

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**“ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LOS PROCESOS DE
DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR LA ACCIÓN DE CONSORCIOS
MICROBIANOS IN VITRO”**

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

Br. Linda Lucia Fitoria Alvarado

Br. Carlos José Quiroz Vargas

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

Ingeniero Químico

TUTOR:

M.Sc. Sergio Enrique Álvarez

Managua, Nicaragua

Diciembre, 2021

Opinión del tutor

Este Trabajo de Diploma presenta los resultados del “Estudio del comportamiento cinético de los procesos de degradación de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos in vitro” desarrollada en el contexto de la Convocatoria de Fondos para Investigación 2020 de la Universidad Nacional de Ingeniería, cumpliendo con lo programada en la segunda etapa de este proyecto de investigación.

En el desarrollo de este trabajo, los bachilleres Carlos José Quiroz Vargas y Linda Lucia Fitoria Alvarado han participado activamente en sus diferentes etapas, obteniendo de sus resultados, la información fundamental para la elaboración de la presente tesis, para optar al Título de Ingeniero Químico.

Con esta experiencia, los graduandos, han desarrollado y consolidados los conocimientos teóricos y prácticos, así como, las técnicas y procedimientos metodológicos de la investigación científica en el área de biotecnología ambiental conjugándola con la utilización de los conocimientos teóricos y prácticos de diferentes disciplinas del área de las ciencias aplicadas e ingenierías, así como de los conocimientos adquiridos en el transcurso de los estudios en la carrera de Ingeniería Química, lo cual hace de esta tesis, un trabajo singular e innovador, de actualidad y de aportes significativos en la contribución de soluciones a la apremiante problemática de carácter técnico-económica, ambiental y de salud pública, generada por la contaminación de los compartimientos ambientales y afectación al equilibrio de los ecosistemas del país, por derrames y vertidos de hidrocarburos, que en la actualidad representan pasivos ambientales.

Se propone el uso de consorcios microbianos obtenidos de los mismos suelos contaminados, los cuales, están adaptados al consumo de hidrocarburos, lo que favorece su potencial de degradación ante estas sustancias contaminantes. Se realiza el estudio del comportamiento cinético de estos consorcios y la determinación del potencial de biodegradación de hidrocarburos en condiciones de laboratorio.

Los graduandos ha hecho uso de sus conocimientos teóricos y prácticos del área de cinética de los procesos biológicos y del diseño de experimentos y así como de sus competencias, habilidades y destrezas para ajustar modelos cinéticos a los procesos de degradación aplicando de manera innovativa los Métodos de Gauss-Newton para determinar los parámetros que caracterizan los procesos cinéticos biológicos del procesos de biodegradación, demostrando que han afianzado sus competencias profesionales relacionadas con la elaboración y propuestas de soluciones técnicas que contribuyen al desarrollo sostenible del país desde un enfoque de compromiso ético-social con el medio ambiente y la sociedad nicaragüense.

Este Trabajo de Diploma, reúne los requisitos suficientes para ser sometida ante el correspondiente Tribunal Examinador, a quienes se les solicita valorar la significativa contribución científico-técnico de los autores de este trabajo, en la solución de la problemática ambiental del país, en el sector de suelos contaminados.

M.Sc. Ing. Sergio Enrique Álvarez García.
Tutor del Trabajo de Diploma.
Managua, 27 de octubre del 2021

Agradecimientos

Le agradezco primeramente a Dios por haberme permitido llegar hasta aquí, por haberme guiado a lo largo de mi vida y por darme la motivación necesaria para seguir y poder culminar este trabajo.

A mi familia por ser la base fundamental de mis logros y por el apoyo incondicional que me brindaron para el cumplimiento de esta gran meta.

A nuestro tutor Sergio Álvarez por el apoyo, colaboración y perseverancia con nosotros en la realización de este trabajo.

A mis amigos de los cuales he aprendido muchísimo a lo largo de este camino y por el apoyo, ayuda y amistad que me han brindado.

A los maestros y a todos los que de alguna manera aportaron en mi formación profesional.

Br. Linda Fitoria

Quiero agradecer a todas aquellas personas que me han apoyado a lo largo de mi vida, es por ustedes que he logrado llegar hasta aquí y espero poder seguir contando siempre con vuestro apoyo.

Br. Carlos Quiroz

Dedicatoria

En primer lugar, le dedico este trabajo a mi familia, en especial a mi madre, Karen Alvarado, y hermano, Camilo Fitoria, quienes con mucho esfuerzo y sacrificio me han apoyado en cada etapa de mi vida, quienes han luchado junto a mí para poder llegar a esta meta y por haberme educado de la manera que lo hicieron.

A mi compañero Carlos Quiroz por haberme ayudado a lograr esta meta y su apoyo durante todo este camino.

A mi tutor Sergio Álvarez por confiar en mí y por su apoyo incondicional tanto a lo largo de mi formación académica como en la realización de este trabajo.

A mis amigos, profesores y a todas aquellas personas la que me ofrecieron su ayuda, me dieron ánimos y aliento durante esta etapa.

Br. Linda Fitoria

Quiero dedicar este trabajo a mis familiares que me apoyaron durante todo el transcurso de la carrera.

A los profesores de la facultad que siempre estaban dispuestos a resolver las diferentes inquietudes que iban surgiendo a lo largo de la carrera.

A nuestro tutor por habernos dado la oportunidad de trabajar este tema tan interesante y haber tenido la paciencia para guiarnos y apoyarnos a lo largo de todo este arduo proceso.

Y en especial a mi compañera de tesis y amiga Linda Fitoria por haberme apoyado durante todo este tiempo, tanto a nivel académico como a nivel personal.

Br. Carlos Quiroz

Resumen

El presente estudio del comportamiento cinético de los procesos de degradación de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos tiene como propósito fundamental desarrollar métodos, procedimientos y técnicas aplicadas a los procesos de remediación de suelos contaminados usando el potencial de degradación que poseen los microorganismos nativos de los diversos compartimientos ambientales actuando como un consorcio natural.

Así mismo se estudian los parámetros que pueden influir en el proceso de degradación de hidrocarburos en suspensión acuosa los cuales son: la influencia del tipo de consorcio microbiano, la concentración de la sustancia contaminante y la temperatura en que ocurre la degradación de los hidrocarburos en condiciones controladas a nivel de laboratorio in vitro. En este estudio, simplemente se tomó en cuenta el cambio que generó la concentración inicial del sustrato, ya que, para los otros parámetros, los microorganismos se inhiben o mueren.

Por lo tanto, los experimentos se realizaron a una temperatura de 30°C y concentraciones iniciales del 1 y 3 % (v/v) del sustrato, dando como resultado que a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel, el proceso es más eficiente que a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel. Por otro lado, los modelos cinéticos del proceso de degradación de hidrocarburos in vitro, nos permitió pronosticar la eficiencia del proceso, la duración del tratamiento, las concentraciones en función del tiempo de reacción, tanto de la biomasa microbiana como de hidrocarburos.

Al emplear estos modelos en ambos estudios ($C_0=1$ y 3 % v/v de diésel), con el método de Gauss-Newton, los resultados mostraron que la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) disminuye significativamente en los modelos de Teisser y Moser a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel. De igual manera, estos resultados obtenidos indican que en un periodo aproximado de 50 horas se obtiene una remoción del diésel superior al 90% mientras en un periodo de 90 horas se obtuvo una remoción superior del 95% a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel, por lo cual la eficiencia de remoción obtenida es muy alta.

En cambio, a una concentración del 3% (v/v) de diésel, la eficiencia de remoción es menor, en un tiempo de finalización de 90 horas, esta eficiencia alcanza el 93%, por lo cual indica que el proceso es eficiente. Estos resultados muestran que los procesos de degradación de diésel se pueden ajustar a un comportamiento exponencial, dando resultados de ajuste eficiente para los modelos planteados.

Tabla de contenido

Opinión del tutor.....	i
Agradecimientos	iii
Dedicatoria.....	iv
Resumen	v
Nomenclatura.....	xi
Abreviaturas.....	xiii
I. Introducción	1
II. Objetivos.....	3
2.1. General.....	3
2.2. Específicos	3
III. Marco de referencia	4
3.1. El petróleo y sus hidrocarburos	4
3.1.1. Diésel	5
3.1.2. Consumo de diésel en Nicaragua	6
3.2. Biorremediación.....	6
3.2.1. Tipos de biorremediación	8
3.2.2. Influencia de los factores sobre la biodegradación de hidrocarburos	11
3.2.3. Ventajas y desventajas de la tecnología de biorremediación ...	17
3.3. El rol de los microorganismos en la biorremediación y la necesidad de formar consorcios microbianos para potenciar su acción de biodegradación de hidrocarburos.....	18
3.4. Comportamiento cinético de los microorganismos.....	19
3.4.1. Crecimiento bacteriano.....	19
3.4.2. Adaptabilidad y variabilidad de respuestas microbianas	20
3.4.3. Modelos cinéticos.....	23
3.4.4. Métodos matemáticos para la obtención de los parámetros de los modelos cinéticos de los procesos de biorremediación	27
3.5. Elementos del diseño de experimentos.....	31
3.5.1. Diseños factoriales.....	31
IV. Metodología.....	33
4.1. Métodos y procedimiento para la determinación del comportamiento cinético del consorcio microbiano durante su crecimiento utilizando diésel como única fuente de energía y carbono	33

4.1.1. Determinación de la concentración de biomasa	34
4.1.2. Determinación de la concentración de hidrocarburos	34
4.2. Métodos y procedimientos para el establecimiento de la influencia de los parámetros operacionales: Tipo de consorcio, concentración del sustrato y la temperatura	35
4.3. Métodos y procedimientos aplicados para la definición de modelos cinéticos que describen el proceso de degradación de hidrocarburos en suspensión acuosa.....	35
4.4. Determinación de la eficiencia de degradación de hidrocarburos en suspensión acuosa por el consorcio microbiano aplicado	38
V. Hipótesis.....	39
VI. Análisis y discusión de los resultados	40
6.1. Comportamiento cinético del consorcio microbiano durante su crecimiento utilizando diésel como única fuente de energía y carbono	40
6.1.1. Medida de la concentración de biomasa	40
6.1.2. Medida de la concentración de TPH	41
6.2. Influencia del tipo de consorcio, la concentración del sustrato y la temperatura en el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro	42
6.2.1. Influencia del tipo de consorcio	42
6.2.2. Influencia de la temperatura	43
6.2.3. Influencia de la concentración de sustrato	44
6.3. Modelo cinético que describe el proceso de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa	47
6.4. Eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa	61
VII. Conclusiones	64
VIII. Recomendaciones	66
IX. Bibliografía	67
Anexos.....	75

Índice de tablas

Tabla 3.1: Clasificación de modelos cinéticos	24
Tabla 4.1: Relación entre DO y SV para determinación de la concentración de biomasa, $g_{células}/L$	34
Tabla 6.1: Método de Gauss-Newton para el modelo de Monod, Teisser y Moser a una concentración inicial del 1% y 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.....	52
Tabla 6.2: Coeficientes de ajustes para una concentración inicial del 1 y 3% (v/v) de diésel para los diferentes modelos propuestos a temperatura de 30°C.....	54
Tabla 6.3: Método de Runge-Kutta 4 para el modelo de Monod, Teisser y Moser a una concentración inicial del 1% y 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.....	57

Índice de figuras

Figura 3.1: Curva general de crecimiento microbiano (Tortora et al., 2007).....	19
Figura 6.1: Recta de calibrado que relaciona la DO con la concentración de biomasa presente en el cultivo.....	41
Figura 6.2: Curva de crecimiento para cada uno de los consorcios en estudio..	41
Figura 6.3: Valores experimentales de la concentración de biomasa e hidrocarburos con el tiempo a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel.	45
Figura 6.4: Valores experimentales de la concentración de biomasa e hidrocarburos con el tiempo a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel.	45
Figura 6.5: Valores experimentales corregidos de la concentración de biomasa e hidrocarburos con el tiempo a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel.	46
Figura 6.6: Valores experimentales corregidos de la concentración de biomasa e hidrocarburos con el tiempo a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel.	47
Figura 6.7: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Monod a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	49
Figura 6.8: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Teisser a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	50
Figura 6.9: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Moser a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	50
Figura 6.10: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Monod a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	51
Figura 6.11: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Teisser a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	51
Figura 6.12: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Moser a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	52
Figura 6.13: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Monod en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	54
Figura 6.14: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Teisser en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	55

Figura 6.15: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Moser en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	55
Figura 6.16: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Monod en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	56
Figura 6.17: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Teisser en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	56
Figura 6.18: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Moser en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	57
Figura 6.19: Relación de los 3 modelos propuesto a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	58
Figura 6.20: Relación de los 3 modelos propuesto a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	59
Figura 6.21: Eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa por el consorcio microbiano aplicado a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	61
Figura 6.22: Eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa por el consorcio microbiano aplicado a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	62
Figura 6.23: Velocidad de remoción en suspensión acuosa por el consorcio aplicado a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	63
Figura 6.24: Velocidad de remoción en suspensión acuosa por el consorcio aplicado a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.	63

Nomenclatura

dX/dt	Velocidad de crecimiento de la célula (g/L*h)
μ_{max}	Velocidad máxima de crecimiento (1/h)
K_S	Parámetro que representa la concentración de sustrato a la mitad de su velocidad máxima (g/L)
X	Concentración de biomasa ($g_{células}/L$)
C	Concentración de diésel (g_{TPH}/L)
K_d	Constante cinética de muerte celular (1/h)
q_p	Constante cinética de formación de producto (1/h)
m_S	Constante cinética de mantenimiento celular ($g_{TPH}/g_{células}h$)
$Y_{X/S}$	Rendimiento en masa celular de sustrato ($g_{células}/g_{TPH}$)
$Y_{P/S}$	Rendimiento en producto de un sustrato ($g_{producto}/g_{TPH}$)
μ	Constante cinética de crecimiento (1/h)
$X_{exp,i}$	Valores experimentales de concentración de biomasa medidas a tiempo t_i
$C_{exp,i}$	Valores experimentales de concentración de sustrato medidas a tiempo t_i
$X_i(p)$	Valores de concentración de biomasa calculados por el modelo, correspondientes a la medición i
$C_i(p)$	Valores de concentración de sustrato calculados por el modelo, correspondientes a la medición i
$CTPH_0$	Concentración de los hidrocarburos totales al inicio del ensayo
$CTPH_f$	Concentración de hidrocarburos totales al establecerse el estado estacionario del proceso de biodegradación
C_0	Concentración inicial de diésel

X_0	Concentración inicial de biomasa
$C_{12}H_{23}$	Diésel común
CO_2	Dióxido de carbono
CO	Monóxido de carbono
NO_x	Óxido de nitrógeno
H_2O	Agua
O_2	Oxígeno
NO_3	Nitratos
SO_4^{2-}	Sulfatos
Mn^{4+}	Manganeso
Fe^{3+}	Hierro
C	Carbono
N	Nitrógeno
P	Fósforo
$MgSO_4$	Sulfato de Magnesio
$CaCl_2$	Cloruro de Calcio
KH_2PO_4	Fosfato Monopotásico
$(NH_4)_2HPO_4$	Fosfato Diamónico
KNO_3	Nitrato de Potasio
$FeCl_3$	Cloruro de Hierro (III)
R^2	Medida de exactitud del ajuste

Abreviaturas

PM	Material particulado
HC	Hidrocarburos
COV	Compuestos orgánicos volátiles
SICA	Sistema de la Integración Centroamericana
HiC	Hidrocarburolíticos
PAHs	Hidrocarburos poliaromáticos
DOE	Diseño de experimento
ANOVA	Análisis de varianza
DO	Densidad óptica
SV	Sólidos volátiles
BHB	Caldo Bushnell-Haas
TPH	Hidrocarburos totales de petróleo

I. Introducción

Entre los hidrocarburos de mayor demanda en Nicaragua se encuentra el diésel, el cual es una mezcla compleja de alcanos y compuestos aromáticos, los cuales en contacto directo con el suelo son una amenaza latente para los distintos compartimientos ambientales, que afectan la flora, la fauna y la población en todo el país, es por ello que se valora utilizar tecnologías para la mitigación de los efectos producidos. La biorremediación, ofrece métodos, procedimientos y componentes amigables con el ambiente.

