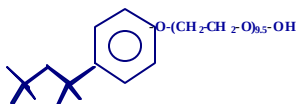
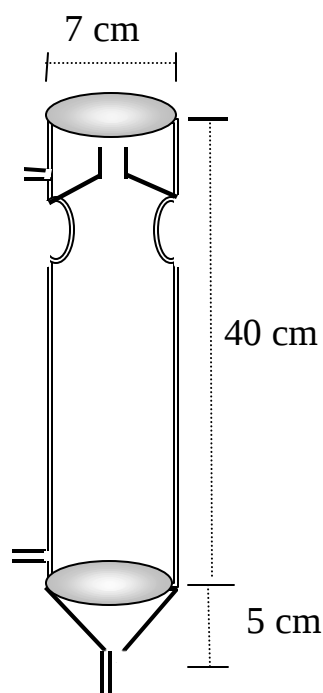
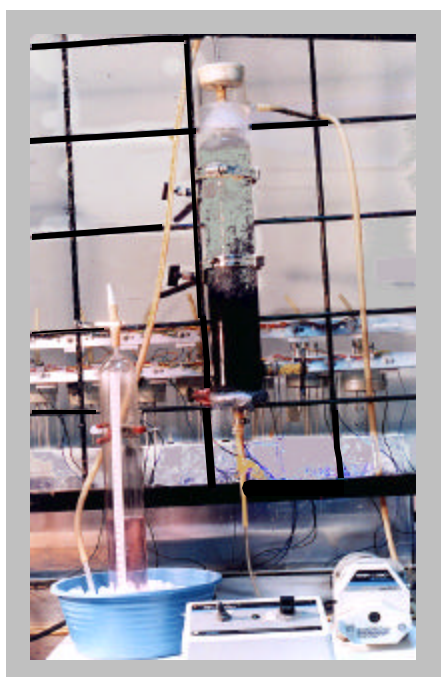


Tabla 3.1 Condiciones de operación del reactor UASB.

Temperatura	35 °C
Tiempo de retención hidráulica	1 día
Flujo	1450 mL/d $\pm$ 50
Volumen de operación	1450 mL

(I)



(II)

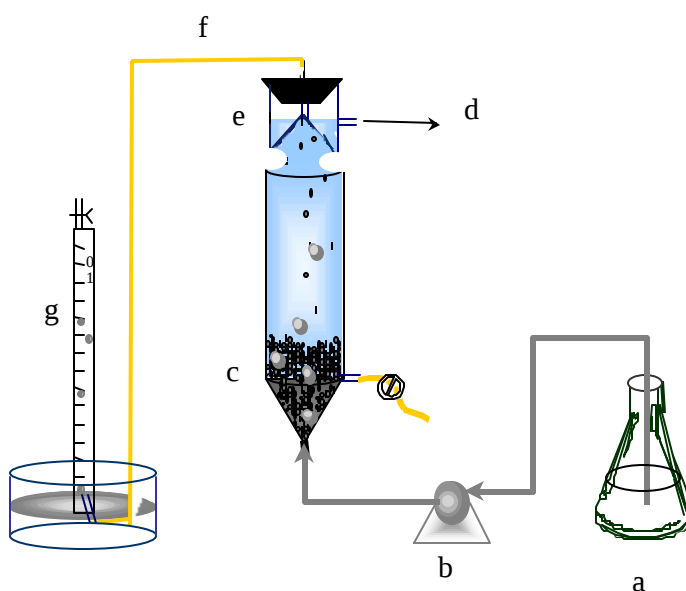
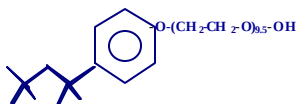


Figura 3.2. Reactor UASB. (I) fotografía del reactor UASB, (II) representación esquemática del reactor UASB donde: (a) recipiente de alimentación, (b) bomba peristáltica, (c) lecho de lodos, (d) efluente, (e) campana de separación gas/líquido, (f) salida del biogas y (g) columna de desplazamiento del biogas.

3.2 Microorganismos y medio mineral

3.2.1 Microorganismos

El reactor fue inoculado con un cultivo mixto de microorganismos, obtenido de la purga de un reactor UASB de la planta de *Tereftalatos Mexicanos* ubicada en Veracruz.



3.2.2 Medio mineral

El medio mineral empleado fue el de Balch *et. al.*, (1979), el cual se preparó a partir de las soluciones concentradas que se muestran en la **Tabla 3.2**. La solución de oligoelementos, es una solución de 1.5 g de ácido nitrilo triacético en 950 mL de agua destilada, ajustando el pH a 6.5 con una solución de KOH y aforando a un litro.

Tabla 3.2. Composición del medio mineral del reactor UASB. (Balch *et. al.*, 1979).

Reactivo	Solución Concentrada g/L	mLSln./Lmedio
Solución Mineral I		
$K_2 HPO_4$	6.0	10
Solución Mineral II	6.0	
	2.4	
	12	10
	2.1	
KH_2PO_4	0.16	
(NH_4Cl)		
$(NaCl)$		
$(MgCl_2 \cdot 6H_2O)$		
$(CaCl_2 \cdot H_2O)$		
Solución de oligoelementos	3.0	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	
$MnSO_4 \cdot 2 H_2O$	1.0	5
$(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$	0.1	
$(CoCl_2)$	0.1	
$(ZnSO_4)$	0.1	
$(CuSO_4 \cdot 5H_2O)$	0.01	
(H_3BO_3)		

3.3 Alimentación del reactor UASB

En la **Tabla 3.3**, se muestran las diferentes etapas de alimentación que se realizaron en el reactor.

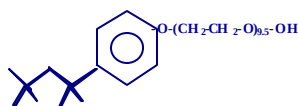


Tabla 3.3. Diferentes etapas de alimentación en el reactor UASB.

Etapa	Lactosa mg/L	Tritón X-100 mg/L	Lixiviados  mgDQO/L
I	1000	0 20 50 100	
II	800 600		200 400
III	1000	100 250 350	

 La composición de los lixiviados se presenta en la Tabla 1.1 de introducción

3.4 Tratamiento de las muestras

Se evaluó el funcionamiento del reactor a la entrada y la salida cada 24 horas, utilizando las técnicas analíticas que se muestran en la **Tabla 3.4**.

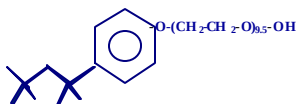
Tabla 3.4 Tratamiento de las muestras.

Influente	Efluente	Técnica
*pH *Demanda química de oxígeno *Cuantificación del Surfactante *Flujo mL/día	*pH *Demanda química de oxígeno *Cuantificación del Surfactante *Relación de alcalinidad *Flujo del biogas mL/día. *Metano	*Instrumental *Reflujo cerrado *HPLC *Titulación *Desplazamiento *Cromatografía de gases

3.5 Técnicas Analíticas

3.5.1 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La determinación de la demanda química de oxígeno es empleada como una medida del contenido de oxígeno equivalente de la materia orgánica de la muestra que es susceptible a oxidación por un oxidante químico fuerte (APHA 1995). El método



empleado fue el de reflujo cerrado (APHA, 1995). Se prepararon las soluciones A y B con el siguiente procedimiento:

A. Solución digestora. 50 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) se secaron durante dos horas a $103^\circ C$, la sal se enfrió en un desecador y se disolvió en 500 mL de agua destilada en un matraz aforado de un litro, se adicionaron 33.33 g de sulfato de mercurio ($HgSO_4$). En baño de hielo se adicionaron 167 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) puro y se aforo a 1L.

B. Solución de Ácido Sulfúrico con sulfato de plata. 5.8 g de Ag_2SO_4 se disolvieron en 300 mL del ácido sulfúrico (H_2SO_4) puro, en un matraz aforado de un litro para posteriormente aforar con H_2SO_4 .

Procedimiento: En un tubo HACH con tapa de rosca se tomaron dos mililitros de muestra a analizar, se añadió 1 mL de la solución digestora y lentamente 2 mL de la solución de ácido sulfúrico con sulfato de plata.

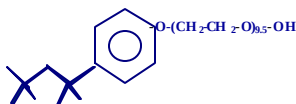
El tubo se tapó perfectamente y se colocó en una parrilla para la digestión a $150^\circ C$, durante dos horas, pasado ese tiempo se dejó enfriar y se leyeron las muestras en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 620 nm.

Curva estándar de DQO

Se preparó una curva estándar con una solución de glucosa de 1 g/L y por triplicado. La curva estándar se muestra en la **Figura 3.3**. Basándose en la curva, la ecuación para cuantificar la DQO fue:

$$\text{Absorbancia} = 2353 \text{ DQO} \left(\frac{mgO_2}{L} \right) + 9.2374 \text{ ----- (3.1)}$$

$$r^2 = 0.9997$$



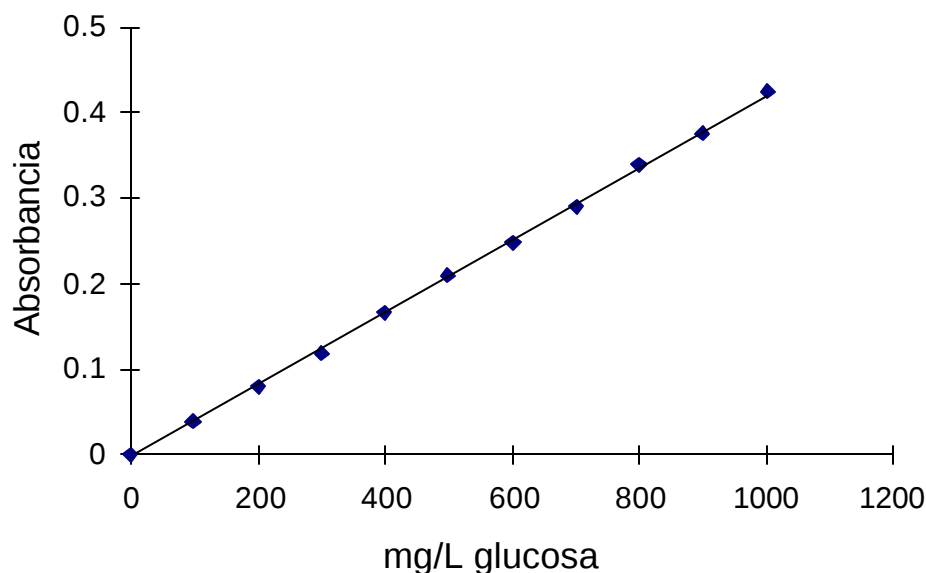


Figura 3.3. Curva estándar para cuantificar el DQO

3.5.2 DQO teórico

Para las etapas I y III, el DQO teórico se determinó con el material orgánico que entró al reactor (lactosa y surfactante). La contribución de la lactosa al DQO teórico se determinó mediante la ecuación estequiométrica siguiente:



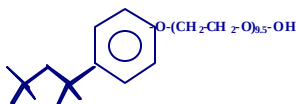
$$PM_{\text{lactosa}} = 342 \text{ g/mol}$$

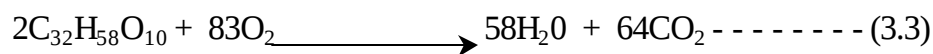
$$\text{PM}_{\text{O}_2} = 16 \cdot 2 \cdot 12 = 384 \text{ g/mol}$$

Basándose en la definición del DQO, el factor estequiométrico que permite conocer los gramos de DQO por gramo de lactosa es:

$$\left[\frac{384gO_2}{342gC_{12}H_{22}O_{11}} \right] \equiv \left[\frac{1.06gDQO}{gC_{12}H_{22}O_{11}} \right]$$

Para el surfactante no iónico Tritón X-100, la ecuación estequiométrica utilizada fue:





$$\text{PM}_{\text{Tritón X-100}} = 625 \cdot 2 = 1250 \text{ g/mol}$$

El factor estequiométrico que permite conocer los gramos de DQO por gramo surfactante es:

$$\left[\frac{2656gO_2}{1250gTritón} \right] \equiv \left[\frac{2.12gDQO}{gTritón} \right]$$

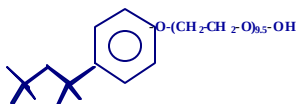
3.5.3 Cuantificación del metano

Para la cuantificación del metano se empleó un cromatógrafo de gases (modelo GOW-MAC), con detector de conductividad térmica TCD, utilizando como gas acarreador helio. En la **Figura 3.4**, se presenta el equipo empleado mientras que en la **Tabla 3.5**, se muestran las condiciones en las que operó el cromatógrafo.



Figura 3.4.Cromatógrafo de gases GOW-MAC.

Se realizó una curva estándar con metano y dióxido de carbono en botellas serológicas de 60 mL. La curva estándar se muestra en la **Figura 3.5**. La ecuación con la que se cuantifico el metano fue:



$$\text{Area} = 1333.2n_{\text{CH}_4} - 2638.8 \quad \text{--- (3.4)}$$

$$\mathbf{r}^2 = 0.995$$

Tabla 3.5. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases GOW MAC.

temperatura de la columna	140°C
temperatura del detector	190°C
temperatura del inyector	170°C
gas acarreador	Helio
presión _{He}	50 psi
flujo _{He}	30 mL/min

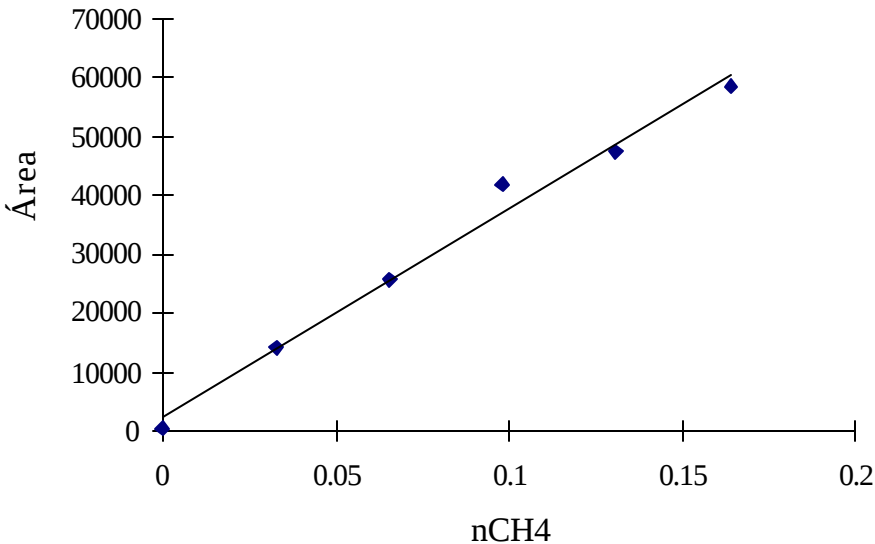
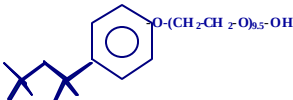


Figura 3.5. Curva estándar para cuantificación del metano.