Hoy en día los procesos de biorremediación se han establecido tanto para tratamiento de suelo y aguas subterráneas contaminados in situ como ex situ. Se ha demostrado en las diferentes experiencias que cuando se adapta correctamente a las condiciones del medio a intervenir, la biorremediación puede ofrecer disminuciones significativas de costes y beneficios ambientales en comparación con tecnologías alternativas.

En Nicaragua, estos métodos se implementan desde el año 2005, por diversas empresas comerciales, de manera poco efectiva. En muchos casos se emplean distintas sustancias que aceleran el proceso de biorremediación, para la aumentación de la población microbiana y activación de su potencial de degradación ante las sustancias contaminantes, pero no se obtiene el efecto esperado, resultando con mayor eficiencia de remoción los procesos de atenuación natural, que solamente incrementan los costos económicos y requiere mayor tiempo de exposición a la contaminación, lo que ocasiona daños de mayor gravedad a los ecosistemas afectados.

Esto sucede, porque no se aprovecha todo el potencial de degradación que poseen los microorganismos nativos de los diversos compartimientos ambientales actuando como un consorcio natural, principalmente por desconocimiento del comportamiento de estos microorganismos y la influencia de otros factores que ejercen sobre el proceso de biorremediación, tales como el mismo medio contaminado, la sustancia contaminante y los factores operacionales que lo gobiernan (Álvarez, 2020).

A nivel nacional no cuenta con un estudio de cinética para los procesos de degradación de hidrocarburos, por lo tanto, se pretende estudiar esta temática con ayuda a investigaciones realizadas internacionalmente la cual sirve de orientación y sustento para el desarrollo de esta. A nivel internacional se han realizado distintos estudios sobre el desarrollo de modelos matemáticos para describir los comportamientos de los microorganismos en la degradación de hidrocarburos.

Entre los cuales resaltan dos estudios realizados, uno elaborado por (Wayens, 2004) sobre el potencial de degradación de cepas de *Acinetobacter* y *Pseudomonas* en nueve hidrocarburos puros y diésel en medio acuoso, en el cual se llegó a la conclusión que las cepas de *Acinetobacter* eran capaces de degradar el diésel y algunos componentes puros, y el otro estudio elaborado por (Martin, 1999) donde determinó diferentes tipos de modelos para la descripción del

sistema, teniendo en cuenta la influencia de dos variables: temperatura y concentración inicial de oxígeno.

En la presente investigación, se realizó el estudio del comportamiento cinético de los procesos de biodegradación de hidrocarburos in vitro, determinando la influencia que ejercen el tipo de consorcio microbiano ensayado, la temperatura y la concentración inicial del sustrato en el desarrollo de la reacción bioquímica, los cuales se han establecido como los parámetros que mayor influencia ejerce en las variables respuestas del proceso como son la concentración de biomasa y la concentración de hidrocarburos.

Con la implementación de esta investigación se estudió uno de los principales problemas en el tratamiento de suelos contaminados por hidrocarburos e incluso por cualquier sustancia contaminante, este consistió en identificar plenamente los factores que gobiernan este proceso y el rango de sus valores en los que se obtienen resultados óptimos, así como la velocidad con que ocurren las reacciones bioquímicas de degradación de estos contaminantes y la duración de este tratamiento en condiciones optimizadas.

Cabe señalar, que las mediciones de las concentraciones de hidrocarburos, permitieron establecer el nivel de degradación de los hidrocarburos por la acción del consorcio microbiano, determinando así la eficiencia total del proceso de biorremediación del suelo contaminado. Por otro lado, se utilizaron modelos cinéticos no estructurados-no segregados que consideran al microorganismo como un único componente que, de forma genérica, denominan biomasa.

Es necesario señalar que esta investigación forma parte del proyecto de investigación **“Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos empleando consorcios de microorganismos nativos”**, desarrollado en el marco de la convocatoria de promoción de la investigación 2020, en la UNI, a cargo del M.Sc. Sergio Enrique Álvarez García. Los resultados prácticos de esta investigación, servirán de fundamentos teóricos y prácticos para el desarrollo de las siguientes etapas del referido proyecto de investigación.

II. Objetivos

2.1. General

- Desarrollar un estudio del comportamiento cinético de los procesos de degradación de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos in vitro.

2.2. Específicos

1. Determinar el comportamiento cinético del consorcio microbiano durante su crecimiento utilizando diésel como única fuente de energía y carbono.
2. Establecer la influencia del tipo de consorcio, la concentración del sustrato y la temperatura en el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro.
3. Definir un modelo cinético que describa el proceso de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa.
4. Calcular la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa por el consorcio microbiano aplicado.

III. Marco de referencia

La industria petrolera es una fuente importante de contaminación del suelo, las actividades de perforación, extracción, conducción y transformación del petróleo en zonas petroleras han originado la contaminación del suelo y el agua ocasionada por derrames, fugas, filtraciones, lodos y recortes de perforación desde hace más de 40 años. La presencia de estos contaminantes, ha dado lugar a la pérdida de la fertilidad del suelo, bajo rendimiento de cosechas, y posibles consecuencias perjudiciales para los seres humanos y el ecosistema entero.

3.1. El petróleo y sus hidrocarburos

El petróleo es un combustible natural compuesto de varios tipos de hidrocarburos, es decir, de moléculas que contienen básicamente, carbono e hidrógeno. Estas moléculas pueden estar formadas de cadenas de átomos de carbono largas o cortas y que pueden adoptar diferentes estructuras. Los hidrocarburos del petróleo pueden dividirse en cuatro categorías de compuestos: los saturados, los aromáticos, las resinas y los asfaltenos.

En términos generales, de un 70 a un 97% de los hidrocarburos del petróleo es degradable (la fracción de hidrocarburos saturados y aromáticos) y el resto representa los asfaltenos y las resinas esencialmente inertes (Prince, R; Varadaraj, R; Fiocco, R; Lessard, R., 1999). Cada una de las categorías agrupa compuestos con características de solubilidad, volatilidad y toxicidad propias. Desde un punto de vista de biodegradabilidad, los hidrocarburos pueden ordenarse de mayor a menor biodegradabilidad en: alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos ligeros > alcanos cíclicos > aromáticos pesados > compuestos polares (Olson, Mills, Herbert, & Morris, 1999).

El petróleo y sus derivados constituyen una importante fuente de contaminación. Se estima que de 0.08% a 0.46% (más de tres millones de toneladas) de la producción total del petróleo termina formando parte, bajo diversas formas, de la contaminación ambiental (Jacobucci, Vasconcelos, A., & Falconi, 2000). El petróleo contamina el ambiente en las diferentes etapas de su explotación, extracción, transporte y refinado. Existen dos tipos de contaminación: la involuntaria, que ocurre por defectos mecánicos, la corrosión de las tuberías y las fugas durante las etapas de transferencia y la voluntaria, que se da con las prácticas de incineración y los vertidos en suelo y agua (Stelmack, Gray, & Pickard, 1999).

La contaminación del suelo existe principalmente concentrada en los alrededores de las refinadoras, pozos de petróleo, depósitos de petróleo, aeropuertos, bases militares y estaciones gasolineras (Jacobucci, Vasconcelos, A., & Falconi, 2000). La contaminación del suelo con hidrocarburos impide la utilización de este para actividades como la agricultura y la urbanización y adicionalmente pone en riesgo las napas freáticas que en algunos países constituyen la fuente principal de agua potable. He aquí la importancia primordial de remediar estos suelos (Hanson K. , Anuranjini, Madhavi, & Anjana, 1997).

Los hidrocarburos presentan la particularidad de adsorberse rápida y fuertemente a las partículas del suelo. La biorremediación utiliza esta particularidad, ya que permite reducir o remover los residuos potencialmente peligrosos presentes en el ambiente y, por lo tanto, se puede utilizar para limpiar terrenos o aguas contaminadas, dado que su ámbito de aplicabilidad es muy amplio, pudiendo considerarse como objeto de remediación cada uno de los estados de la materia, es decir, sólido (suelos o sedimentos), o bien directamente en lodos, residuos, entre otros.

3.1.1. Diésel

Se obtiene de la destilación del petróleo entre los 200 y 380 °C. Es un líquido denso, que tiene su origen en los gasóleos, y antiguamente era considerado parte de los desperdicios de las refinerías. El diésel es un combustible no renovable que se utiliza para la generación de electricidad, transporte y calefacción.

El diésel o gasóleo derivado del petróleo está compuesto aproximadamente de un 75% de hidrocarburos saturados (principalmente parafinas incluyendo isoparafinas y cicloparafinas) y un 25% de hidrocarburos aromáticos (incluyendo naftalenos y alcalobencenos). La fórmula química general del diésel común es $C_{12}H_{23}$, incluyendo cantidades pequeñas de otros hidrocarburos cuyas fórmulas van desde $C_{10}H_{20}$ a $C_{15}H_{28}$.

Tiene una baja solubilidad en agua, un coeficiente de adsorción elevado y un anillo aromático de alta estabilidad (Van Hamme, Singh, & Ward, 2003). Son los hidrocarburos de alto peso molecular, los que mayor problemática presentan en el medio ambiente, pues son relativamente inmóviles, de baja volatilidad y baja solubilidad en agua (Dorn & Salanitro, 2000). Muchos de ellos son carcinógenos y mutagénicos.

- Propiedades

En 2010 la densidad del diésel o gasóleo obtenido de petróleo era aproximadamente de 0.832 kg/l (varía según la región), un 12 % más que la gasolina que tiene una densidad de 0.745 kg/l. Aproximadamente el 86.1 % del diésel es carbono, y cuando se quema se obtiene un poder calorífico de 43.10 MJ/kg contra 43.20 MJ/kg de la gasolina. Sin embargo, debido a la mayor densidad, el gasóleo ofrece una densidad volumétrica energética de 35.86 MJ/L contra los 32.18 MJ/L de la gasolina, lo que supone un 11% más, que podría considerarse notable cuando se compara la eficiencia del motor diésel frente al de ciclo Otto. Las emisiones de CO_2 del diésel son de 73.25 g/MJ, solo ligeramente más bajas que la gasolina, con 73.38 g/MJ.

- Diésel y medio ambiente

A pesar de que el uso del diésel está regulado bajo la normativa Euro V, que minimiza la contaminación del aire, de igual modo en la combustión se emiten contaminantes primarios como: material particulado (PM), monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno (NOx), hidrocarburos duros (HC), compuestos orgánicos volátiles (COV) y otros productos químicos que son contaminantes del aire.

Algunos estudios médicos revelan que la exposición a las emisiones de diésel afecta principalmente el sistema respiratorio, agravando el asma, alergias, bronquitis, y la función pulmonar. El diésel tiene una mayor eficiencia en relación a subproductos del petróleo, ya que contiene una densidad energética mayor que la bencina. También es más económico, al requerir un menor proceso de refinación, pese a ello, es uno de los combustibles más contaminantes.

3.1.2. Consumo de diésel en Nicaragua

De acuerdo con datos oficiales de Nicaragua, en 2018 se han consumido un promedio de 11,741 barriles de diésel por día. Cabe señalar que, de todos los derivados de petróleo, el diésel es el que más se consume, con una participación de 35.86% del total. En total, en el periodo indicado, el sector transporte nacional ha demandado 3.2 millones de barriles de diésel, inferior a los 3.42 millones comparados con el acumulado a septiembre de 2017 (SICA, 2017).

Entre las principales características del mercado local de los derivados del petróleo correspondientes a 2017, se destacaron las siguientes:

- La distribución del mercado de los derivados del petróleo, o sea, la participación de las empresas en el volumen de las ventas de combustibles, estuvo encabezada por PUMA con el 37.8%, seguido por DNP con el 30.2%, UNO con el 22.4% y TROPIGAS con el 8.1%.
- El consumo de derivados del petróleo fue 12.79 millones de barriles, de los cuales 2.93 millones de barriles fueron destinados a la generación de electricidad y 9.84 millones de barriles, al consumo final.
- Cuatro combustibles participan con 93.9% en el volumen total de consumo de los derivados del petróleo: diésel, 36.0%; fuel oil, 23.4%; gasolinás, 23.2%; y gas licuado, 11.3%.
- Cuatro sectores participan con el 79.3% en el volumen total de consumo de los derivados del petróleo: estaciones de servicios, 36.1%; energía, 26.3%; comercio, 9.6%; e industria manufacturera, 7.5%.

3.2. Biorremediación

La biorremediación es una tecnología basada en la utilización de agentes biológicos (microorganismos y plantas), y su potencial degradador para eliminar los contaminantes del medio, mediante su transformación en formas menos tóxicas, y en algunos casos alcanzando la mineralización, producción de CO₂ y el H₂O, así como fuentes de alimento que sustenta su desarrollo y crecimiento (Solanas, 2009).

La capacidad de biodegradación de los microorganismos depende de las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo y de las características químicas del contaminante (Leahy & Cowell, 1990). Con base a la información obtenida de la caracterización del sitio del derrame y conocimiento de las

condiciones óptimas de degradación se puede determinar la factibilidad de una técnica de biorremediación para cada sitio específico.