3.5.4 Metano teórico

Para calcular el metano teórico total se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{CH}_4_{\text{TEORICO}} = \text{F} (\text{DQO}_E - \text{DQO}_S) * 0.34 * \% \text{CH}_4 \text{-----} \quad (3.5)$$



El metano experimental se obtuvo mediante volumetría y cromatografía de gases. Volumétricamente se determinaba el desplazamiento del líquido por la producción del biogas, y el metano producido se cuantificó mediante la ecuación:

$$CH_4 \text{ EXPERIMENTAL} = \left[\frac{\Delta h}{\Delta t} \right] * A * \left[\frac{0.8 \text{ atm} * 273 \text{ K}}{1 \text{ atm} (273 \text{ K} + 35)} \right] * \frac{\%CH_4}{100} \text{ ----- (3.6)}$$

donde:

DQO_E = materia orgánica en la entrada (g/L)

DQO_S = materia orgánica salida (g/L)

F = Flujo de alimentación (L/día)

Factor de conversión $0.34 \frac{LCH_4}{gDQO}$

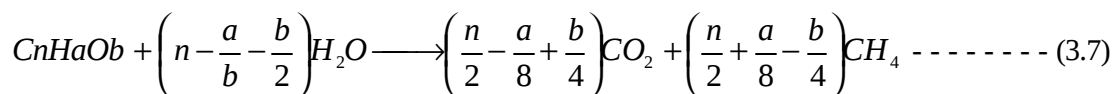
Dh = desplazamiento del líquido (cm)

Dt = intervalo de tiempo (día)

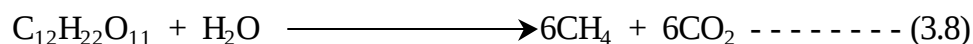
A = área de la columna de desplazamiento (cm²)

%CH₄ = porcentaje de metano en el biogas producido.

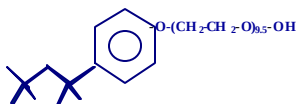
Para determinar el metano teórico producido por cada sustrato, se empleó la ecuación de predicción propuesta por Buswell y Mueller (1952):



Basándose en la ecuación (3.7), la reacción estequiométrica para el metano teórico a partir de la lactosa vendrá dado por:

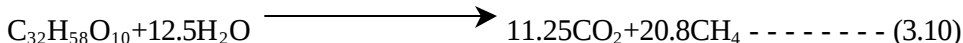


El factor estequiométrico que determina los gramos de metano teórico por gramo de lactosa es:



$$\left(\frac{96g\ CH_4}{342g.\ lactosa}\right) \equiv \left(\frac{0.281g\ CH_4}{g\ lactosa}\right) \text{-----} (3.9)$$

Basándose en la ecuación (3.7), la reacción estequiométrica para el metano teórico a partir del Tritón X-100 vendrá dada por:



El factor estequiométrico que determina los gramos de metano teórico por gramo de Tritón X-100 es:

$$\left(\frac{332.8 \cdot g \cdot CH_4}{625 \cdot g \cdot Tritón}\right) \equiv \left(\frac{0.532 \cdot g \cdot CH_4}{g \cdot Tritón}\right) \text{-----} (3.11)$$

3.5.5 Cuantificación del biogas

El biogas producido se cuantifico mediante una técnica volumétrica que se basa en el desplazamiento de una solución salina en columna (**Figura 3.6**). Se utilizó una solución saturada de NaCl a 300g/L, ajustándose el pH a 3 y usando rojo de metilo como indicador.

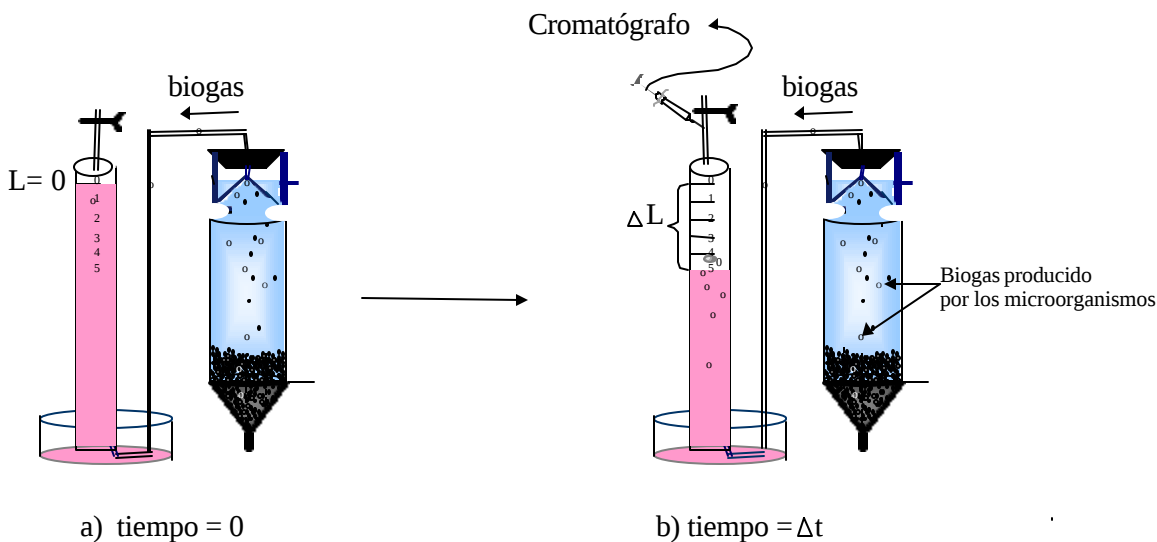
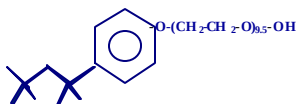


Figura 3.6 Columna para cuantificación del flujo del biogas



Para el tiempo inicial (t_0), la columna se llenaba con solución salina. Cada 14 horas se registro el volumen de solución desplazado en la columna por el biogas. En el calculo del flujo de biogas producido (Q) se utilizo la ecuación:

$$Q = \frac{\Delta L}{\Delta t} * A \text{ ----- (3.12)}$$

donde:

ΔL = desplazamiento del volumen por el biogas (cm)

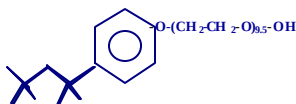
Δt = tiempo (día)

$A: \pi * \frac{(\text{diámetro})^2}{4}$ (cm²)

3.5.6 Cuantificación del Surfactante

En la cuantificación del surfactante no iónico Tritón X-100 (Sigma), se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta presión HPLC. Se uso un equipo de Thermo Separation Products integrado por: una columna Prodigy ODS-2 de 15 cm de longitud, un inyector manual TSP # 20709, bombas constaMetric 4100 TPS # 920558001 y constaMetric 3500 TPS # 92055, un detector Serial UV spectroMonitor 5000 TPS # 920552 y un paquete de computo Lctalk versión 2.03. En la **Figura 3.7.** se presenta el equipo completo.

En el análisis de las muestras se utilizó una fase móvil compuesta por una mezcla de acetonitrilo-agua-ácido-acético en una proporción (80:15:5), con un flujo de 1ml/min, alcanzando una presión de 950-1050 psi. En el método el tiempo de retención para el Tritón X-100 fue de 4.8 minutos. Para mejorar la resolución en la cuantificación del surfactante se utilizó un estándar interno (200 mg Tritón/L). En la **Figura 3.8,** se muestra la curva estándar del surfactante Tritón X-100.



Preparación de las muestras

Se tomaron muestras del influente, efluente y los gránulos. De los dos primeros se recolectaron muestras de 1.5 mL, centrifugándose a 15,000 r.p.m durante 15 minutos. El estándar interno era adicionado y filtrado a través de acrodiscos (Millipore) de 0.45 μm con diámetro de 1 cm. Los análisis se realizaron a temperatura constante de 30°C.



Figura 3.7 Equipo de HPLC (Thermo Separation Products)

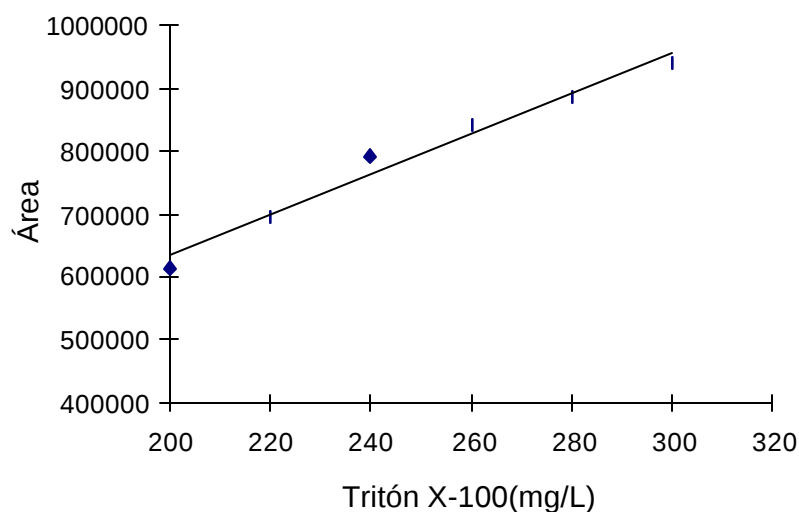
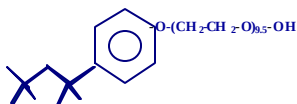


Figura 3.8 Curva estándar para cuantificar el Tritón X-100.



Del reactor se recolectaron 2 mL de los gránulos y se les eliminó el sobrenadante. A cada muestra se le adicionó 5 mL de acetonitrilo, sonicándose por 45 minutos y centrifugándose durante 15 minutos a 15, 000 r.p.m. El sobrenadante del centrifugado se analizó por HPLC. La relación mediante la cual se determinó el surfactante en los gránulos fue:

$$\left[\frac{mgSurfact}{L_{Lavado}} \right] \left[\frac{L_{Lavado}}{mL_{Lodo}} \right] \left[\frac{mL_{Lodo}}{L_{reactor}} \right] \left[\frac{L_{reactor}}{gSSV} \right] = \frac{mgSurfact}{gSSV} \text{ ----- (3.13)}$$

donde:

$\frac{mgSurfact}{L_{Lavado}}$: mg de surfactante por litro de acetonitrilo.

$\frac{L_{Lavado}}{mL_{Lodo}}$: litros de acetonitrilo por mL de gránulos.

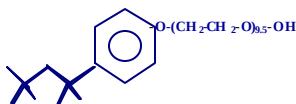
$\frac{mL_{Lodo}}{L_{reactor}}$: mL de gránulos por L de reactor.

$\frac{L_{reactor}}{gSSV}$: biomasa por litro de reactor.

3.5.7 Relación de Alcalinidad

La relación de alcalinidad (α) es un cociente entre los ácidos grasos volátiles (AGV's) formados durante la digestión anaerobia y los carbonatos empleados para amortiguar el pH del reactor (Eaton *et al.*, 1995):

$$\alpha = \left[\frac{AGV's}{CO_3^{=}} \right] \quad \text{o} \quad \alpha = \left[\frac{AGV's}{HCO_3^{-}} \right] \text{ ----- (3.14)}$$



Durante la digestión anaerobia, cuando $\alpha = 0.5$, existe un equilibrio en la formación y consumo de AGV's. Para $\alpha < 0.5$, el reactor tiene una buena capacidad de amortiguamiento de AGV's. Finalmente, si $\alpha > 0.5$, indica la acumulación de AGV's en el reactor.

En la alcalinidad, contribuyen principalmente los iones bicarbonato CO_3H , carbonato CO_3^- , y oxhidrilo OH^- (APHA, 1995). El procedimiento de la técnica se describe a continuación: Se preparó una solución estándar de ácido sulfúrico 0.02 N para la valoración de la muestra. En un vaso de precipitado se colocaron 25 mL de la muestra manteniéndose en agitación. Se registro el pH inicial. Se adiciono lentamente la solución valorada de ácido sulfúrico sin dejar de agitar, hasta alcanzarse un pH de 5.75. El volumen empleado era registrado y se proseguía adicionando solución estándar hasta alcanzar un pH de 4.3, registrándose nuevamente el volumen utilizado (**Figura 3.9**).

Para el calculo de la relación de alcalinidad, se empleo la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{V_{4.3} - V_{5.75}}{V_{4.3}} \text{ ----- (3.15)}$$

donde

$V_{4.3}$: volumen total empleado hasta pH de 4.3.