Existe una gran variedad de microorganismos que casi siempre están presentes en los suelos (bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos), aunque las densidades de población varían ampliamente. En términos generales, se encuentran del orden de 10^6 - 10^9 bacterias cultivables y en torno a 10^4 - 10^7 hongos cultivables por gramo de suelo, aunque se estima que tan solo un 0.1-1% de los microorganismos totales en el suelo son cultivables. Que un microorganismo sea cultivable quiere decir que mediante el empleo de cualquiera de las técnicas de microbiología clásicas (siembra en placa, método del número más probable, tinciones, etc.) puede ser aislado e identificado.

Generalmente, las poblaciones microbianas presentes en los suelos utilizan cualquier fuente de carbono fácilmente asimilable para su supervivencia y desarrollo (Drenovsky, Vo, Graham, & Scow, 2004), pudiendo llegar a adaptar su metabolismo en función de las condiciones ambientales en las que se encuentren y los parámetros físico-químicos que presente el suelo (Thomassin-Lacroix, Eriksson, Reimer, & Mohn, 2002).

La respuesta de la micro-flora edáfica ante disturbios externos que pueden modificar las condiciones ambientales del suelo suele estar representada por cambios en las tasas metabólicas, en la biomasa o en la estructura de las comunidades. Así, en suelos contaminados, las comunidades microbianas presentes suelen estar dominadas por bacterias capaces de sobrevivir a la toxicidad del ambiente, utilizando estos contaminantes para su desarrollo (Rahman, K; Banat, I; Thahira, J; Thayumanavan, T; Lalshmanaperumalsamy, P, 2001).

Se definen los microorganismos hidrocarburolíticos como aquellos capaces de degradar hidrocarburos, obteniendo de ellos la fuente de carbono y energía necesarios. Estos microorganismos facilitan su difusión hacia la célula produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas y biosurfactantes, que actúan como un biofilm alrededor de la molécula de hidrocarburos, para posteriormente romperla en compuestos más sencillos de carbono e hidrógeno.

En suelos contaminados con hidrocarburos, los microorganismos hidrocarburolíticos pueden llegar a representar el 100% de la comunidad microbiana, mientras que si no existen indicios de contaminación sólo llegan al 0.1% del total (Davis, 1967). La fracción del total de microorganismos que metabolizan hidrocarburos es altamente variable, de 6 a 82% para hongos terrestres y de 0.1 a 50 % para bacterias de tierra (Davis, 1967).

Entre los principales géneros de microorganismos hidrocarburolíticos se encuentran: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Stenotrophomonas* y *Rhodococcus* (Evans & Fuchs, 1988); (Prince, R; Varadaraj, R; Fiocco, R; Lessard, R., 1999); (Eweis, Ergas, Chang, & Schroeder, 1999). Para comprender mejor esta tecnología es necesario conocer las

interacciones bioquímicas y microbiológicas que ocurren en el suelo (Musarrat & Zaidi, 2006) y que pueden resumirse en (Gothalwal, 2013):

- Los procesos bioquímicos afectan por igual a microorganismos exógenos y endógenos del suelo.
- Los requisitos de crecimiento microbiano son los mismos para los cultivos desarrollados en laboratorio o en campo.
- Un microorganismo añadido a un suelo contaminado no sólo debe pasar la información genética necesaria al reproducirse y ser capaz de expresar esa capacidad in situ, sino que debe también tener la capacidad de convertirse en parte de la comunidad microbiana del suelo.
- Entre las limitaciones que resultan de las interacciones con el ecosistema contaminado se incluye la necesidad de aceptar la presencia de otros microorganismos, así como la adaptación a las propiedades físicas y químicas del micro-hábitat en el que se van a desarrollar.

3.2.1. Tipos de biorremediación

Los procesos de biorremediación pueden ser divididos básicamente en tres clases. Primero, en atenuación natural, donde la concentración de contaminantes es reducida por los microorganismos nativos del suelo. Segundo, la bioestimulación, donde se adicionan nutrientes y un aceptor de electrones al sistema para mejorar su efectividad y acelerar la biodegradación. Finalmente, la bioaumentación, en donde se inocula el sistema con uno o varios microorganismos apropiados.

(Ramírez, 2011) en su trabajo expresa que con base a la información obtenida de la caracterización del sitio del derrame y conocimiento de las condiciones óptimas de degradación se puede determinar la factibilidad de una técnica de biorremediación para cada sitio específico y explica cada una de esas técnicas:

- Atenuación Natural

La atenuación natural es un método de remediación pasiva que depende de los procesos naturales para degradar y disminuir los contaminantes en el suelo y el agua subterránea (Kao, 2001). Los resultados de la atenuación natural dependen de la presencia o ausencia de los microorganismos degradadores adecuados, oxígeno disuelto, el nivel de nutrientes y de la biodisponibilidad de los contaminantes (Menéndez, y otros, 2007).

Los procesos que contribuyen a la atenuación natural generalmente se encuentran en muchos lugares, pero con diferencias en cuanto a la celeridad y a la eficacia según el tipo de contaminante y las características físicas, químicas y biológicas del suelo y del agua subterránea. Los procesos de atenuación natural a menudo se clasifican en destructivos y no destructivos. Los procesos destructivos destruyen el contaminante. Los procesos no destructivos no destruyen el

contaminante, sino que reducen su concentración. Los procesos de atenuación natural pueden reducir la masa del contaminante por medio de procesos destructivos tales como biodegradación y transformaciones químicas (Riser, 1992).

Los suelos con gran cantidad de materia orgánica, como las zonas pantanosas o antiguos pantanos, con frecuencia son aptos para la atenuación natural. Ciertas formaciones geológicas, como acuíferos de lecho rocoso fracturado o zonas calizas, son menos apropiadas para la atenuación natural porque en estos entornos a menudo hay suelos muy diversos que ocasionan un flujo imprevisible del agua subterránea y dificultan la previsión del movimiento de los contaminantes. Los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo en el tiempo van adquiriendo microorganismos que luego de frenar la fuga son la génesis del proceso de atenuación natural estimulada (Macnaughton, Stephen, Venosa, Davis, & Chang, 1999).

- Bioestimulación

La bioestimulación es el método más empleado para reducir la concentración del contaminante (Cunningham & Philip, 2000). En la bioestimulación la actividad natural de los microorganismos es estimulada por la circulación de soluciones a través del suelo contaminado. Nutrientes (nitrógeno y fósforo), oxígeno, entre otros que pueden ser empleados para estimular la biorremediación (Salinas, y otros, 2007). La atenuación natural estimulada o bioestimulación, podría ser una opción aceptable para lugares donde se haya reducido la concentración de contaminantes como resultado de la aplicación de algunas medidas correctivas.

Los procesos naturales generalmente son lentos. Se necesita una vigilancia a largo plazo para comprobar que la concentración de contaminantes disminuya continuamente lo suficiente para que no se convierta en una amenaza para la salud (Nyer, 1993). Antes de iniciar la biorremediación in situ propiamente dicha, es importante establecer el potencial de los microorganismos endógenos para metabolizar el material contaminante y valorar los factores limitantes a ser controlados durante el tratamiento.

Otra condición que debe ser considerada para una biorremediación efectiva es el estado de los niveles de nutrientes en el lugar afectado (Menéndez, y otros, 2007). Factores tales como la temperatura, la limitación de nutrientes y la disponibilidad de humedad, reducen la biodegradación de hidrocarburos. Identificar estos factores limitantes es entonces de gran importancia para favorecer la biodegradación (Borrassen & Rike, 2007). Aunque los microorganismos con la capacidad para degradar petróleo crudo se hallan distribuidos en todos los ambientes terrestres y marinos, una de las dificultades de la biorremediación es que ella se realiza en ambientes naturales, los cuales contienen diversos microorganismos no caracterizados.

Además, dos problemas medio ambientales ocurren bajo condiciones completamente diferentes (Watanabe, 2001). Si bien un aspecto crítico es la presencia de bacterias con la capacidad degradadora; la biodisponibilidad es un

factor de mucha más importancia en los procesos de biodegradación. Los microorganismos degradadores de hidrocarburos producen una variedad de surfactantes activos que contribuyen a mejorar la biodisponibilidad, pero en ocasiones es necesario adicionar surfactantes cuando los contaminantes son altamente hidrofóbicos y/o seguramente adsorbidos por las partículas o materia orgánica del suelo (Menéndez, y otros, 2007).

Para la efectiva biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos se requiere una mezcla de múltiples géneros de microorganismos, cada uno capaz de metabolizar diferentes compuestos. Por ello entender la taxonomía de los microorganismos ayuda enormemente a determinar las mejores condiciones para la bioestimulación (Salinas, y otros, 2007).

- Bioaumentación

Las técnicas de bioaumentación se basan en la adición de microorganismos, seleccionados naturalmente desde el sitio contaminado o microorganismos que han sufrido modificaciones genéticas, en ambos casos, el objetivo es disminuir o eliminar sustancias nocivas para el ambiente. La bioaumentación asegura que estén presentes microorganismos específicos, que se sabe son capaces de degradar al compuesto contaminante hasta sus moléculas básicas.

Las bacterias son los microorganismos más comúnmente utilizados para la bioaumentación (Saponaro, Bonomo, Petruzzelli, Romote, & Barbafieri, 2002). La bioaumentación de los suelos contaminados se puede determinar por una serie de pruebas de laboratorio, especialmente de caracterización de las poblaciones de microorganismos y del estudio en microcosmos, sumado a la evaluación de los microorganismos con capacidad para colonizar y degradar a los contaminantes del suelo (Sabaté, Vinas, & Solanas, 2004).

Las complejas propiedades biológicas, químicas y físicas de los suelos pueden reducir las poblaciones introducidas de microorganismos por relaciones antagónicas (factores bióticos), como prelación y competencia con la población de microorganismos autóctonos, también puede darse estrés fisiológico causado por factores abióticos tales como el pH, la disponibilidad de agua y aire, la temperatura, y en el caso especial de los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) la disponibilidad de carbono y una fuente de energía (Semple, Dew, Doick, & Rhodes, 2006).

La supervivencia y adaptación de los organismos degradadores introducidos o autóctonos en el sitio contaminado es de gran importancia para el éxito de la biorremediación. El monitoreo de los cambios en las poblaciones de microorganismos degradadores es esencial para establecer y mantener las condiciones favorables para dichos microorganismos (Phrommanich, y otros, 2007).

Los microorganismos capaces de degradar contaminantes orgánicos en cultivos pueden abandonar su función cuando se inocula en ambientes naturales, porque ellos pueden ser susceptibles a toxinas o depredadores en el medio ambiente

(Márquez, Hernández, & Lamela, 2001). En ocasiones no suelen mejorar las tasas de degradación alcanzadas por los microorganismos autóctonos (Viñas, 2005).

El suelo contaminado a menudo es deficiente en materia orgánica y tiene baja actividad microbiana. Usualmente las comunidades bacterianas están adaptadas a la presencia de los contaminantes, pero otras condiciones ambientales tales como disponibilidad de nutrientes y concentración de oxígeno pueden ser desfavorables; así, la degradación microbiana de los contaminantes in situ es lenta (Lee, Oh, & Kim, 2007).

La actividad microbiana es estimulada por la adición de materia orgánica al suelo, está mejora mucho las propiedades químicas y físicas del suelo tales como la capacidad de retención de agua, aireación, pH, la capacidad de recambio iónico. Estas propiedades influyen directamente sobre las poblaciones de los microorganismos endógenos y pueden mejorar su capacidad para degradar hidrocarburos y otros contaminantes basados en el carbono (Weelman, Ulery, Barcellona, & Duerr – Auster, 2001).

Debido a que la biorremediación in situ no implica excavación, los costos y molestias de excavación y transporte son eliminados, es por ello que la biorremediación es uno de los pocos procesos de tratamiento actualmente aceptados. Por medio de la biorremediación todo compuesto orgánico puede ser biodegradado, esto se constituye como un reto biotecnológico, el cual hace que las bacterias liberen sus enzimas y obtengan energía del contaminante (Reddi & Inyand, 2000).

3.2.2. Influencia de los factores sobre la biodegradación de hidrocarburos

Como se ha mencionado, la biodegradación de hidrocarburos en suelos depende de una infinidad de factores abióticos que afectan tanto los ratios de crecimiento microbiano como a la actividad enzimática lo que influye directamente en los ratios de biodegradación de hidrocarburos. Según (Romero, 2012) en su tesis modelización de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con gasoil, detalla algunos de los factores más importantes que dominan la biodegradación de hidrocarburos, como lo son:

- Cantidad y estado del hidrocarburo

Al ser el petróleo una mezcla extremadamente compleja de hidrocarburos existe gran cantidad de estudios de biodegradación de las familias y compuestos que lo componen (Atlas R. M., 1995); (De Jonge, 1997); (Chaîneau, 2003); (Gafonova & Yarranton, 2001); (Martienssen & Schirmer, 2007). El estado físico en el que se encuentran los hidrocarburos del petróleo tiene un efecto marcado en su biodegradación. Concentraciones muy bajas de hidrocarburos son solubles en agua, pero la mayoría de derrames de hidrocarburos del petróleo se producen en concentraciones que sobrepasan en gran medida el límite de solubilidad (Atlas R. M., 1981).

El derrame de hidrocarburos en suelos se caracteriza principalmente por el movimiento vertical a lo largo del terreno más que un esparcimiento horizontal (contrario a lo que sucedería en un derrame marino). La infiltración del hidrocarburo en el suelo disminuye las pérdidas por evaporación de los compuestos volátiles lo que puede hacer disminuir la actividad de los microorganismos. Por otro lado, las partículas presentes en el suelo, puede reducir, por absorción, la toxicidad efectiva de los componentes del petróleo, pero la absorción y adsorción de las sustancias húmicas del suelo probablemente contribuyan a la formación de residuos persistentes (Leahy & Cowell, 1990).

Según (Atlas R. M., 1995), cuyo estudio está basado principalmente en derrames marinos, la tasa de biodegradación y la cantidad eliminada de hidrocarburo, depende más del tipo de hidrocarburo que de la cantidad de hidrocarburo presente en un emplazamiento contaminado, ya que, es más importante la limitación de nutrientes y oxígeno que en sí la cantidad.

Aunque puede suceder que si la cantidad de hidrocarburo es excesiva se produzcan efectos tóxicos sobre las bacterias degradadoras, sobre este tema en la bibliografía, debido a la gran cantidad de factores influyentes en la biodegradación, no se dan concentraciones a partir de las cuales las bacterias queden totalmente inhibidas. En otros estudios (Rahman K. , 2002); (Del'Arco & De França F, 2001); (Hui, 2007) en los que se han realizado ensayos, en laboratorio, a diferentes niveles de concentración de hidrocarburo se observa que la tasa de biodegradación es inversamente proporcional a la concentración.