$V_{5.75}$: volumen empleado para llegar a pH de 5.75

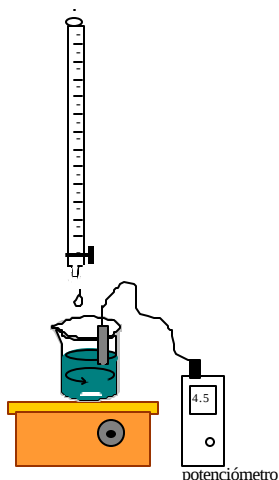
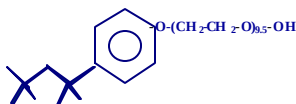


Figura 3.9 Técnica para la cuantificación de la relación de alcalinidad



3.5.8 Azúcares Totales

Los azúcares totales se determinaron mediante el método de fenol sulfúrico. Se utilizaron muestras de 2 mL. A cada muestra se le adicionó 1 mL de una solución de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, incubándose las muestras durante 20 minutos a 30°C. Las muestra se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm. Se realizó una curva estándar con lactosa hasta 100 mg/L (**Figura 3.10**).

La ecuación mediante la cual se determinaron los azúcares fue:

$$C_{azuc} = \left(\frac{A - 0.0471}{0.0106} \right) * D \text{ ----- (3.16)}$$

$$r^2 = 0.9906$$

donde:

A: absorbancia leída a 480 nm.

C_{azuc} : concentración del azúcar en (mg/L)

D: factor de dilución

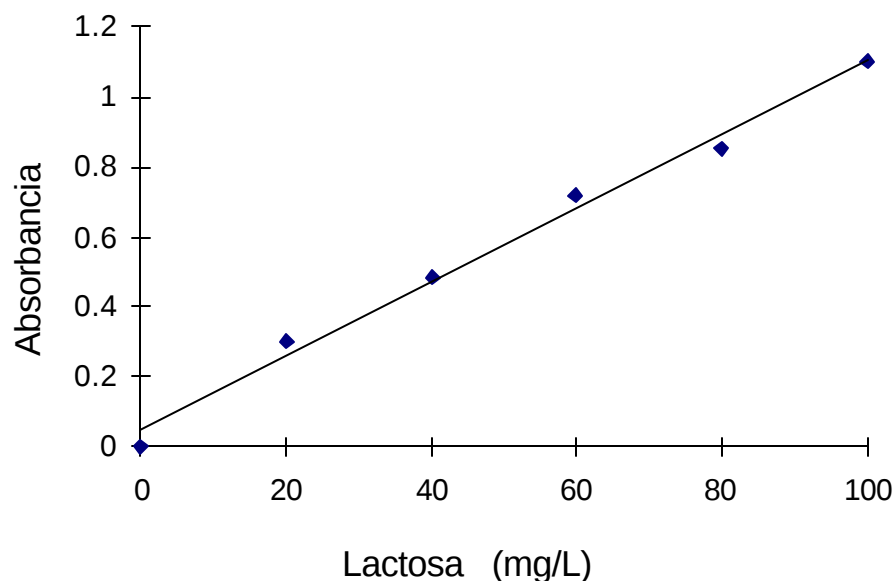
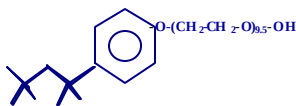


Figura.3.10 Curva estándar para cuantificar la lactosa.



3.5.9 pH

La cuantificación del pH se realizó directamente sobre las muestras utilizando para ello un potenciómetro.

3.5.10 Sólidos

I. Sólidos Suspendidos Totales (SST)

Los sólidos totales son la suma de los sólidos disueltos y los sólidos en suspensión.

Procedimiento: 25 mililitros de los lodos del reactor se centrifugaron a 5,000 r.p.m durante 10 min eliminando el sobrenadante. Posteriormente el sedimento se colocó en un crisol previamente puesto a peso constante. El crisol se colocó en estufa a 103-105°C durante una hora. Pasado este tiempo se enfrió en desecador hasta llevarse a peso constante.

El calculo de los ST se realizó empleando la ecuación siguiente:

$$\frac{mgST}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{Vm} \text{ ----- (3.17)}$$

donde:

$\frac{mgST}{L}$: miligramos de sólidos totales por litro

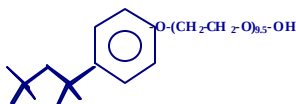
A: Peso del crisol + muestra seca (mg)

B: Peso del crisol vacío (mg)

Vm: Volumen de muestra utilizada (L)

II. Sólidos Suspendidos fijos (SSF)

Procedimiento: Se calcinaron los residuos producidos del método de ST en una mufla a 550°C durante 30 minutos. El crisol se transfirió a una estufa a temperatura de



105°C durante 30 minutos. Posteriormente se enfrió el crisol en un desecador hasta llevarse a peso constante. Los SFT se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\frac{mgSTF}{L} = \frac{(A - B) * 1000}{Vm} \text{ ----- (3.18)}$$

donde:

$\frac{mgSTF}{L}$: miligramos de sólidos totales fijos por litro.

A: Peso del crisol + residuos después de la calcinación (mg)

B: Peso del crisol vacío (mg)

V_m: Volumen de muestra utilizada (L)

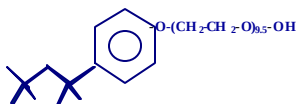
III. Sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) se calcularon por diferencia de los sólidos totales (ST) y los sólidos fijos totales (SFT).

$$\frac{mgSSV}{L} = \frac{mgST}{L} - \frac{mgSFT}{L} \text{ ----- (3.19)}$$

3.5.11 Determinación de la actividad metanogénica

Para la evaluación de la actividad metanogénica de los lodos del reactor se realizó una cinética (**Figura 3.11**) en botellas serológicas de 60 mL. El procedimiento fue el siguiente: se preparó medio mineral de Balch *et al.*, (1979) en un matraz aforado de un litro. Posteriormente se vertió el medio en un matraz erlenmeyer de 2 L, al cual se le hizo pasar una corriente de nitrógeno en el medio mineral para garantizar condiciones anaerobias. Se adicionaron 0.5 g cisteína/L y se llenaron las botellas serológicas con 25 mL del medio sellándose con tapones de hule y septos de aluminio. Enseguida se adiciono nuevamente y durante un minuto nitrógeno (N₂) y dióxido de carbono (CO₂). Se esterilizaron las botellas y se adicionaron los diferentes sustratos (glucosa,



propionato, butirato, acetato e hidrógeno). Finalmente se inoculó en condiciones anaerobias con los gránulos del reactor (5 mL). Las variables de respuesta fueron la producción de metano cuantificado cada 4 horas y el consumo del sustrato al tiempo final.

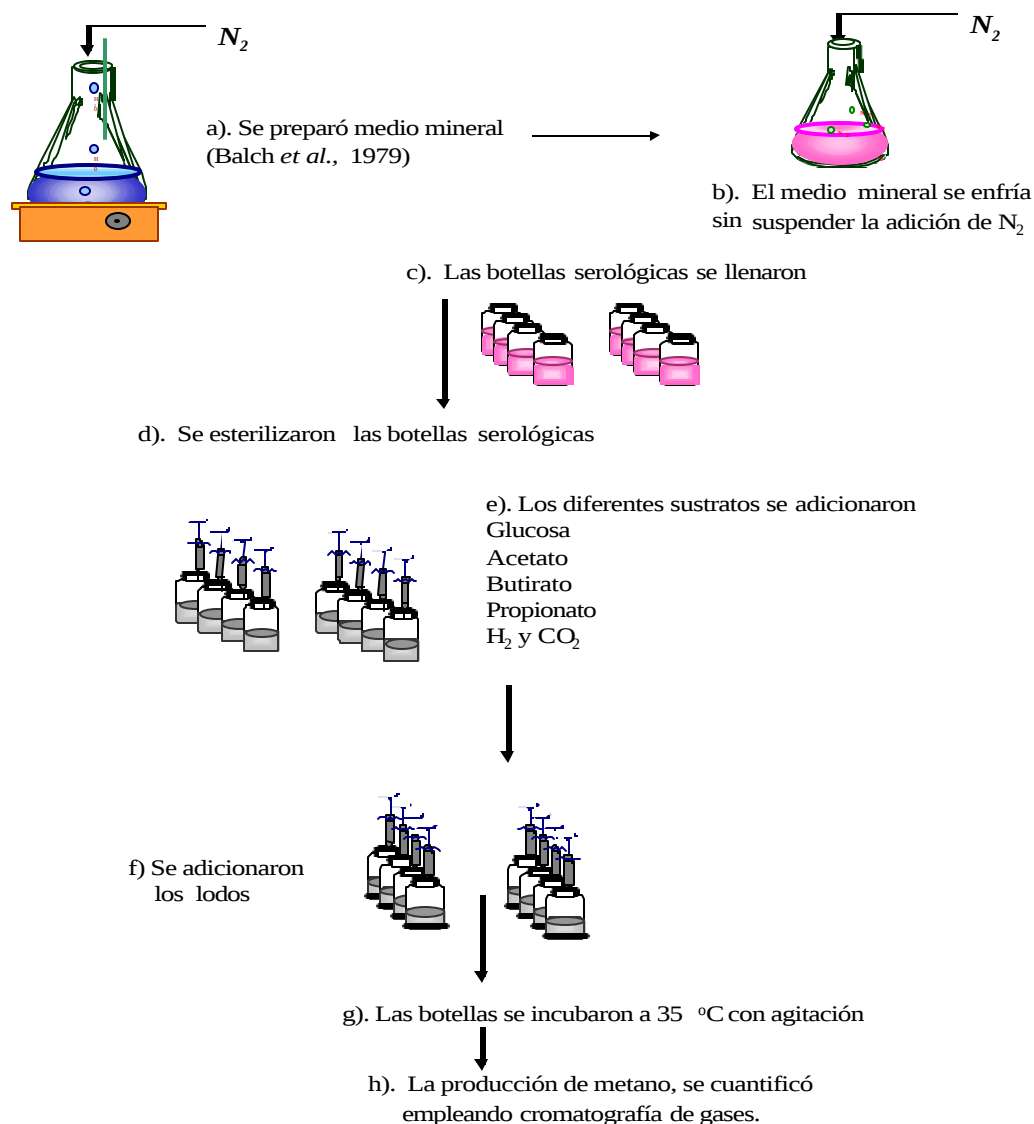
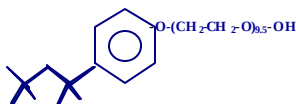


Figura 3.11 Representación esquemática de la cuantificación de la actividad metanogénica.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

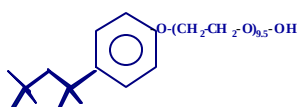
4.1 Biodegradación anaerobios del surfactante no iónico, Tritón X-100.

Con el propósito de iniciar el funcionamiento del reactor y evaluar la biodegradación del surfactante por digestión anaerobia, se alimento el reactor UASB con lactosa (1 g/L) y con diferentes concentraciones de surfactante (0, 20, 50 y 100 mg/L), empleándose un tiempo de retención hidráulico (TRH) de un día. Los cambios se realizaron cuando se obtenía una eficiencia de eliminación de la materia orgánica por lo menos del 80 % en estado estacionario (5 TRH del reactor sin variaciones mayores del 15 %). A continuación se presentan los resultados obtenidos.

4.1.1 Efecto del surfactante en la demanda química de oxígeno (DQO)

En la **Figura 4.1** se presenta la materia orgánica (expresada como mgDQO/L) en el influente y efluente del reactor UASB durante 160 días de operación. Cada línea vertical, indica un cambio en la concentración del surfactante en la alimentación.

La materia orgánica en el efluente del día 13 al 40 fue en promedio de 150 mg DQO/L correspondiendo a las tres primeras concentraciones del surfactante experimentadas. Sin embargo del día 40 al 55 la concentración en el efluente fue aumentando gradualmente hasta obtener valores de 400 mg/L. Este periodo coincide con el aumento del surfactante en el influente a 100 mg/L de Tritón X-100. A partir del día 57 la concentración de materia orgánica empezó a disminuir hasta alcanzar los 220 ± 20 mg DQO/L alrededor del día 70, estabilizándose el reactor respecto a esta variable.



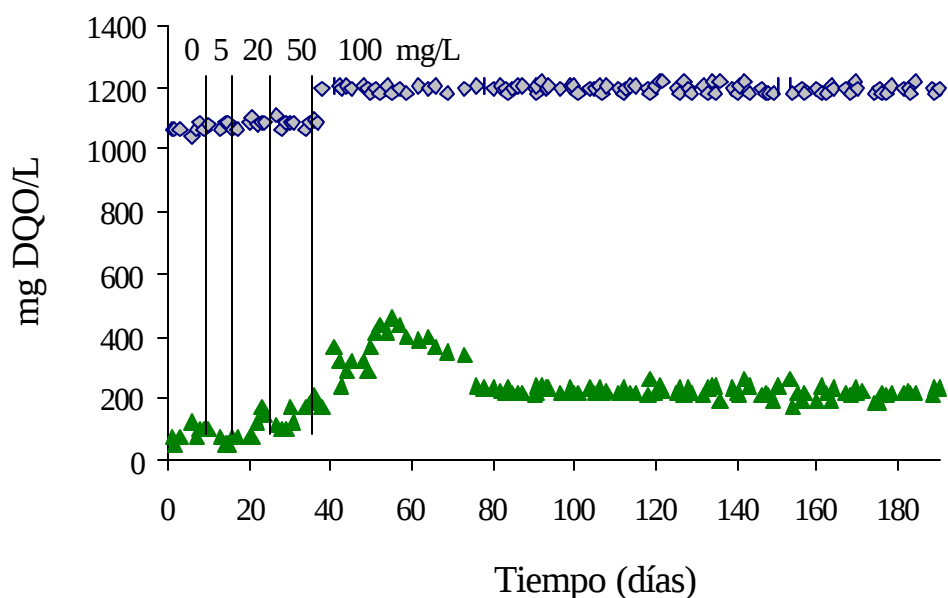
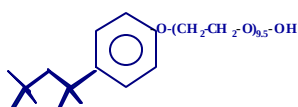


Figura 4.1 Materia orgánica (mg DQO/L) en el influente [◇] y efluente [▲] del reactor con respecto al tiempo de operación.