El estudio de (Rahman K. , 2002) va un poco más allá y muestra que al hacer ensayos con el mismo crudo con diferentes niveles de concentración son menores las tasas de biodegradación cuanto mayor es el nivel de concentración como el peso molecular y más compleja la estructura molecular. Por ejemplo, no existe gran diferencia, en cuanto a las tasas de biodegradación, entre niveles de concentración en los hidrocarburos de cadena lineal corta, pero si existe más diferencia cuando los hidrocarburos son ramificados o de cadena lineal más larga.

Esto se puede deber a que los microorganismos lo primero que metabolizan son las cadenas lineales más cortas llegando un momento en el cual ya no tienen capacidad para seguir metabolizando ni compuestos de cadenas cortas ni ningún otro compuesto lo que produce un estancamiento de la biodegradación. Con respecto al tipo de hidrocarburo, la heterogeneidad de la composición de los diferentes crudos del petróleo y sus productos refinados influyen en gran medida en los ratios de biodegradación tanto del crudo como de sus fracciones (Leahy & Cowell, 1990) (Pollard, Hruday, & Fedorack, 1994).

Cuando el hidrocarburo ha estado durante un largo periodo de tiempo en el suelo presenta serias dificultades para realizarle un tratamiento biológico. Procesos ambientales tales como evaporación, pérdidas fotolíticas, hidrólisis y biotransformación, reducen la concentración de los sustratos fácilmente degradables dejando en el suelo residuos mucho más resistentes al ataque biológico (Pollard, Hruday, & Fedorack, 1994) (Talat Saeed & Al-Matrouk, 1998).

Con respecto a los productos refinados, particularmente con el gasóleo, existen varios estudios de la biodegradación en suelos contaminados con este producto (Amellal, Portal, & Berthelin, 2001); (Bento, 2005); (Bundy, Paton, & Campbell C, 2001); (Margesin & Schinner, 2001); (Margesin, Hammerle, & Tschferko, 2007); (Riffaldi, 2005); (Song, Wang, & Bartha, 1990) en los que certifican que es posible la biorremediación de parte de este producto, principalmente, las cadenas lineales más cortas, en periodos razonables de tiempo.

- Temperatura

La temperatura tiene influencia en la biodegradación del petróleo debido por un lado a su efecto en la naturaleza física y la composición química de los hidrocarburos y por otro lado a su efecto en los microorganismos y la composición de las comunidades microbianas (Atlas R. M., 1981); (Dibble & Bartha, 1979); (Leahy & Cowell, 1990); (Rahman K. , 2002); (Tremier, 2005); (Atlas R. M., 1975); (Pollard, Hrudey, & Fedorack, 1994).

Atlas (Atlas R. M., 1981); (Atlas R. M., 1975) encontró que los efectos de la temperatura difieren, dependiendo de la composición de la mezcla de hidrocarburos. Bajas temperaturas, retardan los ratios de volatilización de los hidrocarburos de bajo peso molecular, algunos de los cuales son tóxicos para los microorganismos.

La presencia de estos compuestos tóxicos ralentiza el comienzo de la biodegradación a bajas temperaturas. En el estudio realizado por (Dibble & Bartha, 1979) muestra que la influencia de la temperatura en los procesos biológicos puede llegar a tener efectos significativos ya que, conforme aumenta la temperatura, las tasas de biodegradación también lo hacen, mostrando mejores resultados a 20 °C que, a 5 °C, pero sin casi haber mejorías cuando la temperatura aumenta de 28 a 37 °C.

(Leahy & Cowell, 1990) en su estudio también manifiesta que el aumento de la temperatura refleja un aumento de la eficiencia de biodegradación, pero también sugiere la importancia de utilizar comunidades bacterianas adaptadas a los cambios de temperatura del medio donde se va a realizar un proceso de biorremediación, ya que, existen estudios en los que se presentan resultados aceptables de biodegradación a bajas temperaturas.

(Rahman K. , 2002) en sus resultados muestra diferentes porcentajes de biodegradación que dependen tanto de las bacterias utilizadas como del tipo de hidrocarburo, concluyendo que el uso de una mezcla de bacterias puede degradar eficientemente los hidrocarburos del petróleo siendo alcanzada su máxima eficiencia a una temperatura de 30°C. Pero sugiere, finalmente, un uso optimizado tanto de bacterias como de nutrientes bajo ciertas condiciones ambientales para un eficaz funcionamiento de la biorremediación.

(Delille, Pelletier, & Coulon, 2007) coincide manifestando que en su estudio ha tenido buenos resultados a temperaturas bajas pero que no se debe generalizar, sino que para diseñar un buen sistema de biorremediación se requiere un minucioso estudio de las condiciones locales, consideraciones de las propiedades

físicas, químicas y microbianas del suelo contaminado, así como también de las condiciones ambientales.

- Oxígeno

La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados en mayor medida y con mayor rapidez de forma aeróbica (O_2 como aceptor final de electrones), ya que en ausencia de O_2 , y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Mn_4^+ y Fe_3^+) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas (Viñas, 2005); (Leahy & Cowell, 1990); (Young-Gyun, Sung-Keun, & Sung-Taik, 2000).

El paso inicial para el catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos, en condiciones aeróbicas, por bacterias y hongos envuelve la oxidación del sustrato, donde el O_2 sirve como aceptor terminal de electrones, por lo que las moléculas de oxígeno son necesarias (Pollard, Hruvey, & Fedorack, 1994). El ratio de disponibilidad del oxígeno en suelos depende: del consumo de oxígeno por parte de la microbiota, del tipo de suelo, de la saturación en agua del suelo y de la presencia de sustratos utilizables que pueden hacer decaer el oxígeno. La concentración de oxígeno ha sido identificada como la variable limitante para la biodegradación de crudos en suelos (Leahy & Cowell, 1990).

- Humedad

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua (Young-Gyun, Sung-Keun, & Sung-Taik, 2000). No obstante, el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y de si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica (Viñas, 2005). Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes, así como también la migración bacteriana a través del suelo.

El exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua (Viñas, 2005). (Dibble & Bartha, 1979), describió un rango de humedad óptimo del 30-90% de saturación en agua para la biodegradación aeróbica de lodos contaminados con crudo de petróleo, ya que al hacer el estudio en este rango de humedades tuvieron buenos resultados de biodegradación sin encontrar diferencias significativas conforme aumentaban de 30 a 90%.

En algunos suelos, con alto contenido de arcillas (partículas finas y por lo tanto menor porosidad), en el orden del 45% de contenido de arcilla, se han utilizado contenidos de humedad menores al 20% obteniendo mejores resultados que cuando se utilizó humedades mayores a 20% como es el caso del estudio realizado por (Ayotamuno, Kogbara, & Taleat, 2006).

- Poblaciones microbianas

La red de poros formada como resultado de la asociación de las partículas minerales (arenas, limos y arcillas) y la materia orgánica, muestra una gran variedad de tamaños y espacios, lo que condiciona el tipo y la diversidad de las poblaciones microbianas existentes (Sessitsch, 2001). En términos generales se encuentran del orden de 10^6 - 10^9 bacterias cultivables por gramo de suelo, mientras que los hongos se encuentran en dos órdenes de magnitud menos como unidades formadoras de colonias, pero representan una parte importante de la biomasa del suelo (Viñas, 2005).

La organización estructural de las partículas del suelo, confiere una heterogeneidad espacial para los microorganismos, que se caracteriza por la presencia de diferentes sustratos, nutrientes, concentraciones de oxígeno, contenido de agua líquida, así como de un pH variable (Sessitsch, 2001). Este hecho implica que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas, condicionadas también por la biodisponibilidad de las distintas fuentes de carbono y energía, que a su vez está condicionada por las características fisicoquímicas propias de cada suelo.

Los hidrocarburos son degradados fundamentalmente por bacterias y hongos y la adaptación por exposición anterior de las comunidades microbianas a los hidrocarburos aumenta las tasas de degradación de los mismos (Amellal, Portal, & Berthelin, 2001); (Delille, Pelletier, & Coulon, 2007); (Riffaldi, 2005). La adaptación se lleva a cabo mediante un enriquecimiento selectivo de los microorganismos que utilizan hidrocarburos y la amplificación del grupo de genes que catabolizan hidrocarburos (Riffaldi, 2005).

La biodegradación de los hidrocarburos normalmente requiere la cooperación de más de una única especie. Esto es particularmente cierto en las mezclas complejas de compuestos como es el caso del petróleo. Los microorganismos individuales pueden metabolizar solo un rango limitado de sustratos de hidrocarburos. Se requiere un conjunto de poblaciones mezcladas con, sobre todo, extensas capacidades enzimáticas para aumentar la tasa y la extensión de la biodegradación del petróleo. Se ha detectado en suelos o aguas contaminadas con petróleo, la presencia de poblaciones microbianas pertenecientes a varios géneros (Riffaldi, 2005).

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, con respecto a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación. Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado en favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo (Viñas, 2005).

Por este motivo, en emplazamientos previamente contaminados, en ecosistemas complejos como es el suelo, los microorganismos autóctonos poseen una elevada

biodiversidad influida, en gran medida, por la diversidad de las condiciones ambientales y varios factores físico-químicos y biológicos (Baek, 2004); (Volkering, Breure, & Rulkens, 1998); (Hui, 2007). Es decir, los organismos del propio ecosistema contaminado son los más eficientes para realizar la biodegradación.

En consecuencia, es necesario abordar el análisis de la viabilidad de la microbiota del sistema a descontaminar y su capacidad para crecer en presencia de los hidrocarburos contaminantes. Cuando se intenta descontaminar un suelo, se ha demostrado, que la adición de bacterias degradadoras de hidrocarburos no es más efectiva (incluso puede llegar a ser menos efectiva) en comparación con la estimulación del crecimiento de la microbiota existente en el suelo.

En consecuencia, el entendimiento de la ecología microbiana y las restricciones de la biodegradación de un suelo contaminado con petróleo es extremadamente importante (Bundy, Paton, & Campbell C, 2001). Por lo tanto, la bioestimulación de la población microbiana indígena, puede acelerar el proceso de biodegradación de los contaminantes (Bento, 2005). Lo que se debe verificar es que la microbiota existente, que suele ser muy compleja, tenga las capacidades enzimáticas necesarias para degradar los hidrocarburos contaminantes.

- Nutrientes

El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y estos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y sintetización. Los nutrientes, normalmente requeridos, son el fósforo y el nitrógeno, por tanto, las concentraciones asimilables de dichos elementos presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca, Na, Fe y SO ya están presentes en cantidades suficientes.

La adición de fuentes de N y P inorgánicas generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (Chaîneau, 2003). Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía respecto al contenido de carbono a degradar son muy distintas; el rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1.

Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, de igual manera, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación (Margesin & Schinner, 2001). Para evitar el exceso de nutrientes, así como la pérdida de los mismos por lixiviación, también se han utilizado fertilizantes inorgánicos oleofílicos de liberación lenta para la biorremediación de suelos contaminados.

Además, es importante destacar que la acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo (el amoníaco se puede unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio).

- Estructura y tipo de suelo

La estructura del suelo puede influenciar en la biodegradación de hidrocarburos debido a que la actividad microbiana varía con el tamaño de los agregados que se forman en el suelo, dado que existe menor biomasa microbiana en microagregados (formados principalmente por arcillas) que en macroagregados (Bronick & Lal, 2005). Lo que produciría que el movimiento de carbono orgánico del suelo está principalmente controlado por el volumen de agua que ocupa los poros del suelo.

Siendo la estructura del suelo una propiedad que afecta indirectamente debido a su efecto en el contenido de agua del suelo, cuanto menores son los microporos, el agua no está disponible para ayudar a la actividad microbiana en la descomposición del carbono orgánico (Thomsen, 1999); (Dibble & Bartha, 1979). Por lo que en suelos en los que haya alto contenido de arcillas (que generen microagregados) queden secuestrados algunos hidrocarburos, asociados a esta estructura, que no pueden ser metabolizados por las bacterias como es el caso de algunos PAHs (Amellal, Portal, & Berthelin, 2001).

En el caso en que la porosidad sea suficiente para que ingrese el agua, gran contenido de esta podría dificultar la presencia de oxígeno, lo que también produciría una disminución de la capacidad metabólica de las bacterias (Young-Gyun, Sung-Keun, & Sung-Taik, 2000). En los dos casos, en el que no haya disponible agua por la baja porosidad y en los que no haya disponible oxígeno por el alto contenido en agua, la utilización de nutrientes ya sean orgánicos o inorgánicos no aumenta la eficiencia de la biodegradación (Wang, 2008) debido a la inaccesibilidad de estos para aumentar las poblaciones microbianas.

Con respecto a la influencia de la estructura del suelo, en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, existen varias publicaciones que han estudiado su influencia, principalmente basados en las diferentes tasas de biodegradación presentadas cuando varía el contenido de los tamaños de partículas que constituyen el suelo y de las agregaciones que pueden producir (Young-Gyun, Sung-Keun, & Sung-Taik, 2000); (Bronick & Lal, 2005); (Bento, 2005); (Baek, 2004); (Bundy, Paton, & Campbell C, 2001); (Amellal, Portal, & Berthelin, 2001); (Sessitsch, 2001) coincidiendo que la textura juega un papel importante en la biodisponibilidad del hidrocarburo a ser metabolizado, disminuyen los porcentajes de biodegradación conforme aumenta la cantidad de partículas finas pero que existen otros factores que también influyen y que se los ha comentado a lo largo de este apartado.

3.2.3. Ventajas y desventajas de la tecnología de biorremediación

Ante la necesidad de desarrollar procesos respetuosos con el medio ambiente, los procesos de biorremediación se presentan como una alternativa sostenible que no genera residuos nocivos (Gothalwal, 2013). Sus características de no toxicidad, en comparación con otros métodos que tienden a formar subproductos de mayor toxicidad que la de los contaminantes originales (Shannon & Unterman, 1993),

hacen que su popularidad sea grande al percibirse como más respetuosos con el medio ambiente que el resto de tecnologías.

Sin embargo, el desconocimiento de sus posibilidades de aplicación, en términos de biodegradabilidad, por parte de consultoras y administraciones encargadas de las autorizaciones, es un problema añadido y contribuye a atribuirle dudas en cuanto a su eficacia. Los procesos de biorremediación pueden desarrollarse mediante un gran abanico de técnicas, todas ellas conocidas a nivel internacional, aunque en continuo proceso de estudio y mejora. Este hecho permite acoplarse a distintos episodios de contaminación según las características del entorno.

3.3. El rol de los microorganismos en la biorremediación y la necesidad de formar consorcios microbianos para potenciar su acción de biodegradación de hidrocarburos

Los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad) así como de los compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. El petróleo y los hidrocarburos se encuentran naturalmente presentes en el suelo, lo que ha permitido a muchos microorganismos acostumbrarse a su presencia y utilizarlos para sobrevivir.