Para observar con más detalle el efecto de la concentración del surfactante en los gránulos del reactor, en la **Figura 4.2** se muestran las eficiencias de eliminación de materia orgánica para cada concentración de Tritón X-100 experimentada. Se observa que a medida que aumenta la concentración del surfactante, la eficiencia de eliminación de materia orgánica disminuye gradualmente.

En el periodo de 40 a 50 días, la remoción de materia orgánica disminuyó hasta un 60% coincidiendo con el aumento de la concentración del surfactante de 50 a 100 mg/L después del día 50 se recupera la eliminación de materia orgánica, se considera esta etapa como de adaptación de los microorganismos al Tritón X-100. Se puede apreciar que el reactor necesitó de 20 días en recuperarse al cambio realizado. Después del día 70 se obtuvieron resultados muy regulares con una eficiencia de eliminación de DQO promedio del 81%.



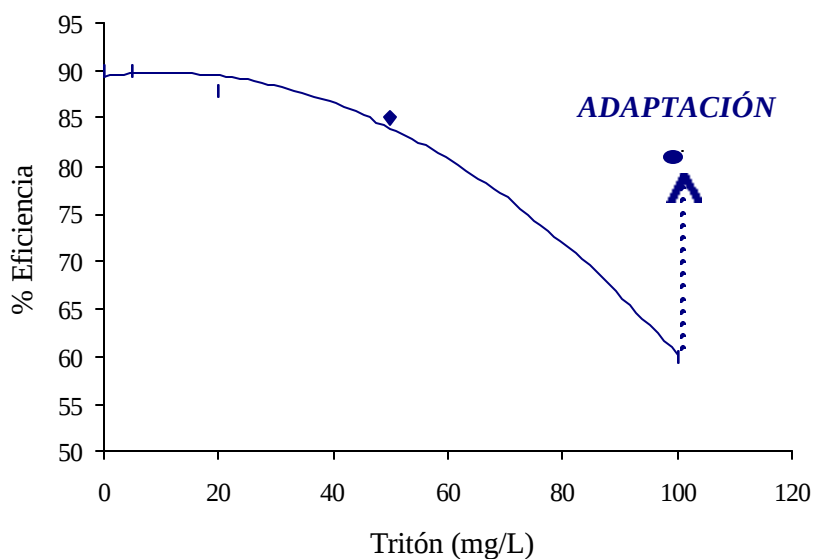


Figura 4.2 Eficiencia de la eliminación de materia orgánica (DQO) en el reactor UASB.

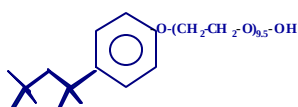
En el influente, se encontraban presentes como fuentes de materia orgánica la lactosa y el surfactante. Mediante la técnica de DQO, no se puede diferenciar el consumo de uno u otro sustrato, por lo que para determinar el consumo del Tritón por los microorganismos, se realizaron análisis del surfactante en la fase acuosa y en los gránulos.

4.1.2 Surfactante

I. Surfactante en la fase acuosa

Una vez que se observó la adaptación del reactor a la presencia del Tritón a una concentración de 100 mg/L en el influente, se cuantifico su desaparición en el reactor.

En la **Figura 4.3** se muestra la concentración del surfactante Tritón X-100 en la entrada y salida del reactor en mg/L.



En la gráfica se observa una eliminación promedio del surfactante del 82%, con una respuesta uniforme durante 60 días.

Se han reportado diferentes trabajos con altas eficiencias de eliminación de surfactantes. Prats *et al.*, (1997), realizaron un estudio comparativo entre un surfactante aniónico (alquil bencen-sulfonato LAS) y un surfactante no iónico, en un sistema anaerobio. Empleando concentraciones iniciales de 15.7 mg/L y 5.4 mg/L respectivamente, obteniendo porcentajes de biodegradación por arriba del 90% en ambos casos. Sin embargo, las concentraciones iniciales del surfactante empleadas en estos estudios, son de un orden de magnitud menor a las utilizadas en el presente trabajo.

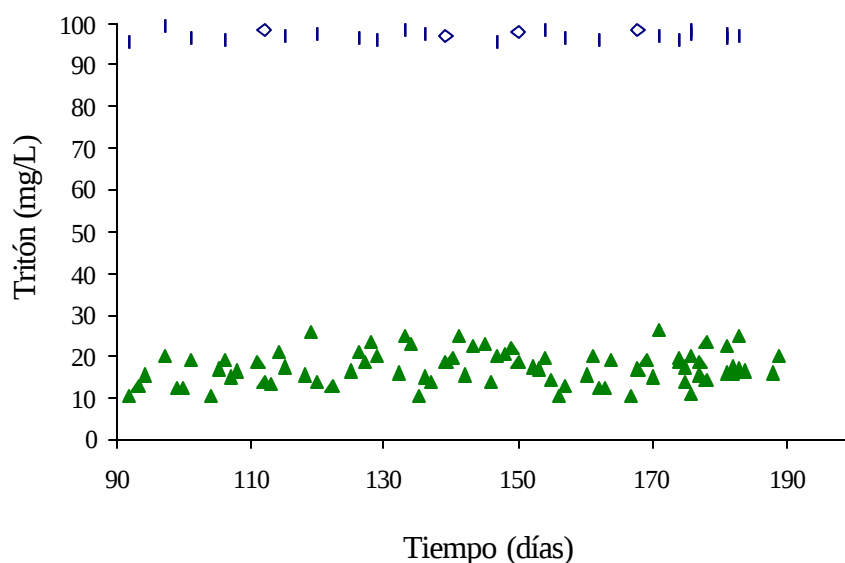
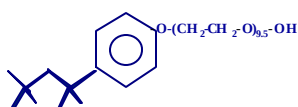


Figura 4.3. Surfactante en el influente [Δ] y el efluente [▲] del reactor UASB.

II. Surfactante en los gránulos

En la **Figura 4.4** se presentan los resultados de la sorción del surfactante en los gránulos del reactor con una concentración de surfactante en el influente de 100 mg/L.



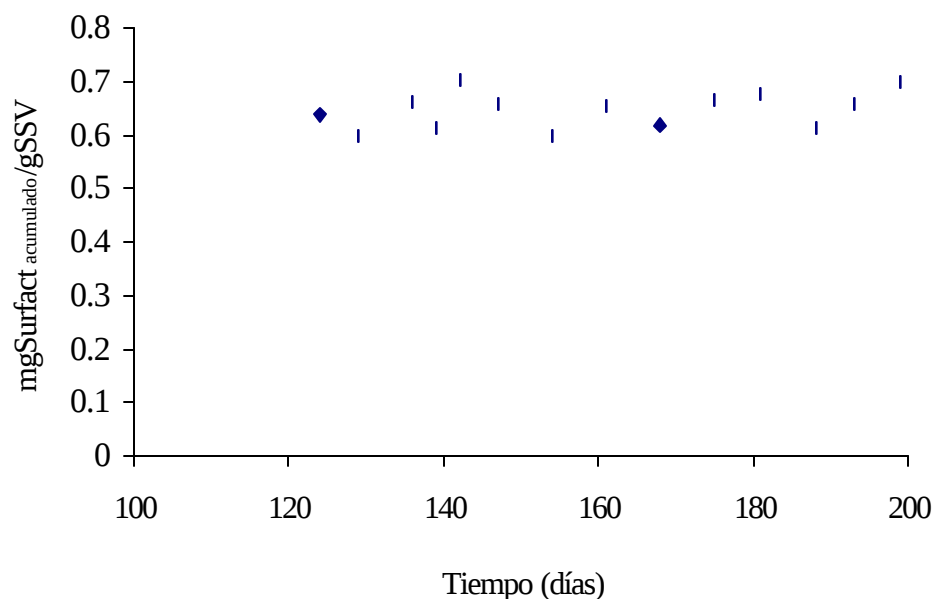


Figura 4.4 Sorción del surfactante en los gránulos anaerobios y velocidad de consumo del Tritón X-100.

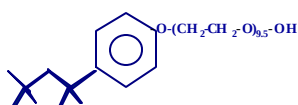
Se observa que la sorción del surfactante en los gránulos es constante, obteniéndose un valor de saturación promedio de $0.63037 \pm 0.055 \text{ mg Surfact/SSV}$ con lo que se demuestra que no hay acumulación del surfactante en los gránulos a esta concentración de surfactante en el influente.

A partir de la ecuación 1.1¹ se calcula la velocidad de consumo del surfactante (sustituyendo a S por T; que se refiere a la concentración del Tritón X-100). Obteniéndose un valor de 80 mgTritón_{CONSUMIDOS}/L*día a una velocidad de alimentación de 100 mg/L*día.

$$V \frac{dT}{dt} = F(T_o - T) - g.V \text{ ----- (4.1)}$$

Para explicar el mecanismo de sorción del surfactante en los gránulos, se propone un modelo esquemático presentado en la **Figura 4.5**. El modelo consiste de los siguientes pasos.

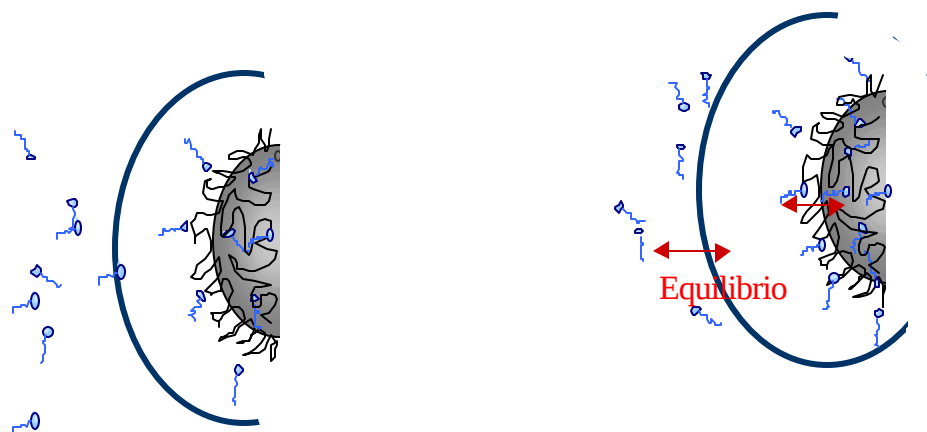
¹ de introducción





(a)

(b)



Tritón a concentración alta (100 mg/L)

(c)

(d)

CC(C)(C)Cc1ccc(cc1)OCCCCCCCCCO

a) Cuando se alimenta el surfactante al reactor, es necesario el transporte del seno del líquido al gránulo lo cual puede ser por difusión.

b) Si el surfactante se encuentra a muy bajas concentraciones la velocidad de difusión será igual a la velocidad de consumo (o transformación). c) Si la concentración del surfactante aumenta en el influente y la velocidad de difusión es mayor a la velocidad de consumo, se llevará a cabo la sorción del surfactante en los gránulos.

d) Cuando se pone en contacto durante un periodo largo de tiempo al gránulo con una concentración constante de surfactante se puede alcanzar un equilibrio dinámico entre la sorción y desorción. Como la cantidad de surfactante retenido en los gránulos es constante, no hay acumulación del surfactante en los gránulos (la concentración del surfactante en los gránulos es la misma a lo largo del tiempo)

Hay varias formas por las que el surfactante puede disminuir dentro del reactor (**Figura 4.6**). La primera es una biodegradación total que lo lleve hasta metano y dióxido de carbono ó únicamente una transformación parcial, quedando como fenoletoxilato o un alquilfenol. La segunda es que haya una retención o sorción (ya que se desconoce si de absorbe o adsorbe) en los gránulos por lo que no se encuentra en el efluente

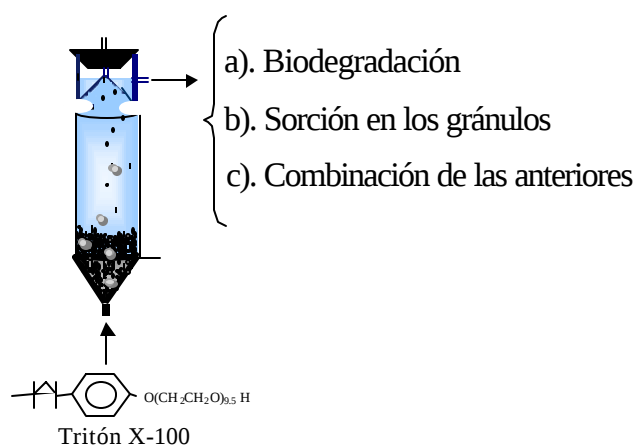
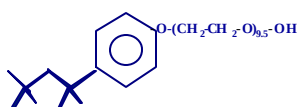


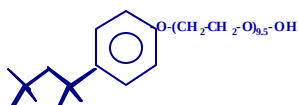
Figura 4.6. Representación de las opciones en la desaparición del Tritón al entrar al reactor.



4.1.3 Producción de metano

En la **Figura 4.7** se presenta el metano esperado teóricamente y el medido experimental obtenido a lo largo del tiempo de operación del reactor.. Durante el periodo de 0-40 días de operación, el metano teórico promedio fue de $0.203 \pm 0.0234 \text{ L}_{\text{CH}_4}/\text{L}_{\text{reactor}} \cdot \text{día}$ con un coeficiente de variación de 7.6 %, mientras que el metano experimental promedio fue de $0.147689 \pm 0.02046 \text{ L}_{\text{CH}_4}/\text{L}_{\text{reactor}} \cdot \text{día}$ con un coeficiente de variación de 13.74%. La diferencia entre el metano teórico y experimental fue aproximadamente del 27 %, la cual se podría atribuir a que la materia orgánica que desaparecía en el reactor no se mineralizaba (CH_4 y CO_2) toda.

En el periodo del día 40 al 65 el metano esperado teóricamente y medido experimental, disminuyeron hasta valores promedio de 0.19023 ± 0.04634 y 0.12748 ± 0.0331241 $L_{CH4}/L_{reactor} \cdot \text{día}$ respectivamente. Se observó una etapa de inestabilidad en el reactor, coincidiendo con el cambio de concentración del surfactante de 50 a 100 mg/L. Una vez que se adaptó los gránulos a 100 mg/L del surfactante la producción de metano fue constante.