La formación de consorcios microbianos en las tecnologías de biorremediación es de gran importancia, ya que se ha mostrado en estudios tener gran éxito; en su mayoría se han logrado obtener porcentajes de degradación más altos que los obtenidos por una sola especie. La exposición prolongada de los consorcios a los hidrocarburos los hace más eficientes para degradar el contaminante como única fuente de carbono. Las ventajas que se obtienen con un consorcio nativo es que se forma de manera natural y tiene mayor potencial para la degradación.

En el caso de los hidrocarburos, las bacterias gram negativas parecen encontrarse más adaptadas a estas fuentes de carbono (Venosa, Stephen, Macnaughton, Chang, & White, 1999). Diversos estudios permiten hoy en día establecer una lista de 160 géneros de microorganismos que degradan los hidrocarburos (Prince, R; Varadaraj, R; Fiocco, R; Lessard, R, 1999), los consorcios más empleados contienen las especies *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y en menos ocasiones *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Candida*. Las bacterias son más empleadas que los hongos y las levaduras (Balba, Al-Awadhi, & Aldaher, 1998); (Vasudevan & Rajaram, 2001); (Rahman et al., 2001).

Es importante estudiar qué poblaciones existen en el suelo contaminado ya que estas probablemente ya se habrán adaptado al ambiente contaminado (Hanson K. , Anuranjini, Madhavi, & Anjana, 1997). Las poblaciones nativas pueden ser sensibles a la presencia y la actividad de poblaciones extranjeras especializadas. Estas poblaciones, visto las diferencias metabólicas, producen en algunos casos metabolitos e intermediarios tóxicos para la microflora nativa.

Muchas veces también, estas poblaciones agregadas no se adaptan a las condiciones del sitio contaminado y debido a ello, no realizan la descontaminación con la misma eficiencia con la que lo hacen las poblaciones nativas (Thomassin-Lacroix, Eriksson, Reimer, & Mohn, 2002). El suelo es un medio complejo orgánico y/o mineral en el que muchas condiciones determinan la variabilidad de la microflora; depende mucho de las características fisicoquímicas del suelo, así como de las condiciones medioambientales para la obtención de una tasa óptima de degradación.

3.4. Comportamiento cinético de los microorganismos

Un cultivo microbiano imita una reacción en forma de S hasta la fase estacionaria y decrece luego de ella, es decir que la velocidad de crecimiento en un tiempo dado, es proporcional a la concentración de células ya presentes durante ese tiempo.

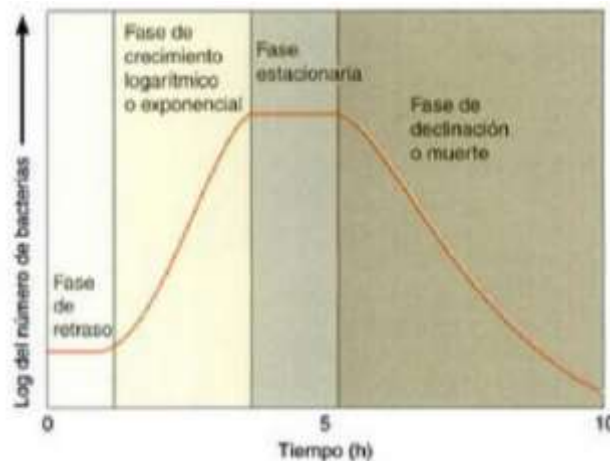


Figura 3.1: Curva general de crecimiento microbiano (Tortora et al., 2007)

3.4.1. Crecimiento bacteriano

En microbiología, la palabra crecimiento se define como un incremento en el número de células o de masa celular por unidad de tiempo de una población microbiana (Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J., 1997). Si un microorganismo es cenocítico, es decir, multinucleado, en el que las divisiones nucleares no se acompañan de divisiones celulares, el crecimiento produce un incremento de tamaño, pero no del número de células.

El crecimiento ocasiona un aumento del número de células cuando los microorganismos se multiplican por procesos como gemación o fisión binaria. En este caso las células individuales se agrandan y dividen para originar dos células hijas de un tamaño aproximadamente igual (Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A., 1999).

La microbiología predictiva está relacionada con la compleja dinámica del comportamiento de la población microbiana, tal como fue observado por (Eduardo, 2007), expresa que Monod J en su estudio *The growth of Bacterial Cultures* acerca

de que: “el crecimiento de los cultivos bacterianos, a pesar de la inmensa complejidad del fenómeno, generalmente obedece a leyes relativamente sencillas, las cuales hacen posible definir ciertas características cuantitativas del ciclo del crecimiento, esencialmente las tres constantes del crecimiento: crecimiento total, tasa del crecimiento exponencial y crecimiento latente.

La curva de crecimiento de un cultivo microbiano como la que se muestra en la figura 3.1 puede ser subdividida en cuatro partes distintas denominadas fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

- Fase de latencia: es el período de ajuste que las células experimentan al ser transferidas de un medio al otro antes de iniciar su crecimiento.
- Fase exponencial o logarítmica: es aquella durante la cual los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible, en función de su potencial genético, tipo de medio y las condiciones en que crece. En este período hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células (o cualquier otra propiedad medible de la población) y el tiempo. Los microorganismos se dividen y duplican en número en intervalos regulares. Como cada célula se divide en un momento ligeramente diferente del resto, la curva de crecimiento aumenta suavemente, en lugar de realizar discretos saltos.
- Fase estacionaria: es resultado del agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos de metabolismo que tienen como consecuencia la disminución de la velocidad del crecimiento. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades.
- Fase de muerte: es consecuencia de diversos factores; uno importante es el agotamiento de las reservas celulares de energía. Al igual que el crecimiento, la muerte también asume una función exponencial que puede ser representada por una disminución lineal del número de las células viables a lo largo del tiempo (Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J., 1997).

3.4.2. Adaptabilidad y variabilidad de respuestas microbianas

El proceso de adaptación de los microorganismos a las condiciones del medio en que se encuentran depende de varios factores como es el caso de la composición del medio mismo o del estado fisiológico de la cepa, entre otros. Por eso, la variabilidad de las respuestas microbianas influye de manera distinta en la predicción de la cinética de los microorganismos. Dichas respuestas de los microorganismos a las condiciones de crecimiento pueden ser evidenciadas a través de sus parámetros de crecimiento como son el tiempo de latencia, tiempo de generación y la velocidad de crecimiento.

- Tiempo de latencia

Un fenómeno inherente a la cinética microbiana es la latencia, la cuál es típicamente observada como la respuesta retardada de la población microbiana ante un (repentino) cambio en el ambiente. La fase de latencia puede producirse en ambos procesos, de crecimiento y de inactivación (Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., and Van Impe, J. F. , 2004). En el caso de las condiciones de crecimiento, la fase de latencia es el período de ajuste durante el cual las células bacterianas se modifican por sí mismas con el objetivo de sacar ventaja del nuevo ambiente e iniciar el crecimiento exponencial (Buchanan & Klawitter, 1991).

Por tanto, durante la fase de latencia las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético, y, en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas (Montville, 2000). Comúnmente, la fase transitoria que sigue a la inoculación del microorganismo en un medio de cultivo del laboratorio en condiciones ambientales constantes puede definirse como la fase de latencia inicial.

Sin embargo, variaciones ambientales durante este período de crecimiento pueden dar lugar a un crecimiento retardado, o latencia intermedia. Además del cambio del medio y del efecto de la dilución, la latencia inicial y la latencia intermedia pueden ser consideradas como esencialmente la misma, porque en ambos casos las células experimentan la transición de unas condiciones a otras (Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., and Van Impe, J. F. , 2004).

La línea divisoria crecimiento/no crecimiento representa un límite en el cual la tasa de crecimiento es cero y la fase de latencia infinita. Probablemente, y más que cualquier otro factor, la determinación precisa de la fase de latencia ha creado problemas a los microbiólogos predictivos. Incluso ha sido ignorada en muchas aplicaciones prácticas de modelos predictivos (Gill, Harrison, & Phillips, 1991).

Hay diversos estados de latencia, como las células que se están dividiendo activamente, aquellas que demuestran una fase de latencia fisiológica, aquellas que están dañadas y requieren recuperación, y aquellas que han empezado un estado de animación suspendido (viables, pero no cultivables). Además, pueden surgir complicaciones de modelado cuando las fluctuaciones en las condiciones ambientales sean de la suficiente magnitud y rapidez como para inducir a una población que ya ha superado su fase de latencia para empezar otra vez uno de los estados latentes citados anteriormente (McMeekin, Olley, Ratkowsky, & Ross, 2002).

La duración de la fase de latencia se ve afectada por factores como la identidad y el fenotipo de la bacteria, el tamaño del inóculo, la historia fisiológica de la población y por los cambios en el medio físico-químico, tales como la temperatura, el pH, la actividad de agua y la disponibilidad de nutrientes. La duración del tiempo de latencia suele ser estimado erróneamente. Esto es usualmente atribuido al

efecto de la historia previa de las células. (Robinson, Ocio, Kaloti, & Mackey, 1998) formalizaron el concepto de tiempo de latencia dependiente de dos elementos:

- ✓ La cantidad de trabajo necesario por parte de las células para adaptarse al nuevo ambiente y/o reparar los daños debidos ese cambio.
- ✓ La proporción en la que estas reparaciones pueden hacerse.

Una pre adaptación a las condiciones perjudiciales al crecimiento puede reducir de manera espectacular los tiempos de latencia. Incluso cuando los efectos del inóculo han sido minimizados, todavía es difícil obtener una imagen clara de la forma en cómo la latencia varía en función del ambiente externo (Robinson, Ocio, Kaloti, & Mackey, 1998). Por tanto, la magnitud y el grado del cambio entre el ambiente anterior y el ambiente actual afectan el tiempo de latencia.

Para (Robinson, Ocio, Kaloti, & Mackey, 1998), la exactitud con la cual la latencia puede ser predicha dependerá del conocimiento del estado del inóculo y de la habilidad para predecir cómo la latencia se ve influenciada por los efectos separados del estado del inóculo y de las condiciones ambientales. Debido a la existencia de la multitud de factores anteriormente mencionados que afectan el comportamiento de la fase de latencia, es difícil obtener predicciones (Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., and Van Impe, J. F. , 2004).

- Tiempo de generación

El tiempo de generación es el tiempo necesario para duplicar la población bacteriana. Según (R. Y. Stanier, 1989) se define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2. Durante este período de generación el número de células y la masa celular se duplica. El tiempo de generación varía entre los distintos microorganismos.

Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1–3 horas, conociéndose pocos microorganismos que crezcan muy rápidamente dividiéndose en menos de 10 minutos. Otras tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días. El tiempo de generación es útil como indicador del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano (Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J., 1997)

El tiempo de generación está directamente relacionado con la velocidad de crecimiento exponencial, que se define como la pendiente de la curva de crecimiento logarítmico en la fase de crecimiento exponencial. La relación proporcional entre el tiempo de latencia y el tiempo de generación es implícita o explícitamente asumida por algunos investigadores (Delignette-Muller, 1998).

Generalmente, admiten que, a diferencia del tiempo de generación, el tiempo de latencia no depende solamente de las condiciones de crecimiento, sino que también de las condiciones de crecimiento previas, tal como se ha indicado anteriormente. Pero suponen que para los cultivos que tienen idénticos estados fisiológicos en el momento de la inoculación, y que fueron cultivados bajo

diferentes condiciones, el ratio del tiempo de latencia sobre el tiempo de generación es constante (Delignette-Muller, 1998).

Según (Robinson, Ocio, Kaloti, & Mackey, 1998), varios modelos que son muy adecuados para predecir la fase de latencia pueden diferir de aquellos que son mejores para predecir la velocidad de crecimiento y en muchos casos, no se ha tenido en cuenta en la latencia el efecto de la historia del inóculo.

- Velocidad de crecimiento

Como ya se ha indicado anteriormente, el crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en masa microbiana. En este contexto, la velocidad de crecimiento se define como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J., 1997).

Un cultivo microbiano creciendo en equilibrio imita una reacción auto catalítica de primer orden, es decir, la velocidad del aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes durante ese tiempo. La tasa del crecimiento exponencial se ve influenciada por las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio), así como por las características genéticas del microorganismo (Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J., 1997).

3.4.3. Modelos cinéticos

Hay muchas leyes para la velocidad de crecimiento celular, sin embargo, (Nielsen & Villadsen, 1994) dan como definición de modelo cinético para la descripción de un proceso microbiano lo siguiente: “La correlación verbal o matemática entre velocidades y concentración de reactantes/productos, los cuales son insertados en balances de materia y permiten la predicción del grado de conversión de sustratos y el rendimiento de productos individuales en otras condiciones de operación”.

Se han propuesto numerosos modelos cinéticos, los cuales se pueden clasificar según se recoge en la tabla 3.1 (García-Ochoa & VE Santos, 1999a.). Los modelos cinéticos más simples son los modelos cinéticos no estructurados-no segregados que consideran al microorganismo como un único componente que, de forma genérica, denominan biomasa (expresada como masa de microorganismo seco por volumen de sistema, pero esto solo por la forma habitual de realizar la medida).

Los modelos denominados metabólicos consideran rutas metabólicas simplificadas dentro del microorganismo en las que únicamente está involucrado el sustrato carbonado. En un modelo estructurado o de célula se considera el metabolismo del sustrato nitrogenado, describiendo el crecimiento mediante esquemas simplificados de reacción.

Cuando se unen los esquemas simplificados de reacción procedentes de modelos metabólicos y de modelos de célula se obtienen los modelos químicamente estructurados, en los que se describe el metabolismo microbiano global de forma

simplificada, considerando al microorganismo formado por multitud de componentes internos que reaccionan entre sí.

Un modelo segregado es aquel que considera que una población está formada por microorganismos diferentes. En el caso de los microorganismos presentes en un cultivo puro, en el que se presentan distribuciones de alguna propiedad como edad, tamaño, etc. Se pueden denominar también como modelos morfológicamente estructurados. En el caso de los cultivos mixtos, la segregación puede referirse únicamente a la consideración de diferentes “biomasas” empleando para la descripción de cada una de estos modelos no estructurados-no segregados (García-Ochoa, Santos, & Gómez, 1999b).

Los modelos más sencillos o no estructurados no-segregados son empleados para numerosas aplicaciones en la solución de problemas de ingeniería, pero para una mejor descripción del sistema es necesario utilizar modelos que tengan en cuenta esquemas de reacción complejos, es decir que tengan en cuenta las rutas del metabolismo de cada microorganismo.

Tabla 3.1: Clasificación de modelos cinéticos

Modelo cinético	Concepto
No estructurado-No segregados	La biomasa se considera como un único componente. Se considera una célula media como representativa del cultivo.
Metabólico	Normalmente no estructurado-no segregado. Se describen las rutas metabólicas como una red de reacciones empleando un esquema simplificado de reacción, con relaciones estequiométricas definidas.
Estructurado (o de Célula)	La descripción de la biomasa se realiza considerándola formada por varias especies. Se tienen en cuenta los componentes intracelulares.
Químicamente estructurado	Se considera a la biomasa formada por varias especies y también un metabolismo simplificado (una red de reacciones).
Segregado	En la descripción del microorganismo se considera la distribución de alguna propiedad. No se considera un microorganismo medio.

(Desarrollo de modelo cinético para bioprocesos, 1999)

- Modelo de Monod

Monod fue el primero en investigar el efecto de la concentración de sustrato sobre la rapidez de crecimiento, y encontró que la velocidad específica de crecimiento de las células durante las fases de crecimiento y desaceleración depende de la concentración de nutrientes existentes en el medio, se denomina sustrato limitante y es la fuente de carbono (Monod, 1949).

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} \cdot C}{K_S + C} \cdot X \quad (3.1)$$

Donde:

- dX/dt es la velocidad de crecimiento de la célula (g/L*h);
- μ_{\max} es la velocidad máxima de crecimiento (h^{-1});
- K_S es un parámetro que representa la concentración de sustrato a la mitad de su velocidad máxima (g/L);
- X es la concentración de células (g/L);
- C es la concentración de sustrato (g/L).

Este modelo se simplifica en las siguientes condiciones particulares:

$$K_S \ll C \therefore \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot X \quad (3.2)$$

$$K_S \gg C \therefore \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{K_S} \cdot X \cdot C \quad (3.3)$$

Monod asumió que un único sustrato esencial es el factor limitante del crecimiento microbiano además que la ecuación no se puede aplicar a niveles bajos de sustrato y no toma en cuenta cambios de sustrato en las fases de latencia, estacionaria y de muerte. Si el crecimiento se ve inhibido por concentraciones altas de producto se deben añadir otros términos para tener en cuenta estos efectos (Monod, 1949).

- Modelo de Teisser

Modelo propuesto en 1936, previo al modelo de Monod y fundamentado en un punto de partida diferente al mismo, explicando el efecto de las hormonas en el crecimiento de ciertos cultivos. Este introdujo el concepto de deficiencia de crecimiento, hipótesis que resultó mostrando la relación semilogarítmica entre la velocidad de crecimiento y la concentración de biomasa. Este modelo relaciona la velocidad específica de crecimiento con la concentración de un sustrato limitante es la propuesta por (Tiessier, 1942):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left[1 - \exp\left(-\frac{C}{K_S}\right) \right] \cdot X \quad (3.4)$$

Donde:

- dX/dt es la velocidad de crecimiento de la célula (g/L*h);
- μ_{\max} es la velocidad máxima de crecimiento (h^{-1});
- K_s es un parámetro que representa la concentración de sustrato a la mitad de su velocidad máxima (g/L);
- X es la concentración de células (g/L);
- C es la concentración de sustrato (g/L).

Esta ecuación describe los mismos parámetros que la ecuación de Monod, aunque descritos de otra manera debido a la falta de consistencia con los datos experimentales por lo que se condujo a desarrollar ecuaciones alternas (Trejos, Alzate, & Gómez, 2009). Mientras la ecuación de Monod fue inspirada por la expresión de velocidad enzimática deducida por Michaelis-Menten, esta ecuación de Tessier es puramente empírica tomando un punto de partida diferente, es decir, utilizando el concepto de deficiencia de crecimiento (Atkinson, 2010).

- Modelo de Moser

Este modelo nació como una modificación al modelo de Monod también en 1958, y se considera como una buena aproximación cuando la composición celular es independiente del tiempo de proceso. Se caracteriza porque en su formulación, está implícita la consideración del efecto de la propagación de especies mutantes en la población bacteriana.

En la práctica, al estar en crecimiento bajo concentraciones reducidas de ciertos nutrientes, es posible que la población de microorganismos modifique su estructura genética con el fin de adaptarse a este tipo de situaciones y al convivir en la misma población diferentes tipos de células (mutadas y no mutadas), es posible que llegue a establecerse cierto grado de cooperación entre especies.

A consecuencia de todo ello, se produce una mejora en el proceso de reproducción celular. Moser propuso un nuevo modelo cinético empírico que incluye los efectos adaptativos y cooperativos de la población microbiana en su crecimiento mediante la adición de un parámetro "n" a la ecuación (Moser, 1958). La expresión matemática es la siguiente:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \cdot \frac{C^n}{C^n + K_s} \cdot X \quad (3.5)$$

Donde:

- dX/dt es la velocidad de crecimiento de la célula (g/L*h);
- μ_{\max} es la velocidad máxima de crecimiento (h^{-1});
- K_s es un parámetro que representa la concentración de sustrato a la mitad de su velocidad máxima (g/L);
- X es la concentración de células (g/L);
- C es la concentración de sustrato (g/L).

Esta ecuación mantiene la misma forma que la cinética de Monod, pero añade un parámetro “n” que si es mayor a 1 indica que dichos efectos se producen, mientras que para “n” igual a 1, el proceso se adapta a la cinética de Monod. Finalmente, un valor del parámetro inferior a 1 es sinónimo de efectos inhibitorios en el sistema (Moser, 1958).

3.4.4. Métodos matemáticos para la obtención de los parámetros de los modelos cinéticos de los procesos de biorremediación

Hay muchos casos en la ingeniería donde los modelos no lineales deben ajustarse a datos. En el presente contexto, tales modelos se definen como aquellos que tienen dependencia no lineal de sus parámetros. Por ejemplo:

$$f(x) = a_0(1 - e^{-a_1 x}) + e \quad (3.6)$$

Esta ecuación no puede ser manipulada para ser llevada a la forma general. Como en el caso de los mínimos cuadrados lineales, la regresión no lineal se basa en la determinación de los valores de los parámetros que minimizan la suma de los cuadrados de los residuos. Sin embargo, en el caso no lineal, la solución debe realizarse en una forma iterativa.

- Método de Gauss-Newton

El método de Gauss-Newton es un algoritmo para minimizar la suma de los cuadrados de los residuos entre los datos y las ecuaciones no lineales. El concepto clave detrás de esta técnica es que se utiliza una expansión en serie de Taylor para expresar la ecuación no lineal original en una forma lineal aproximada. Entonces, es posible aplicar la teoría de mínimos cuadrados para obtener nuevas estimaciones de los parámetros que se mueven en la dirección que minimiza el residuo.

Para ilustrar cómo se logra esto, primero se expresa de manera general la relación entre la ecuación no lineal y los datos, de la manera siguiente:

$$y_i = f(x_i; a_0, a_1, \dots, a_m) + e_i \quad (3.7)$$

Donde y_i = un valor medido de la variable dependiente, $f(x_i; a_0, a_1, \dots, a_m)$ = la ecuación que es una función de la variable independiente x_i y una función no lineal de los parámetros a_0, a_1, \dots, a_m , y e_i = un error aleatorio. Por conveniencia, este modelo se expresa en forma abreviada al omitir los parámetros:

$$y_i = f(x_i) + e_i \quad (3.8)$$

El modelo no lineal puede expandirse en una serie de Taylor alrededor de los valores de los parámetros y cortarse después de las primeras derivadas. Por ejemplo, para un caso con dos parámetros:

$$f(x_i)_{j+1} = f(x_i)_j + \frac{\partial f(x_i)_j}{\partial a_0} \Delta a_0 + \frac{\partial f(x_i)_j}{\partial a_1} \Delta a_1 \quad (3.9)$$

Donde j = el valor inicial, $j+1$ = la predicción, $\Delta a_0 = a_{0,j+1} - a_{0,j}$, y $\Delta a_1 = a_{1,j+1} - a_{1,j}$. De esta forma, se ha linealizado el modelo original con respecto a los parámetros. La ecuación 3.9 se sustituye en la ecuación 3.8 para dar:

$$y_i - f(x_i)_j = \frac{\partial f(x_i)_j}{\partial a_0} \Delta a_0 + \frac{\partial f(x_i)_j}{\partial a_1} \Delta a_1 + e_i \quad (3.10)$$

o en forma matricial:

$$\{D\} = [Z_j]\{\Delta A\} + \{E\} \quad (3.11)$$

donde $[Z_j]$ es la matriz de las derivadas parciales de la función evaluadas en el valor inicial j :

$$[Z_j] = \begin{bmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial a_0} & \frac{\partial f_1}{\partial a_1} \\ \frac{\partial f_2}{\partial a_0} & \frac{\partial f_2}{\partial a_1} \\ \vdots & \vdots \\ \frac{\partial f_n}{\partial a_0} & \frac{\partial f_n}{\partial a_1} \end{bmatrix} \quad (3.12)$$

donde n = el número de datos y $\partial f_i / \partial a_k$ = la derivada parcial de la función con respecto al k -ésimo parámetro evaluado en el i -ésimo dato. El vector $\{D\}$ contiene las diferencias entre las mediciones y los valores de la función:

$$\{D\} = \begin{Bmatrix} y_1 - f(x_1) \\ y_2 - f(x_2) \\ \vdots \\ y_n - f(x_n) \end{Bmatrix} \quad (3.13)$$

y el vector $\{\Delta A\}$ contiene los cambios en los valores de los parámetros:

$$\{\Delta A\} = \begin{Bmatrix} \Delta a_0 \\ \Delta a_1 \\ \vdots \\ \Delta a_m \end{Bmatrix} \quad (3.14)$$

Si se aplica la teoría de los mínimos cuadrados lineales a la ecuación 3.10 se obtienen las siguientes ecuaciones normales:

$$[Z_j]^T [Z_j] \{\Delta A\} = [Z_j]^T \{D\} \quad (3.15)$$

Así, el procedimiento consiste en resolver de la ecuación 3.14 para $\{\Delta A\}$, que se utiliza para calcular valores mejorados de los parámetros, como en:

$$a_{0,j+1} = a_{0,j} + \Delta a_0 \quad (3.16)$$

y

$$a_{1,j+1} = a_{1,j} + \Delta a_1 \quad (3.17)$$

Este procedimiento se repite hasta que la solución converge, es decir, hasta que está por debajo de un criterio de terminación aceptable.

$$|\varepsilon_a|_k = \left| \frac{a_{k,j+1} - a_{k,j}}{a_{k,j+1}} \right| \quad (3.18)$$

Un problema potencial con el método de Gauss-Newton, como se ha desarrollado hasta ahora, es que las derivadas parciales de la función pueden ser difíciles de evaluar. En consecuencia, muchos programas computacionales usan diferentes ecuaciones para aproximar las derivadas parciales. Un método es:

$$\frac{\partial f_i}{\partial a_k} \cong \frac{f(x_i; a_0, \dots, a_k + \delta a_k, \dots, a_m) - (x_i; a_0, \dots, a_k, \dots, a_m)}{\delta a_k} \quad (3.19)$$

donde δ = una perturbación fraccional pequeña.

El método de Gauss-Newton tiene también algunas desventajas:

- Puede converger con lentitud.
- Puede oscilar ampliamente; es decir, cambia de dirección continuamente.
- Puede no converger.

Se han desarrollado modificaciones del método para disminuir las desventajas. Para hacer esto, se dan valores iniciales a los parámetros y se calcula la suma de los cuadrados de los residuos. Por ejemplo, para la ecuación 3.6 esto se podría calcular como:

$$S_r = \sum_{i=1}^n [y_i - a_0(1 - e^{-a_1 x_i})]^2 \quad (3.20)$$

Los parámetros, entonces, se ajustarían de manera sistemática para minimizar S_r mediante técnicas de búsqueda.

- Métodos de Runge-Kutta de cuarto orden-Berkeley Madonna

Se utiliza el ajustador de curvas (Curve Fitter) de Berkeley Madonna que este puede encontrar automáticamente los valores de uno o más parámetros en el modelo que minimizan la desviación entre la salida de su modelo y un conjunto de datos. Cuando se completa el ajuste, Berkeley Madonna deja los parámetros establecidos en los valores que dan el mejor ajuste. Luego ejecuta el modelo y traza la variable de ajuste y el conjunto de datos en una ventana de gráfico.

Mientras el ajuste de la curva está en progreso, Berkeley Madonna muestra la desviación RMS entre los datos y la mejor ejecución hasta el momento. La desviación es la raíz cuadrada de las diferencias entre los puntos de datos individuales en el conjunto de datos y los puntos correspondientes en la ejecución. Cuando se complete la operación de ajuste de la curva, Berkeley Madonna informa la desviación del valor cuadrático medio (RMS) del mejor ajuste en un cuadro de diálogo en el gráfico.

Berkeley Madonna proporciona tres métodos de integración de tamaño de paso fijo para el ajuste de curvas y resolución de las ecuaciones diferenciales: el método de Euler, RungeKutta 2 y Runge-Kutta 4. Estos métodos escalonan el modelo en incrementos de DT. El número de pasos (sin incluir el paso de inicialización) es igual a: (STOPTIME - STARTTIME)/DT. El algoritmo que utiliza el programa es el método clásico RK de cuarto orden:

$$y_{i+1} = y_i + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \cdot h \quad (3.21)$$

Donde:

$$k_1 = f(x_i, y_i) \quad (3.22)$$

$$k_2 = f\left(x_i + \frac{1}{2}h, y_i + \frac{1}{2}k_1h\right) \quad (3.23)$$

$$k_3 = f\left(x_i + \frac{1}{2}h, y_i + \frac{1}{2}k_2h\right) \quad (3.24)$$

$$k_4 = f(x_i + h, y_i + k_3h) \quad (3.25)$$

Es decir, se desarrolla primero las pendientes para todas las variables en el valor inicial. Esas pendientes (un conjunto de las k_1) se utilizarán después para realizar predicciones de la variable dependiente en el punto medio del intervalo. Tales valores del punto medio se utilizan, a su vez, para calcular un conjunto de pendientes en el punto medio (las k_2).

Esas nuevas pendientes se vuelven a usar en el punto de inicio para efectuar otro conjunto de predicciones del punto medio que lleven a nuevas predicciones de la pendiente en el punto medio (las k_3). Éstas después se emplearán para realizar predicciones al final del intervalo que se usarán para desarrollar pendientes al final del intervalo (las k_4). Por último, las k se combinan en un conjunto de funciones incrementadas [como en la ecuación (3.21)] y se llevan de nuevo al inicio para hacer la predicción final.