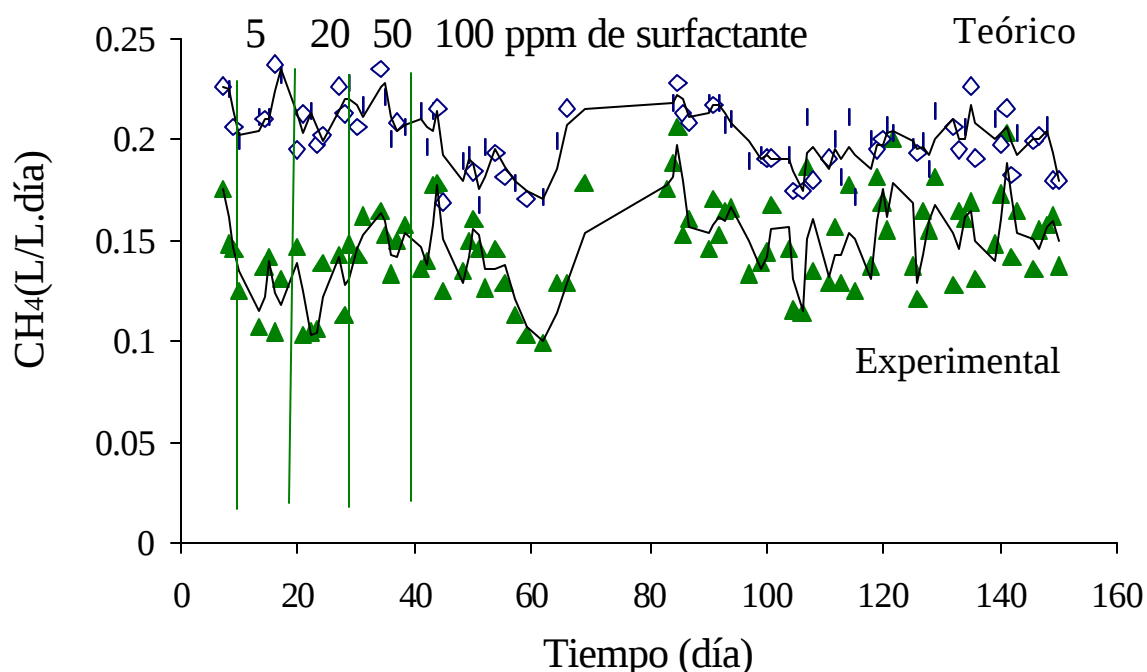


Figura 4.7. Metano teórico y experimental obtenido ($L_{CH_4}/L_{reactor} \cdot \text{día}$) a lo largo del tiempo de operación del reactor.

Durante el periodo de los días 80 a 160 el metano esperado teóricamente y el medido experimentalmente promedio fueron de 0.1998 y 0.1602 $L_{CH_4}/L_{reactor} \cdot \text{día}$ respectivamente. La diferencia fue del 20 %, que se considera una recuperación satisfactoria del metano.

Para distinguir cuanto metano fue producido por cada sustrato se utilizó la ecuación (3.7)². Los datos obtenidos se presentan en la **Tabla 4.1**.

En esta etapa, el metano se generó a partir de dos fuentes de carbono: la lactosa y el Tritón X-100. Sustituyendo los datos en la ecuación (4.1) y considerando el promedio del metano esperado del periodo de los días 80 a 160 se obtiene:

² de material y métodos

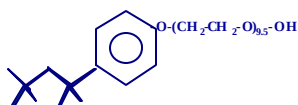


Tabla 4.1 Metano obtenido teóricamente empleando la ecuación de Buswell y Mueller (1952)

Sustrato	CH_4 $\left(\frac{L}{\text{día} * L_{\text{reactor}}} \right)$
Lactosa	0.18950
Tritón X-100	0.04110

$$\text{CH}_{4\text{Teórico por sustrato}} = \text{CH}_{4\text{LACTOSA}} + \text{CH}_{4\text{TRITON}} \neq \text{CH}_{4\text{experimental}} \text{ ----- (4.1)}$$

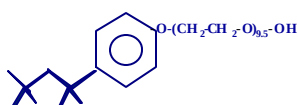
$$\text{CH}_{4\text{Teórico por sustrato}} = 0.1895 + 0.04110 = 0.2306 \frac{L_{\text{CH}_4}}{d * L_{\text{reactor}}}$$

Mediante los cálculos anteriores se comprueba que el metano experimental no coincide con el teórico producido únicamente por la mineralización de la lactosa que es el sustrato de más fácil degradación. El CH_4 experimental total fue de 0.1602 ± 0.013965 ($L_{\text{CH}_4}/L_{\text{reactor}} * \text{día}$) y el CH_4 calculado para la lactosa fue de 0.1895 ($L_{\text{CH}_4}/L_{\text{reactor}} * \text{día}$). Las diferencias entre el metano teórico y experimental, corrobora que el Tritón X-100 solo se biotransformó sin lograrse una mineralización del mismo.

4.1.4 Relación de alcalinidad

En la **Figura 4.8** se muestran los resultados de la relación de alcalinidad (α) con respecto al tiempo.

La relación de alcalinidad del día 0 al 40 de operación del reactor fue en promedio de 0.3578 ± 0.02948 con un coeficiente de variación de 8.5 %. En el periodo de los días 40 al 60 se observa que existe una perturbación de esta variable, lo cual coincide con el aumento de la concentración del surfactante de 50 a 100 mg/L, obteniéndose valores de alcalinidad de hasta 0.7. En este periodo la digestión anaerobia se detuvo, formándose ácidos grasos volátiles pero no metano, teniendo como consecuencia la disminución del pH en el reactor, alcanzando valores de pH=5. El intervalo de pH para un funcionamiento correcto de la digestión anaerobia es de 6-8 (Rivera *et al.*, 1993).



Finalmente del día 60 a 160 se obtuvieron valores de alcalinidad promedio de 0.3532, recuperándose la estabilidad del reactor con respecto a esta variable.

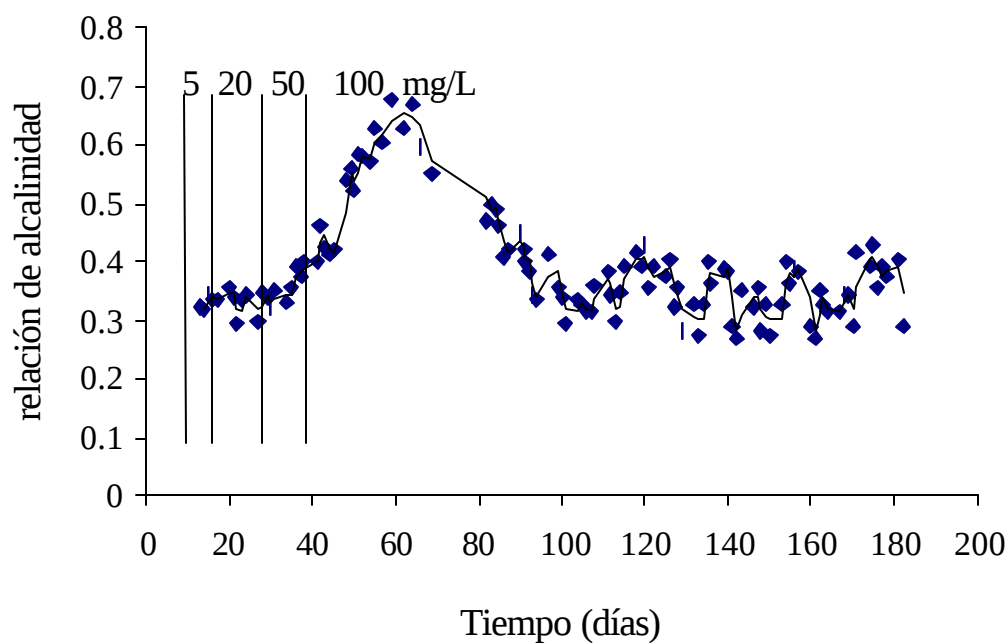
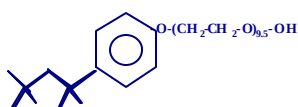
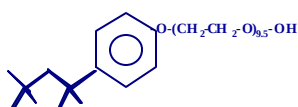


Figura 4.8. Relación de alcalinidad a lo largo del tiempo de operación del reactor.



4.1.5 Conclusiones parciales

- I. La adaptación de los gránulos anaerobios a una concentración de surfactante de 100 mg/L requirió de más de 20 días de operación en el reactor, comprobando que el Tritón X-100 es un compuesto agresivo para la digestión anaerobia.
- II. El Tritón X-100 tiene un efecto negativo en las variables de la digestión anaerobia (demanda química de oxígeno, producción de metano y la relación de alcalinidad).
- III. A 100 mg/L de surfactante en el influente se encontró una sorción promedio del surfactante en los gránulos de 0.63037 ± 0.055 mg *Surfact/gSSV*, sin haber acumulación de este en los gránulos.
- IV. Se encontró un 82% de desaparición del surfactante en el reactor a una concentración en el influente de 100 mg/L, sin que se obtuviera evidencia clara de su mineralización.



4.2 Efecto en la digestión anaerobia de los lixiviados del lavado de un suelo contaminado con hidrocarburos

Se evaluó el efecto de los lixiviados del lavado de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo en la digestión anaerobia. Para ello, se utilizaron dos concentraciones de los lixiviados (200 y 400 mgDQO/L) a un TRH de un día.

4.2.1 Efecto de los lixiviados en la demanda química de oxígeno (DQO)

En la **Figura 4.9** se presentan los resultados de la demanda química de oxígeno expresada en mgDQO/L para el influente y efluente a lo largo del tiempo de operación del reactor.

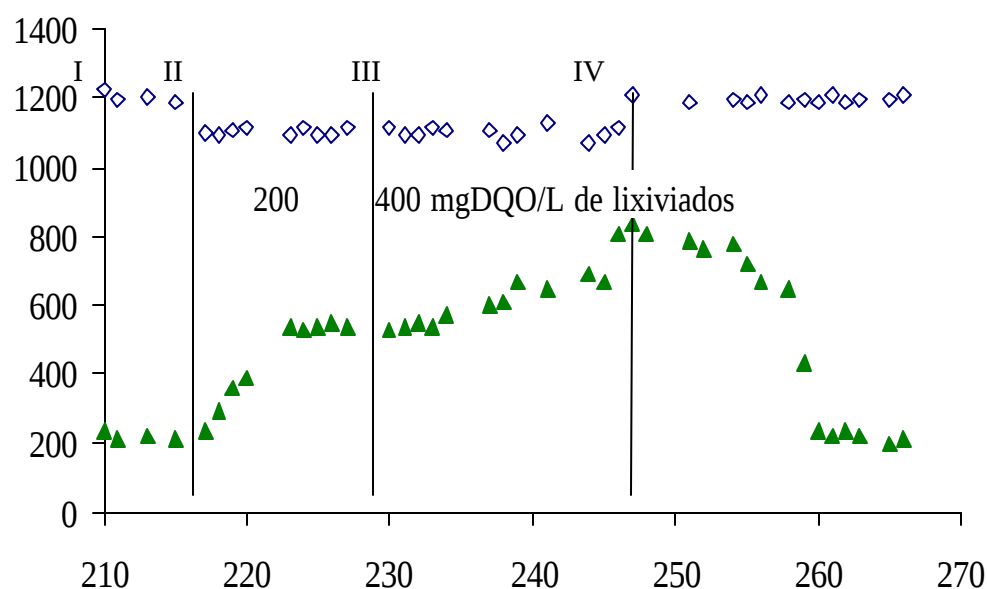
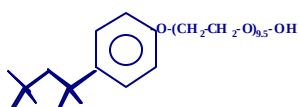
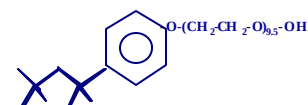


Figura 4.9 Materia orgánica (mg DQO/L) en el influente [◇] y efluente [▲] del reactor respecto al del tiempo de operación.

Cada línea vertical indica los cambios realizados en la alimentación del reactor. En la primera etapa (I) se alimentó con un medio compuesto de lactosa (1000 mg/L) y Tritón X-100 (100 mg/L). Como se observa en la **Figura 4.9**, los efluentes en el reactor





estas fuentes puede descartarse como la causante del efecto negativo respecto a los dos últimos por ser de fácil consumo.

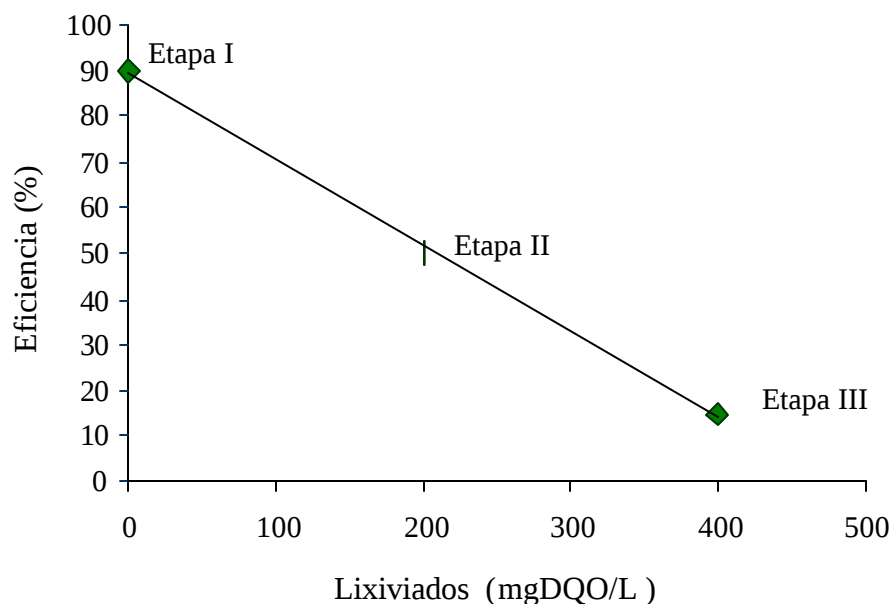
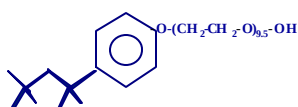


Figura 4.10. Eficiencia de eliminación de la materia orgánica respecto a las concentraciones de lixiviados empleados

En la etapa de adaptación del consorcio anaerobio al Tritón X-100 (I), la concentración máxima experimentada del surfactante fue de 100 mg/L, mientras que en los lixiviados utilizados en la etapa (III), el surfactante tenía una concentración de 180 mg/L (además de contar con la presencia de los hidrocarburos). Por lo que el efecto negativo se podría atribuir a la variedad de hidrocarburos presentes en los lixiviados (Tabla 1.1 de introducción) y el surfactante. Con el propósito de identificar el consumo del surfactante, se realizaron análisis de este en la fase acuosa.