3.5. Elementos del diseño de experimentos

El diseño de experimentos (DOE) ayuda a investigar los efectos de las variables de entrada (factores) en una variable de salida (respuesta) al mismo tiempo. Estos experimentos consisten en una serie de ensayos o pruebas, en las que se realizan cambios intencionales en las variables de entrada. En cada corrida se recolectan datos. El DOE se utiliza para identificar las condiciones del proceso y los componentes del producto que afectan la calidad, para luego determinar la configuración de factores que optimiza los resultados.

3.5.1. Diseños factoriales

El objetivo de un diseño factorial es estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores. Por ejemplo, uno de los objetivos particulares más importantes que en ocasiones tiene un diseño factorial es determinar una combinación de niveles de los factores en la que el desempeño del proceso sea mejor.

Los factores pueden ser de tipo cualitativo (máquinas, tipos de material, operador, la presencia o ausencia de una operación previa, etc.), o de tipo cuantitativo (temperatura, humedad, velocidad, presión, etc.). Para estudiar la manera en que influye cada factor sobre la variable de respuesta es necesario elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos.

Con el diseño factorial completo se corren aleatoriamente todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar. Así, la matriz de diseño o arreglo factorial es el conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores. Entre las ventajas de los diseños factoriales están:

1. Permiten estudiar el efecto individual y de interacción de los distintos factores.
2. Son diseños que se pueden aumentar para formar diseños compuestos en caso de que se requiera una exploración más completa.
3. Se pueden correr fracciones de diseños factoriales, las cuales son de gran utilidad en las primeras etapas de una investigación que involucra a muchos factores, cuando interesa descartar de manera económica los que no son importantes, antes de hacer un estudio más detallado con los factores que sí son importantes.
4. Pueden utilizarse en combinación con diseños de bloques en situaciones en las que no puede correrse todo el diseño factorial bajo las mismas condiciones.

5. La interpretación y el cálculo de los efectos en los experimentos factoriales se puede hacer con aritmética elemental, en particular cuando cada factor se prueba en dos niveles.

- Diseños factoriales con tres factores

Cuando se quiere investigar la influencia de tres factores (A, B y C) sobre una o más variables de respuesta, y el número de niveles de prueba en cada uno de los factores es a, b y c, respectivamente, se puede construir el arreglo factorial $a \times b \times c$, que consiste de $a \times b \times c$ tratamientos o puntos experimentales. Entre los arreglos de este tipo que se utilizan con frecuencia en aplicaciones diversas se encuentran: el factorial 2^3 , el factorial 3^3 y los factoriales mixtos con no más de cuatro niveles en dos de los factores, por ejemplo, el factorial $4 \times 3 \times 2$ y el factorial $4 \times 4 \times 2$, por mencionar dos de ellos.

En un diseño factorial $a \times b \times c$, se supone que el comportamiento de la respuesta Y puede describirse mediante el modelo de efectos dado por:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (3.26)$$

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, c; l = 1, 2, \dots, n$$

donde μ es la media general, α_i es el efecto del nivel i -ésimo del factor α , β_j es el efecto del nivel j del factor β y γ_k es el efecto del nivel k en el factor C; $(\alpha\beta)_{ij}$, $(\alpha\gamma)_{ik}$ y $(\beta\gamma)_{jk}$ representan efectos de interacción dobles (de dos factores) en los niveles ij , ik , jk , respectivamente, y $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ es el efecto de interacción triple en la combinación o punto ijk ; ε_{ijkl} representa el error aleatorio en la combinación $ijkl$ y l son las repeticiones o réplicas del experimento. Todos los efectos cumplen la restricción de sumar cero, es decir, son desviaciones relacionadas con la media general μ . De manera alternativa, se tiene el modelo de regresión dado por:

$$Y_{ijkl} = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2j} + \beta_3 X_{3k} + \beta_{12} X_{1i} X_{2j} + \beta_{13} X_{1i} X_{3k} + \beta_{23} X_{2j} X_{3k} + \beta_{123} X_{1i} X_{2j} X_{3k} + \varepsilon_{ijkl};$$

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, c; l = 1, 2, \dots, n$$

Con esta información se construye el análisis de varianza y de este se concluye si los tres efectos influyen o no. Posteriormente se realiza las comparaciones de medias para investigar cuáles medias causan las diferencias detectadas.

IV. Metodología

La presente investigación estuvo orientada a explicar los mecanismos cinéticos que gobiernan el proceso de biodegradación de hidrocarburos bajo la acción de consorcios microbianos en solución acuosa, de tal forma que se pueda pronosticar las velocidades de crecimiento de los microorganismos así como la velocidad de consumo del sustrato limitante, en el presente caso, el diésel, que actúa como única fuente de energía y carbono, así como la duración del tratamiento aplicado y la eficiencia alcanzada en la fase estacionaria del proceso de biodegradación.

Considerando estos enfoques, esta investigación, correspondió a una investigación descriptiva, explicativa y proyectiva. Por otra parte, la estrategia general para la recolección de datos e información en función de los objetivos propuestos está dirigida a un diseño de campo, experimental, transeccional y descriptivo.

El universo de esta investigación está compuesto por:

- El proceso de biodegradación de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos.
- Los consorcios bacterianos objetos de estudio.
- El sustrato limitante, en este caso, el diésel, que es la sustancia contaminante objeto de estudio.
- Los modelos cinéticos que se describen y se ajustan al proceso de biodegradación.
- Los parámetros operacionales que gobiernan el proceso de biodegradación de hidrocarburo entre los que están i) el tipo de consorcio microbiano, ii) la concentración del sustrato limitante, iii) la temperatura en la que ocurre el proceso de biorremediación.

4.1. Métodos y procedimiento para la determinación del comportamiento cinético del consorcio microbiano durante su crecimiento utilizando diésel como única fuente de energía y carbono

De previo a esta etapa de investigación se han aislado y obtenido tres consorcios bacterianos, los cuales se han identificado como Consorcio A, Consorcio B y Consorcio C, todos ellos adaptados al consumo de diésel como única fuente de carbono y energía, capaces de degradar a este hidrocarburo. Así mismo se ha realizado la caracterización de las comunidades bacterianas que integran estos consorcios obtenidos, la cual se presenta en el Anexo X.

4.1.1. Determinación de la concentración de biomasa

Para la determinación del comportamiento cinético del consorcio microbiano durante su crecimiento en sustrato diésel como única fuente de energía y carbono, fue necesario la determinación de la concentración de biomasa con respecto al tiempo. Esta actividad se realizó en los Laboratorios de Ingeniería del Departamento de Investigación y Desarrollo de la Empresa ARS Construcciones, Energía y Medio Ambiente, midiendo la densidad óptica (DO) y sólidos volátiles (SV) del cultivo mediante espectrofotometría a 600 nm, eliminando la turbidez correspondiente al medio de cultivo sin inóculo con la realización de blancos en un espectrofotómetro Modelo Pharma Spec 1700. Los datos obtenidos para la densidad óptica y la concentración de sólidos volátiles se presentan en la Tabla 4.1, con cuyos valores se construyó la curva de calibración para este espectrofotómetro, que se presenta en la Figura 6.1.

Tabla 4.1: Relación entre DO y SV para determinación de la concentración de biomasa, $g_{células}/L$

DO	SV ($g_{células}/L$)
0	0
1.55	798
2.45	1485
3.15	1825
3.7	2125
4.15	2550
4.95	3125

En el Anexo VIII se presenta detalladamente los métodos y procedimientos para la determinación de las concentraciones de biomasa para cada uno de los tres consorcios en dependencia del tiempo.

4.1.2. Determinación de la concentración de hidrocarburos

La medida de la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (TPH), en el presente caso la fracción de diésel, ha sido, el parámetro analítico utilizado en estos experimentos para establecer la capacidad de degradación de hidrocarburos por los microorganismos presentes en el consorcio.

El Personal de los Laboratorios de Ingeniería del Departamento de Investigación y Desarrollo de la Empresa ARS Construcciones, Energía y Medio Ambiente, realizó la respectiva toma de muestras y observando la cadena de custodia, se envió a los Laboratorios de Pace Analytical Services, New Orleans en Estados Unidos de Norteamérica, en donde se realizó la determinación de la concentración de TPH, mediante cromatografía gaseosa en un cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific).

En el Anexo VIII, se presenta detalladamente los métodos y procedimientos para la determinación de las concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo para cada uno de los tres consorcios en dependencia del tiempo.

4.2. Métodos y procedimientos para el establecimiento de la influencia de los parámetros operacionales: Tipo de consorcio, concentración del sustrato y la temperatura

En la siguiente etapa de esta investigación, se procedió al establecimiento de la influencia del tipo de consorcio, de la concentración del sustrato y de la temperatura en el desarrollo de la reacción bioquímica para la producción de biomasa y el consumo de hidrocarburos contaminantes. Para ello se llevaron a cabo las corridas necesarias de experimentos discontinuos de biodegradación in vitro con los tres tipos de consorcios: consorcio A, consorcio B y consorcio C, de previo aislados de los emplazamientos de suelos contaminados y adaptados al consumo de diésel.

Siendo las variables independientes: el tipo de consorcio, la temperatura y la concentración inicial del sustrato, en tanto las variables respuestas fueron la concentración de biomasa (Microorganismo) y la concentración final del sustrato (Diésel). Se estudió la influencia de tres temperaturas de reacción: 25, 30 y 35 °C, todas dentro del rango para microorganismos mesófilos, para analizar la dependencia de la producción de biomasa relacionado con el crecimiento de los consorcios microbianos capaces de degradar hidrocarburos.

A su vez, se estudió la influencia de la concentración inicial (C_0) de diésel con tres concentraciones distintas: 0.5, 1 y 3 % en volumen. No obstante, para los consorcios B y C a las temperaturas de 25, 30 y 35 °C, no se logró observar crecimiento microbiano, de igual manera, para el consorcio A, a temperatura de 25 y 35 °C, y a una concentración inicial del 0.5% de diésel para una temperatura de 30°C no se registra el crecimiento de los microorganismos.

4.3. Métodos y procedimientos aplicados para la definición de modelos cinéticos que describen el proceso de degradación de hidrocarburos en suspensión acuosa

Para el desarrollo y definición de los modelos cinéticos que describen los procesos de degradación in vitro de hidrocarburos por la acción del consorcio microbiano, se asumieron las siguientes consideraciones:

- El sistema estudiado, se modela como un fermentador discontinuo de tanque agitado de mezcla perfecta.
- Este sistema se alimenta inicialmente con un medio de cultivo específico y una concentración determinada de sustrato limitante (C_0).
- Se agrega el inoculo inicial en el reactor de mezcla perfecta, el cual se distribuye homogéneamente, alcanzando una concentración inicial de X_0 .

- En seguida, se inicia una reacción bioquímica al entrar en contacto el consorcio bacteriano (inoculo inicial) con el sustrato limitante (diésel). Una vez iniciada la reacción, las concentraciones de biomasa y de sustrato cambian con el tiempo hasta la situación final.
- Las variaciones en las concentraciones de sustrato, $C(t)$, y de biomasa, $X(t)$, se producen por la ocurrencia de los distintos procesos microbiológicos que ocurren tales como crecimiento y muerte celular, consumo de sustrato para diferentes fines (crecimiento celular, mantenimiento celular y formación de productos) y metabolismo endógeno.

Se propusieron tres modelos matemáticos para la descripción del comportamiento cinético del proceso de biodegradación de los hidrocarburos que son:

- El modelo de Monod
- El modelo de Teisser
- El modelo de Moser

Para la obtención y selección del modelo cinético propiamente dicho, se formularon los balances de masa para la biomasa formada, compuesta por los microorganismos del consorcio bacteriano y el balance de masa del consumo de sustrato, empleando las ecuaciones de diseño propuestas por Lawrence y McCarty (1970), aplicándoselas a cada uno de los tres modelos propuestos:

Balance de biomasa

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - K_d X \quad (4.1)$$

Balance de sustrato

$$-\left(\frac{dC}{dt}\right) = \mu X \left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right) + q_p X \left(\frac{1}{Y_{p/s}}\right) + m_s X \quad (4.2)$$

Donde:

- X es la concentración de biomasa ($g_{\text{células}}/L$);
- C es la concentración de diésel (g_{TPH}/L);
- K_d es la constante cinética de muerte celular ($1/h$);
- q_p es la constante cinética de formación de producto ($1/h$);
- m_s es la constante cinética de mantenimiento celular ($g_{\text{TPH}}/g_{\text{células}} h$);
- $Y_{X/S}$ es el rendimiento en masa celular de sustrato ($g_{\text{células}}/g_{\text{TPH}}$);
- $Y_{P/S}$ es el rendimiento en producto de un sustrato ($g_{\text{producto}}/g_{\text{TPH}}$);
- μ es la constante cinética de crecimiento ($1/h$).

Siendo:

- Monod

$$\mu = \mu_{max} \frac{C}{K_S + C} \quad (4.3)$$

- Teisser

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \exp\left(\frac{-C}{K_S}\right)\right) \quad (4.4)$$

- Moser

$$\mu = \mu_{max} \frac{C^n}{K_S + C^n} \quad (4.5)$$

Donde:

- μ_{max} es la velocidad máxima de crecimiento (1/h)
- K_S es la constante de semisaturación (g_{TPH}/L).
- C es la concentración de sustrato (g_{TPH}/L).

Para la estimación de los parámetros cinéticos de los modelos propuestos se empleó el método de ajuste de curva no lineal, usando el Método de Mínimos Cuadrados para modelos no lineales, usando el Método Gauss-Newton, para minimizar la función.

$$\psi(p) = \sum_{i=1}^n ((X_{exp,i} - X_i(p))^2 + (C_{exp,i} - C_i(p))^2) \quad (4.6)$$

siendo n , el número de datos experimentales; $X_{exp,i}$ y $C_{exp,i}$, los valores experimentales de concentración de biomasa y sustrato medidas a tiempo t_i ; $X_i(p)$ y $C_i(p)$, los valores de concentración calculados por el modelo, correspondientes a la medición i . Los modelos cinéticos propuestos y los métodos matemáticos empleados para la obtención de los parámetros cinéticos de cada modelo y su solución se han presentado en los acápites 3.4.3 y 3.4.4. del presente trabajo de investigación.

Para la el desarrollo de estos modelos, se realizó un Programa en Matlab, basado en el algoritmo de Newton Gauss para modelos no lineales y determinar los parámetros de los modelos cinéticos seleccionados conforme el Método de Mínimos Cuadrados. También se verificaron estos resultados utilizando el Programa Berkeley Madonna para la determinación de los parámetros cinéticos de las ecuaciones que describen los procesos de biodegradación del diésel in vitro, basados en el algoritmo de solución de ecuaciones diferenciales de Runge Kutta.