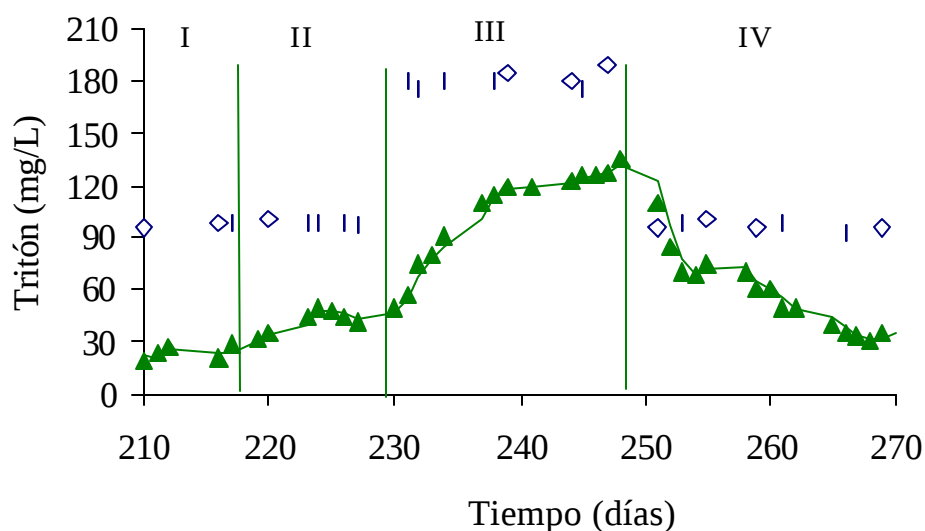
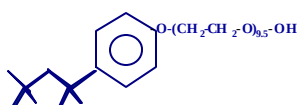


Figura 4.11. Surfactante en el influente y efluente del reactor con respecto al tiempo.



hidrocarburos. La concentración original del surfactante en los lixiviados fue alrededor de 4,000 mg/L. Este valor se encuentra muy por encima de la concentración micelar crítica ($\text{CMC}_{\text{Tritón}} = 110 \text{ mg/L}$; Edwards *et al.*, 1994), hallándose prácticamente todo el surfactante en forma de micelas. Cuando se realizaron las diluciones de los lixiviados para obtener una concentración final de 200 mgDQO/L, el Tritón X-100 se encontraba por debajo de su CMC, por lo que las micelas formadas se disociaron dejando libres a los hidrocarburos (**Figura 4.12**). Al alimentar con estos lixiviados diluidos al reactor, la concentración del surfactante en el influente fue de 90 mg/L.

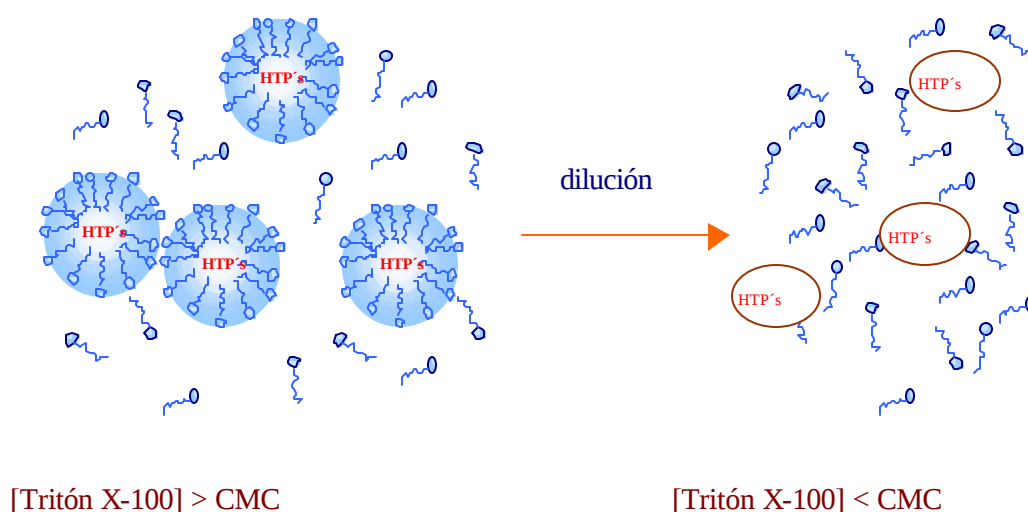
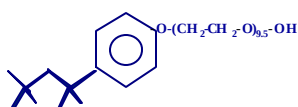


Figura 4.12 Dilución de lixiviados y liberación de hidrocarburos.

Considerando que la concentración de surfactante en los lixiviados a 200 mgDQO/L se encuentra por debajo de la experimentada en la etapa de adaptación (I), se podría descartar al Tritón X-100 como el causante del efecto negativo en el reactor durante la etapa (II), siendo los hidrocarburos los responsables de la disminución en la eficiencia de eliminación de materia orgánica.



En la etapa (III), la concentración de lixiviados experimentada fue de 400 mgDQO/L la cual contenía 180 mg/L del surfactante. En esta etapa el Tritón X-100 en el efluente fue aumentando gradualmente sin estabilizarse.

El origen del efecto negativo durante la etapa (III), es difícil de establecer, si se considera que la composición de materia orgánica en el influente era heterogénea (lactosa, surfactante en forma libre y micelar e hidrocarburos; Figura 4.13).

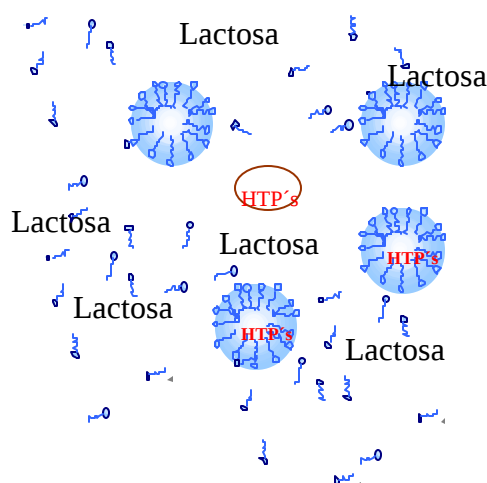
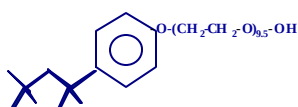


Figura 4.13 Composición del influente en la etapa (III).

Una probable explicación de cómo los hidrocarburos tienen un efecto negativo sobre los gránulos durante esta etapa es la siguiente: El hidrocarburo es transportado por las micelas del seno de la solución a la proximidad de la célula, liberándose los hidrocarburos al interaccionar el surfactante de la micela con las proteínas de los gránulos (Guha y Jaffè, 1996). Al ser liberados los hidrocarburos se ponen en contacto con los gránulos. Al no haber sido previamente adaptados los gránulos a los hidrocarburos una fracción de estos tendrán un efecto tóxico sobre cierto grupo de bacterias, necesitándose de un mayor tiempo para la adaptación de los mismos a los cambios realizados en la alimentación. Para conocer la fracción de la materia orgánica de los lixiviados que se mineralizó a CH_4 y CO_2 , se cuantificó el biogas producido por la digestión anaerobia.



4.2.3 Producción de metano

En la **Figura 4.14**, se muestra la producción del metano teórico y experimental con respecto al tiempo. Estos se calcularon a partir de las ecuaciones (3.5) y (3.6) de material y métodos. Para ambos se observan diferencias claras. En la etapa (I) la diferencia fue del 17 %, mientras que en la etapa (II) ésta disminuyó hasta un 9 %. En la etapa (III) la desigualdad entre ambas fue incrementándose considerablemente hasta alcanzar diferencias del 43%. Este último valor puede atribuirse a la inestabilidad del reactor por el efecto negativo de los lixiviados.

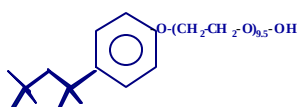
Con el propósito de aclarar los resultados, en la **Tabla 4.2** se presenta un resumen de cada etapa. En la tabla también se muestran los porcentajes de disminución en la producción de metano para la segunda y tercera etapas con respecto a la primera.

Para el metano teórico y experimental, se observan porcentajes de disminución en las etapas (II) y (III) de alrededor del 30 y 70 % respectivamente. En estas etapas posiblemente las bacterias formadoras de metano se encontraban inhibidas por la presencia de los hidrocarburos y el surfactante.

Tabla 4.2. Comparación de la producción del metano teórico y experimental.

Etapas	I	II	III	IV
CH₄ Teórico (LCH₄/L*d)	0.1919	0.1312	0.1254	0.04113
	4.84	7.8	17.2	19.2
Coeficiente de variación (%)		32	67	72.1
Disminución (%) *				
CH₄ Experimental (LCH₄/L*d)	0.1602	0.1212	0.03519	0.03013
	5.8	8.1	26.1	12.5
Coeficiente de variación (%)		25	78	81.1
Disminución (%) *				

*disminución del metano producido respecto a la etapa I.



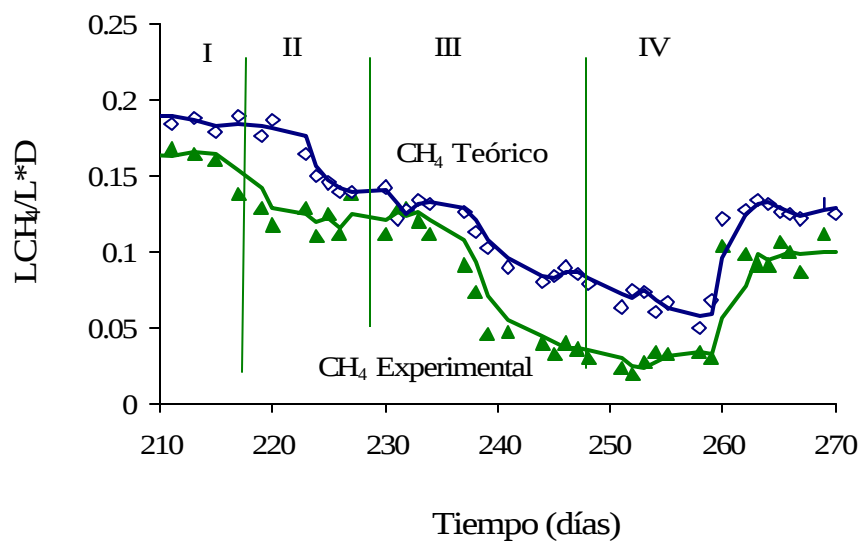


Figura 4.14. Producción del metano teórico y el experimental, con respecto al tiempo de operación del reactor.

4.2.4 Relación de alcalinidad

Para determinar el consumo de ácidos grasos volátiles, se cuantificó la relación de alcalinidad. En la **Figura 4.15** se presentan los resultados con respecto al tiempo de operación del reactor.

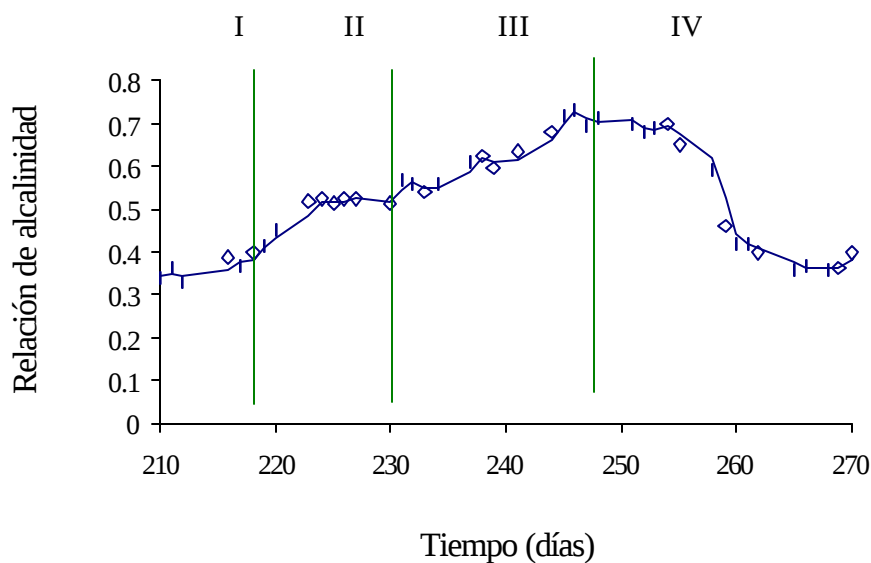
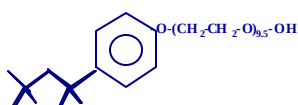


Figura 4.15 Relación de alcalinidad respecto al tiempo de operación del reactor.

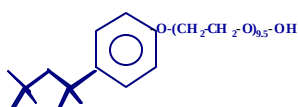


En la etapa (I) se obtuvieron valores de 0.3540 con un coeficiente de variación del 7.8 %. En esta etapa la alcalinidad se mantuvo estable, indicando que la velocidad de consumo de los ácidos grasos volátiles era mayor a la de formación manteniéndose el reactor a pH de 7.

En la etapa (II) después de 24 horas de alimentar el reactor con los lixiviados se observa una perturbación que duró alrededor de 10 días, estabilizándose posteriormente hasta alcanzar valores de 0.5605 con un coeficiente de variación de 9.8 %. En esta etapa la velocidad de consumo de los ácidos grasos volátiles disminuyó respecto a la etapa anterior, obteniendo como consecuencia una disminución del pH hasta 6. Este comportamiento indicó el inicio de la acumulación de los ácidos.

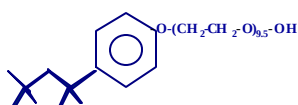
Cuando se pasó a la etapa (III), los lixiviados tuvieron un efecto negativo mayor sobre la alcalinidad. Esta variable aumento gradualmente hasta alcanzar valores de 0.72, lo que sugiere que las bacterias metanogénicas se encontraban sin actividad permitiendo la acumulación de los ácidos grasos volátiles.

La acumulación de los ácidos grasos volátiles se podría atribuir principalmente por la ausencia de mineralización de la materia orgánica durante el último paso de la digestión anaerobia. Para esta etapa de prueba con los lixiviados del lavado de suelo, probablemente en los gránulos no se presenta el fenómeno de mutualismo (interacción de las diferentes especies presentes en el consorcio que se benefician de una relación obligatoria y simbiótica que requiere de proximidad física) (Alvarez, 1996). Cuando alguna de las bacterias que intervienen en la cadena metabólica pierde su actividad por cambios en la composición del medio de alimentación, uno de los productos podría acumularse inhibiendo la actividad microbiana de otras especies del consorcio.



4.2.5 Conclusiones parciales

- I. Se observó un efecto negativo de los lixiviados en la actividad microbiana, interviniendo directamente en la última etapa de la digestión anaerobia, sin tener una evidencia clara del compuesto causante del efecto (hidrocarburos y/o surfactante).
- II. Los gránulos mostraron tener la capacidad de recuperación de la actividad metanogénica después del empleo de los lixiviados del lavado de suelo, considerándose que el efecto podría ser reversible a las concentraciones experimentadas.



4.3 Efecto inhibitorio del surfactante en la digestión anaerobia

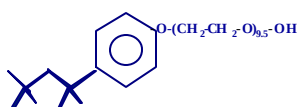
Con el propósito de evaluar el efecto de la concentración del surfactante en el consumo de un sustrato de fácil degradación y el tipo de inhibición que origina, se alimentó el reactor con lactosa y surfactante, este último a diferentes concentraciones (0, 100, 250 y 350 mg/L). Para cada concentración se trabajó con tres tiempos de retención hidráulica (0.5, 1.0 y 1.5 días), operando para esta etapa el reactor del día 270 al 389.

4.3.1 Efecto inhibidor del surfactante en la cinética de la degradación de la lactosa

En la **Figura 4.16** se presentan los resultados gráficos del balance de sustrato (lactosa) en estado estacionario en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones del Tritón X-100 y de acuerdo a la ecuación (1.4) de la introducción. Para cada recta de este figura, la pendiente corresponde a la velocidad máxima de consumo de lactosa y la ordenada al origen a la constante de afinidad.

Se observa que a medida que aumenta la concentración del surfactante, la velocidad máxima de consumo de lactosa disminuye. Con respecto a la velocidad máxima de consumo obtenida únicamente con la lactosa ($n_{m\acute{a}x}$), la disminución en los valores de velocidad de consumo a las diferentes concentraciones del surfactante ($n_{m\acute{a}x}^*$) fueron: a 100 mg/L del surfactante se tuvo una disminución del 11%, a 250 mg/L del 40 % y a 350 mg/L del 72 %. Por otra parte, la constante de afinidad (K_s) no presentó cambios en todas las concentraciones experimentadas del Tritón X-100. Este comportamiento corresponde al de un inhibidor de tipo no competitivo. (Levenspiel 1986)

Para este tipo de inhibidor la velocidad máxima de consumo de lactosa se puede expresar de acuerdo a la ecuación (1.7) de revisión bibliográfica. Linearizando esta ecuación para la concentración del inhibidor se obtiene la siguiente expresión (Levenspiel 1986; Voet y Voet, 1990):



$$\log I = \frac{1}{n} \log \left[\frac{n_{\text{máx}}}{n_{\text{máx}}^*} - 1 \right] + \log K_I \text{ ----- (4.2)}$$

En la **Figura 4.17** se presenta la relación entre las diferentes concentraciones del surfactante como inhibidor respecto a las velocidades de consumo de lactosa ($n_{\text{máx}}/n_{\text{máx}}^*$) de acuerdo a la ecuación (4.2). En esta figura se obtiene una línea recta cuya ordenada al origen es el logaritmo de la constante de inhibición (K_I). Empleando antilogaritmos, el valor de K_I es de 259 mgTritón/L. Por otra parte el inverso de la pendiente es el orden de inhibición (n) cuyo valor es de 0.4.

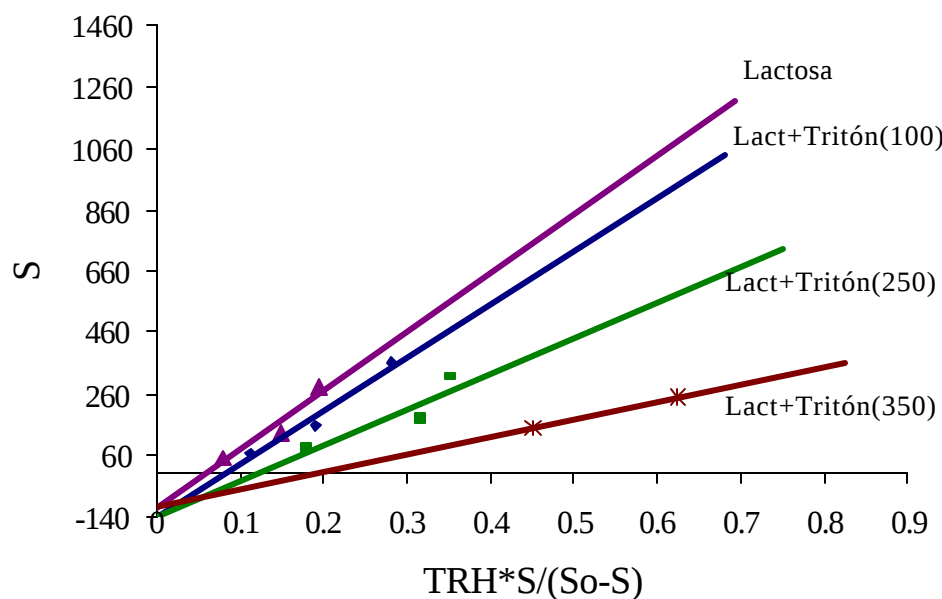
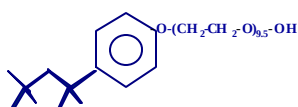


Figura 4.16 Representación esquemática del balance de masa en el reactor

La constante de inhibición puede definirse como la concentración a la cual la $n_{\text{máx}}$ disminuye un 50 % (Lehninger, 1981). Utilizando los valores de las constantes cinéticas K_I , $n_{\text{máx}}$ y n en la ecuación (1.7) de introducción se obtuvo la **Figura 4.18**. En la figura se observa que en la concentración correspondiente a la constante de inhibición, la velocidad de consumo de lactosa disminuye en un 51 %.



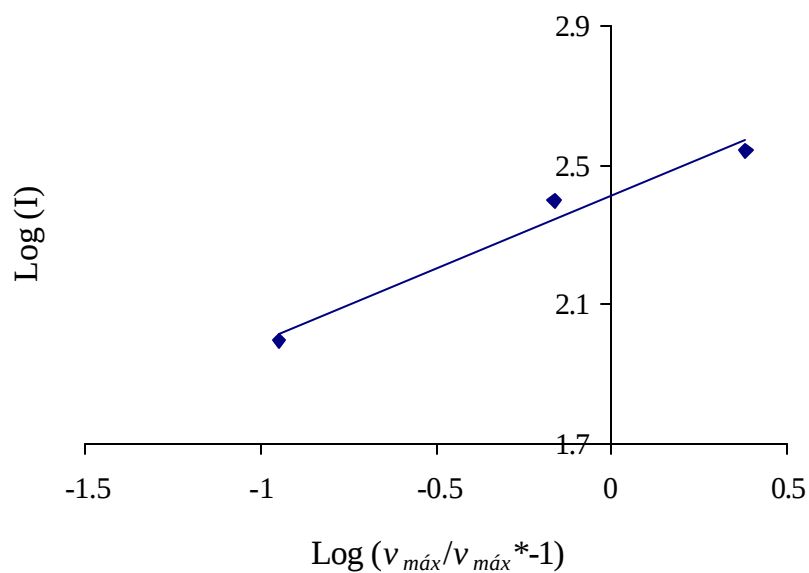


Figura 4.17 Relación de la velocidad de consumo de lactosa sin Tritón y con Tritón, con respecto a las concentraciones del surfactante.

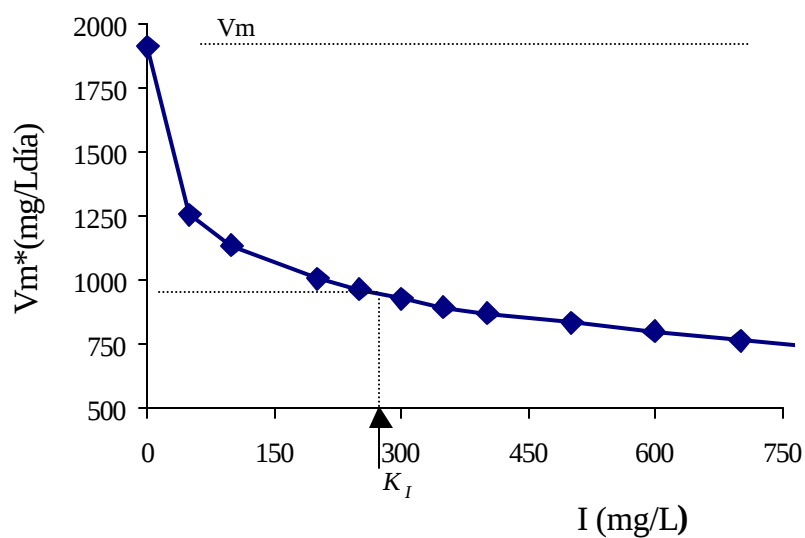
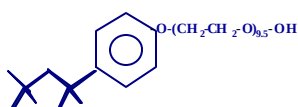
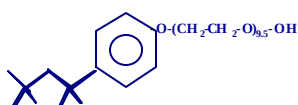
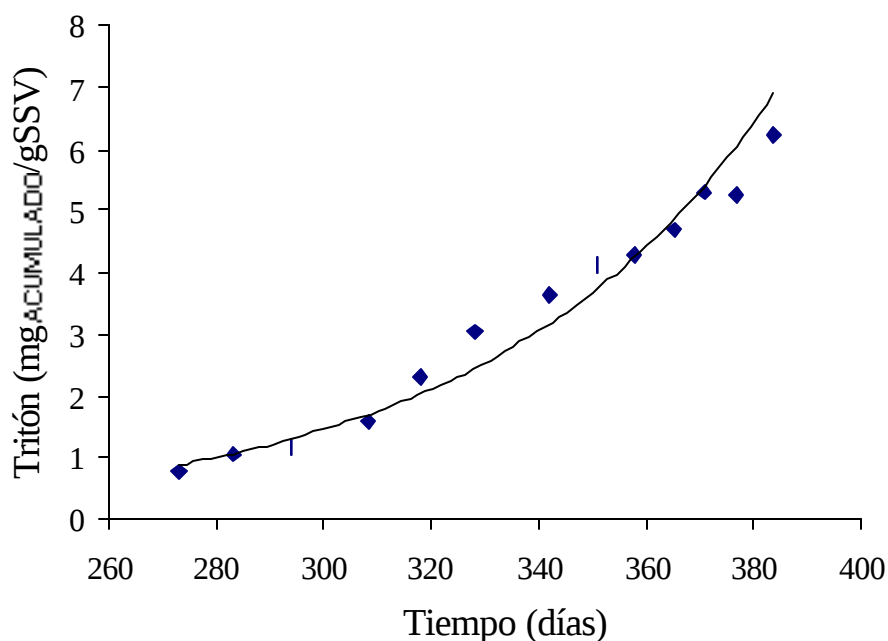


Figura 4.18. Curva de predicción obtenida para la inhibición de la velocidad máxima de consumo de lactosa ($n_{máx}$) por el Tritón X-100.

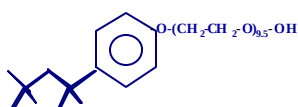




4.3.2 Actividad metanogénica en los gránulos

Con el propósito de identificar de los grupos microbianos presentes en los gránulos, sobre los cuales el surfactante tuvo un efecto negativo, se realizó una cinética por lote de la actividad metanogénica en los gránulos del reactor. En la **Figura 4.20** se muestran los resultados de producción de metano respecto al tiempo empleando diferentes substratos. Se observa que únicamente para dos grupos de microorganismos se obtuvo producción de metano. Estos grupos corresponden a: i) Las bacterias hidrogenótrofas (con H_2 y CO_2 como substrato) con una producción final de metano de 6 $mMCH_4/L$ y ii) las fermentativas (con glucosa como substrato) con una producción final de metano de 4.2 $mMCH_4/L$. Para los demás grupos (acetogénicas y acetoclastas) el CH_4 obtenido fue igual al producido por el blanco (sin substrato), indicando que estos grupos de bacterias se encuentran inhibidas por el surfactante y que el efecto sobre las mismas podría ser irreversible. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los trabajos de Sierra y Lettinga, (1991) y Fajardo *et al.*, (1997), en los que encontraron inhibición de las bacterias acetoclasticas por compuestos con estructura aromática, como el Tritón X-100.

Realizando los cálculos estequiométricos para cada substrato se encuentra que la eficiencia de recuperación de metano para las hidrogenótrofas fue del 95%, mientras que para las fermentativas fue del 20 %. La baja eficiencia de estas últimas se puede atribuir a que estas bacterias se encuentran en el inicio de la cadena metabólica de la digestión anaerobia donde su producto principal son ácidos grasos volátiles (AGV's). Al encontrarse inhibidas las bacterias acetoclastas y acetogénicas que intervienen en la transformación de los AGV's, estos se pueden acumular ocasionando cambios en el medio por la disminución del pH, deteniendo todas las reacciones para la obtención de metano.



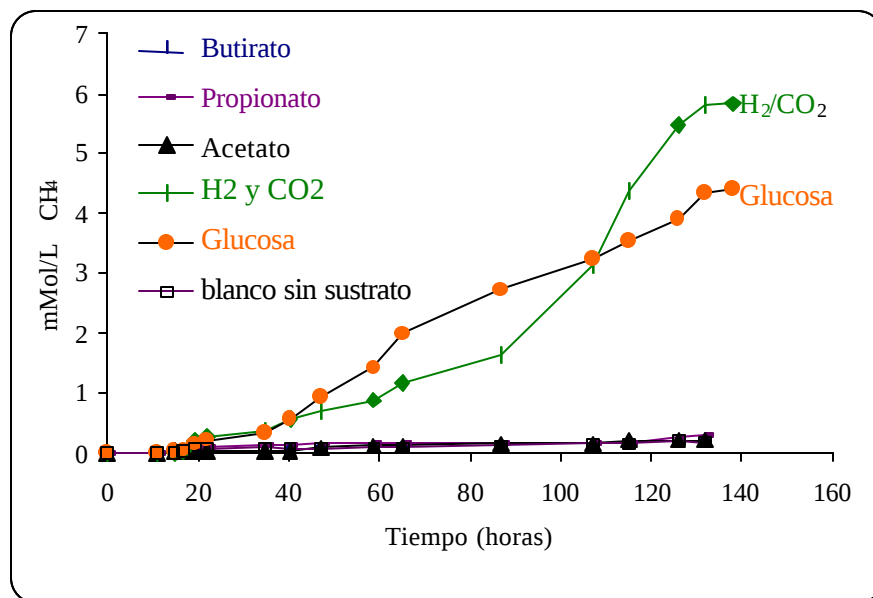
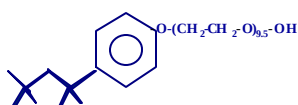


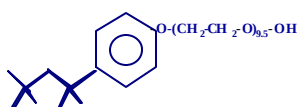
Figura 4.20. Evaluación del efecto del surfactante en la actividad metanogénica de los diferentes grupos de bacterias presentes **en los** gránulos del reactor.

En el modelo de la distribución de los microorganismos en los gránulos anaerobios propuesto por Guiot *et al.*, (1992), sugieren que las bacterias acetogénicas y acetoclastas se encuentran en el interior del gránulo. Basándose en esto y en los resultados obtenidos, es posible suponer que el surfactante es absorbido, afectando en mayor proporción a estas bacterias, mientras en la superficie del gránulo se podría dar un fenómeno de adsorción y desorción teniendo un efecto menor en las bacterias fermentativas e hidrogenotrofas.



4.3.3. Conclusiones parciales

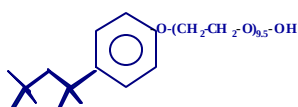
- I. Se encontró que el Surfactante Tritón X-100 actúa como un inhibidor no competitivo de la digestión anaerobia, donde la constante de inhibición (K_I) fue de 259 mg/L.
- II. En el consorcio microbiano las bacterias que no fueron afectadas por el surfactante son las fermentativas y las hidrogenotrofas y las que fueron totalmente inhibidas fueron las acetogénicas y acetoclastas, lo cual podría estar asociado con la distribución de los microorganismos en el gránulo.



CONCLUSIONES GENERALES

5. CONCLUSIONES GENERALES

- I. La adaptación de los gránulos anaerobios al surfactante Tritón X-100 a 100 mg/L, requirió de más de 20 días de operación en el reactor, comprobando que el Tritón X-100 es un compuesto agresivo para la digestión anaerobia.
- II. Empleando 100 mg/L del Tritón X-100 en el influente se encontró una sorción del surfactante en los gránulos de 0.6303 mgSurfact/gSSV, que se mantiene constante en todas las muestras analizadas.
- III. Se encontró un 82 % de desaparición del surfactante, a una concentración en el influente de 100 mg/L sin obtener evidencia de su mineralización.
- IV. Se observó que los lixiviados del lavado del suelo tuvieron un efecto negativo en la actividad microbiana que intervienen en la digestión anaerobia, sin tener evidencia del compuesto causante del efecto (hidrocarburos y/o surfactante).
- V. Los gránulos mostraron tener la capacidad de recuperación de la actividad metanogénica después del empleo de los lixiviados del lavado de suelo contaminado con hidrocarburos, considerándose que el efecto podría ser reversible a las concentraciones experimentadas de lixiviados.
- VI. Se encontró que el Surfactante Tritón X-100, actúa como un inhibidor no competitivo de la digestión anaerobia, la constante de inhibición calculada fue de 259 mg/L.



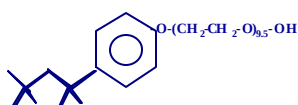
VII. En el consorcio microbiano las bacterias que no fueron afectadas por el surfactante son las fermentativas y las hidrogenótrofas y las que fueron totalmente inhibidas fueron las acetogénicas y acetoclastas.

SUGERENCIAS

Para la adaptación de los microorganismos, se debe tomar en cuenta la concentración del surfactante, así como un tiempo de exposición lo suficientemente largo como para que los microorganismos puedan sintetizar enzimas capaces de biodegradar estos compuestos y conocer la estructura del surfactante.

El Tritón X-100 es un compuesto que tiene un efecto inhibitorio en la digestión anaerobia a bajas concentraciones, siendo necesario el empleo de un cosustrato para mantener una población microbiana. Sin embargo se requiere el empleo de un compuesto que ayude por medio del cometabolismo en la degradación del surfactante.

Para un mejor entendimiento del efecto inhibitorio del surfactante es necesario el estudio de las interacciones que se podrían dar entre los gránulos anaerobios y el Tritón X-100.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referencias Bibliográficas

Abdul, A. S., Gibson, T. L., Rai, D. N (1990). Selection of surfactants for the removal of automatic transmission fluid from sandy materials. *J. Ground Water*, **28**: 920-926.

Ahel M., Giger W., Schaffner C. (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment- II occurrence and transformation in rivers. *Wat. Res.* **28**: 1143-1152.

Alberts B., Bray D., Lewis J. (1990). Biología molecular de la célula. La membrana plasmática. Ediciones Omega S.A., Barcelona.

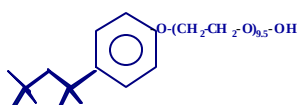
Alvarez P. J. (1996). Memorias del curso de Bioremediación, avances recientes en el tratamiento biológico de residuos peligrosos *□in situ□*. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Azcapotzalco.

APHA (1995). Standard Methods for the Examination Water and Wastewater, 16th. American Public Health Association, Washington, DC, 19th Edition. USA.

Aranstein, B. N., Calvillo Y. M., Alexander. M. (1991). Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Env. Sci. Technol.* **25**: 1728-1732.

Attwood D., Florence A. T. (1983). Surfactant systems. Their chemistry, pharmacy and biology. Editorial Chapman and Hall. New York.

Balch W. E., Fox G. F., Magrum L. J., Wolfe R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microb. Rev.* **3**: 260-296.



Bhatti Z. I., Furakawa K., Fujita M. (1995). Methanogenic granular sludge formation in an upflow anaerobic sludge blanket reactor treating synthetic methanolic waste. *W. J. Microb. Biohecnol.* **11**: 631-637.

Bonet R., Simon M. D., Congregado F. (1993). Effects of nutrients on exopolysaccharide production and surface properties of *Aeromonas salmonicida*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **59**: 2437-2441.

Brock T., D. Smith D., W., Madigan M. T (1987). Microbiología. Cuarta edición., Editorial Prentice-Hall hispanoamericana. Capítulo 18.

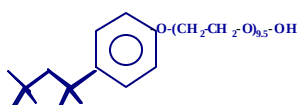
Buswell A. M., Mueller H. F. (1952). *Mechanism of methane fermentation*. *Eng. Chem.* **11**: 550-554

Creagh A. L., Prausnitz J. M., Blanch H.W. (1993). The effect of aqueous surfactant solutions on alcohol dehydrogenase. *Biotechnol. and Bioeng.* **41**: 156-161.

Debye P.; Anacker, E.W. (1951). Micellization and microemulsions. *J. Phys. Colloid Chem.* **55**: 644-652.

Edwards D. A., Luthy R.G., Liu Z. (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactants solutions. *Env. Sci. Technol.* **25**: 127-133.

Edwards D. A., Luthy R.G., Adeel. Z. (1994). Experimental data and modeling for surfactants micelles, HOCs, and soil. *J. Environ Eng.* **28**: 1550-1559.



Fajardo C., Guyot J. P., Macarie H., Monroy O. (1997). Inhibition of anaerobic digestion by terephthalic acid and its aromatic by products. *Wat. Sci. Technol.* **36**: 83-90.

Fang H.H. P., Chui H. K., Li Y.Y. (1995). Microestructural analysis of UASB granules treating brewery wastewater. *Wat. Sci. Technol.* **31**:129-135.

Federle T. W., Schwab B. S. (1992). Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of a laundromat wastewater pond. *Wat. Res.* **26**: 123-127.

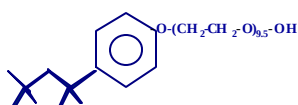
Guha S., Jaffé P. R. (1996). Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 1383-1391.

Guiot S.R., Pass A., Costerton J. W.,(1992). A structured model of the anaerobic granule consortium. *Wat. Sci. Technol.*, **25**: 1-10.

Harkins, W.D (1948). Colloidal surfactants. *J. Phys. Chem.* Vol. 16, No 156.

Jian C., Shi-yi L. (1993). Study on mechanism of anaerobic sludge granulation in UASB reactors. *Wat. Sci. Tech.* **7**: 171-178.

Kale K., Kresheck G. C., Erman J. (1982). Polymersurfactants interactions by surfactant selective electrodes. Eds. Fendle E. J., Mittal K. L. Plenum Press, New York. Chapter 3.



Kile D. E., Chiou C. T. (1990). Effects of some petroleum surfactants on the apparent water solubility of organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* **24**: 205-212

Laha S., Luthy. R. G. (1992). Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol. and Bioeng.* **40**: 1367-1380.

Larson R. J., Games L. M. (1981). Biodegradation of linear alcohol ethoxylates in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **15**: 1488-1493.

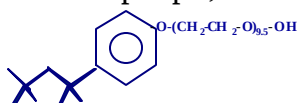
Lehninger A. L. (1981). Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición; ediciones omega. Capítulo 8

Lettinga G., Van Velsen A.F.M., Hobman S. W., Zeeuw W., Klapwijk A. (1980). Use of upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 699-734.

Levenspiel O. (1986). El omnilibro de los reactores químicos. Editorial Reverté S.A. Cap.81.

McBain, J.W. (1913). Interfacial phenomena. Trans. Faraday Soc. Vol. 9, No. 99.

Medina S. A. (1999). Lavado y bioremediación ex-situ de un suelo intemperizado con hidrocarburos. Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa., México.



Moroi Y. (1992). *Micelles: Theoretical and Applied Aspect*. Plenum Press, New York. Capitulo 2.

Panchenko L. V., Turkovskaya O. V. (1996). Degradation of oxyethylated alkylphenols by a strain of *Pseudomonas putida*. *Appl. Biochem. Microb.* 32: 566-571.

Pirt S.J. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications Osney Mead. Oxford London. Chapter 5.

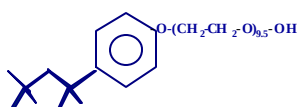
Pletnev M. Y., Trapeznikov A. A. (1978). The binding of sodium dodecyl sulfate to various proteins. *Biochem J.* 835-830.

Prats D., Ruiz, F., Vázquez B. (1997). Removal of anionic and nonionic surfactants in a wastewater treatment plant with anaerobic digestion a comparative study. *Wat. Res.* 31: 1925-1930.

Razo F. E., Rodríguez R. G., Rivera R. R., Bremauntz M. M. (1993). Algunos aspectos acerca del proceso de digestión anaerobia. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 35: 469-475.

Rivera R. R., Rodríguez R. G., Razo F. E., Bremauntz M. M. (1993). Algunos aspectos acerca del proceso de digestión anaerobia parte I: Microbiología. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 35:451-458.

Schmidt J. E., Ahring B. K. (1994). Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 42: 457-462.



Sierra A., Lettinga G. (1991). The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granule sludge. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **34**: 544-550.

Swisher R. D. (1987). Surfactant biodegradation, Second Edition, revised and expanded. Marcel Dekker, inc. Chapter 1 y 17.

Tiehm A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ Microbiol.* 258-263.

Toeriln D. F., Hattingh W.H.J. (1969). *Review paper. Anaerobic digestion: 1.- The microbiology of anaerobic digestion.* *Wat. Res.* **3**: 385-410.

Volkering F., Breure A. M., Andel J. G., Rulkens W. H. (1995). Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microb.* **61**: 1769-1775.

Voet D., Voet J. G. (1990). *Bioquímica*, Ediciones Omega. Capitulo 13.

Zoller U. (1994). Non-ionic surfactants in reused water: activated sludge/soil aquifer treatments sufficient. *Wat. Res.* **28**: 1625-1629.