4.4. Determinación de la eficiencia de degradación de hidrocarburos en suspensión acuosa por el consorcio microbiano aplicado

La eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa por el consorcio microbiano aplicado se expresa en porcentaje y se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$Eficiencia (\%) = \frac{CTPH_0 - CTPH_f}{CTPH_0} * 100 \quad (4.7)$$

Donde:

- $CTPH_0$: es la concentración de los hidrocarburos totales al inicio del ensayo.
- $CTPH_f$: es la concentración de hidrocarburos totales al establecerse el estado estacionario del proceso de biodegradación.

V. Hipótesis

El comportamiento cinético de la biodegradación de hidrocarburos se ajusta a los modelos no estructurado-no segregados.

VI. Análisis y discusión de los resultados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos, al realizar las distintas pruebas y ensayos en el laboratorio. En las cuales se ha estudiado la biodegradación de diésel en suspensión acuosa, de manera que, a través de un análisis exhaustivo, se puedan comprender ampliamente el alcance de dichos experimentos. Los algoritmos de solución de los modelos matemáticos propuestos y los programas empleados para establecer los modelos cinéticos del proceso de biodegradación, se presentan en la sección de Anexos.

6.1. Comportamiento cinético del consorcio microbiano durante su crecimiento utilizando diésel como única fuente de energía y carbono

Para el comportamiento cinético del consorcio microbiano se realizaron las medidas correspondientes de la concentración de biomasa y la concentración de hidrocarburos. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

6.1.1. Medida de la concentración de biomasa

Con los resultados obtenidos en las mediciones DO y SV en el laboratorio, presentados en la Tabla 4.1 se presentan los datos obtenidos para establecer la curva de calibración del Espectrofotómetro Modelo Pharma Spec 1700 Marca Shimadzu, en el cual, para cada valor de DO, le corresponde un valor de SV. Usando la Hoja de Cálculo Electrónico de Excel, basado en la regresión lineal, se obtuvo la ecuación de calibración que relaciona a estos dos parámetros, para determinar la concentración de biomasa de los microorganismos en cada momento de tiempo de medición, lo cual se presenta en la Figura 6.1.

En la Figura 6.2, se muestra la curva del comportamiento del crecimiento de los consorcios microbianos: A, B y C, donde se puede observar que la fase de crecimiento exponencial comienza a perfilarse a las 20 horas de iniciado el experimento y termina aproximadamente a las 40 horas para los tres consorcios. Esto sugiere que debe efectuarse un proceso de re-inoculación, al finalizar esta fase. De igual manera los resultados muestran que el consorcio A alcanza su fase estacionaria hasta 140 horas en cambio el consorcio B lo alcanza hasta las 60 horas, y el consorcio C hasta las 100 horas de experimentación, siendo estos dos los que menos microorganismos crecen. En el Anexo II, se muestra la tabla de las concentraciones de biomasa para cada uno de los consorcios en estudio.

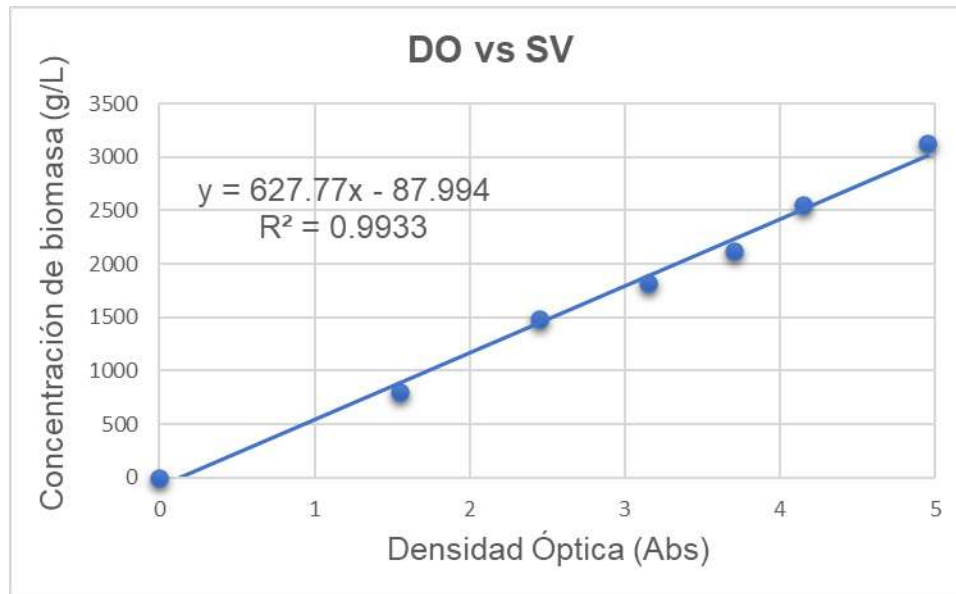


Figura 6.1: Recta de calibrado que relaciona la DO con la concentración de biomasa presente en el cultivo.

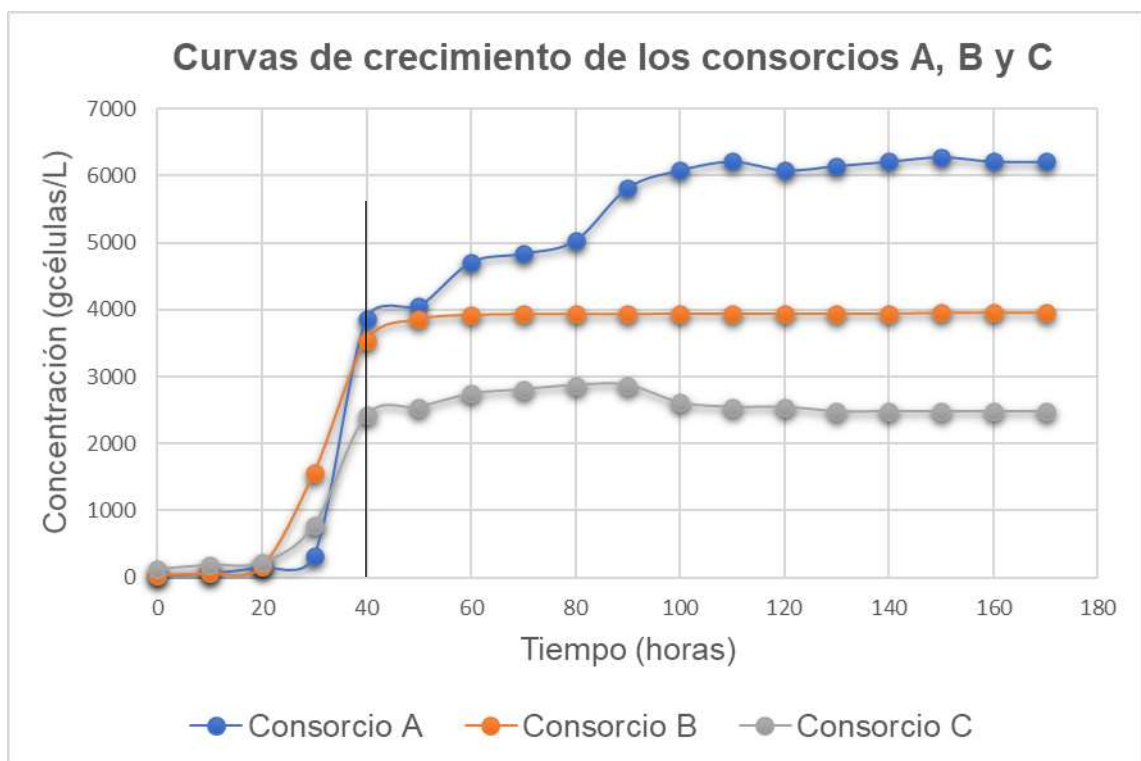


Figura 6.2: Curva de crecimiento para cada uno de los consorcios en estudio.

6.1.2. Medida de la concentración de TPH

La evolución de la biodegradación de diésel se determinó mediante medidas de la concentración de los TPH presentes en el medio de cultivo en distintos momentos

del experimento. Para cuantificar los TPH presentes en las muestras se realizó una recta de calibrado a distintas concentraciones de diésel en n-hexano, de tal manera que por interpolación de las áreas cromatográficas fue posible conocer la concentración real de las muestras analizadas.

6.2. Influencia del tipo de consorcio, la concentración del sustrato y la temperatura en el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro

A continuación, se presenta la influencia de tipo de consorcio, la concentración del sustrato y la temperatura en el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro.

6.2.1. Influencia del tipo de consorcio

De tres emplazamientos distintos de suelos contaminados, se obtuvieron las técnicas de aislamiento, siembra, identificación, selección, antagonismo y estabilización, tres consorcios nombrados como A, B y C.

El análisis de composición microbiana de cada consorcio estableció que, una de las especies identificadas (*Staphylococcus lentus*) apareció en todos los consorcios analizados y dos especies se repitieron para los consorcios A y B (*Stenotrophomonas maltophilia* y *Pseudomonas fluorescens*). Encontrar estas especies en los consorcios no resulta extraño debido a su frecuente presencia en los suelos y, sobre todo, en aquellos que presentan algún tipo de contaminación. Es de destacar que más del 75% de las bacterias identificadas son Gram Negativas, que parecen encontrarse más adaptadas a los hidrocarburos como fuente de carbono.

Por otro lado, el género *Pseudomonas* (presente en los consorcios A y B) es conocido por su alto potencial de degradación de hidrocarburos y el resto de bacterias identificadas en los consorcios, entre las más comunes cabe destacar *Burkholderia cepacia* y *Sphingomonas paucimobilis* (presente en el consorcio A), también con alto potencial de degradación de hidrocarburos.

Las bacterias del género *Pseudomonas* poseen la habilidad de utilizar diversos sustratos, incluyendo aquellos creados por petróleo. La *Pseudomonas fluorescens* es degradadora de naftaleno y fenantreno, ventaja que tiene frente a las otras especies, estas son los microorganismos más aislados en la fase de degradación de los hidrocarburos totales de petróleo.

Estas son consideradas como el componente ideal de los consorcios de degradación de los hidrocarburos debido a que descomponen estos a compuestos más sencillos debido a la producción de compuestos pirocianina y ramnolipidos que ayudan a aislar el petróleo y lo hacen más sencillo de eliminar, pero estas no se reproducen a temperatura mayores de 35 °C.

Las especies del consorcio A pertenecen al mismo género, las Gram Negativas, es decir, son microorganismos que suelen acoplarse en cualquier tipo de medio ambiente bacteriano a temperaturas mesófilas (25-37 °C). Otra característica de ellas, es que al pertenecer al mismo grupo de especies tienen un gran poder de adaptación entre sí y esto ayuda a metabolizar contaminantes de bajo y alto peso molecular. Esta característica se le atribuye a la formación de biopelículas, ya que estas permiten a las células vivir en estrecha asociación unas con otras, es decir, ayuda a aumentar la supervivencia de los microorganismos retrasando la penetración de moléculas tóxicas.

También este tipo de bacterias crean una membrana externa que les permite impermeabilizar a la célula, intercambiar sustancias con el medio y producir proteínas específicas y surfactantes para degradar hidrocarburos. Su diversidad nutricional y por lo tanto su dotación enzimática, hace de estas bacterias un grupo importante ecológicamente, dado que son probablemente responsables de la degradación aeróbica de muchos compuestos en los diferentes ecosistemas, algunos de ellos tóxicos para otros organismos acompañantes.

La *Pseudomonas* juega un papel importante dentro del consorcio A, ya que se utiliza potencialmente en la biorremediación de áreas contaminadas por altas concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo; esta característica es un criterio vital para el éxito de la biorremediación de ambientes altamente contaminados.

En cambio, con el consorcio B, contienen dos grupos de familias, las gram negativas y gram positivas, donde estas comparten distintas características haciendo disminuir la concentración de los microorganismos de gran potencial de degradación. Con respecto al consorcio C, contiene microorganismos del consorcio A, pero no a su principal bacteria (*Pseudomonas*) degradadora, lo que hace disminuir el crecimiento y las condiciones de adaptación y supervivencia en el sustrato.

Las características y propiedades de las distintas especies que integran cada uno de los consorcios estudiados, explican su comportamiento en las condiciones de concentración del sustrato y la temperatura en que ocurrió el proceso de biodegradación de hidrocarburos. En el periodo de estudio para el crecimiento de microorganismos, los consorcios B y C no hubo crecimiento a las distintas condiciones, es decir, los microorganismos de estos consorcios no lograron adaptarse al consumo de diésel como única fuente de energía y carbono.

6.2.2. Influencia de la temperatura

La temperatura es uno de los parámetros más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Como se sabe, cada microorganismo tiene una temperatura mínima, óptima y máxima de crecimiento. A la temperatura óptima se alcanza la mayor velocidad de crecimiento de un microorganismo. Cuanto más distante de esa temperatura óptima sea la

temperatura de almacenamiento menor será la velocidad de crecimiento y por lo tanto más lentamente se multiplicará ese microorganismo.

Se llevaron a cabo las corridas de experimentos de biodegradación in vitro con cada tipo de consorcio y con concentraciones de sustrato inicial de 0.5, 1 y 3 % (v/v) tomando en cuenta la influencia de la temperatura: 25, 30 y 35 °C, en la cual se observó que a 25°C no crecieron los microorganismos y a 35°C los microorganismos mueren.

La ausencia de crecimiento microbiano a estas dos temperaturas (25 y 35 °C), se explica con la existencia de condiciones no favorables que limitan el proceso de crecimiento debido a la destrucción térmica de las proteínas o simplemente porque las bacterias requieren otros tipos de factores de crecimiento a altas y bajas temperaturas. Teniendo esto en cuenta, la presente investigación hace referencia a los resultados obtenidos a una temperatura de 30°C.

6.2.3. Influencia de la concentración de sustrato

Se trabajó con las concentraciones del 0.5, 1 y 3 % (v/v) de diésel, pero a una concentración inicial de sustrato del 0.5% (v/v) y a una temperatura de 30°C los microorganismos inhiben su crecimiento, por ende, no se lograron registros de crecimiento en estas condiciones.

En cambio, a una temperatura a 30°C y con concentraciones iniciales de 1 y 3 % (v/v) de sustrato, se obtuvieron las concentraciones de biomasa e hidrocarburos a tiempos espaciados donde se puede observar que el crecimiento de los microorganismos aumenta mientras que la concentración de diésel disminuye. A una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel, el experimento se llevó hasta las 200 horas de tratamiento y con una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel, el experimento se llevó a cabo hasta 250 horas, esto debido a la eficiencia del consorcio utilizado.

Como se puede observar en la figura 6.3, el crecimiento de microorganismos permaneció constante desde un tiempo de experimentación de 80 horas, es decir, los microorganismos no se reproducen, esto debido al agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos en su metabolismo. De igual manera sucede en el segundo experimento a una concentración del 3% (v/v) de diésel, figura 6.4 que, desde un tiempo de 90 horas, la concentración de biomasa permanece en la fase estacionaria.

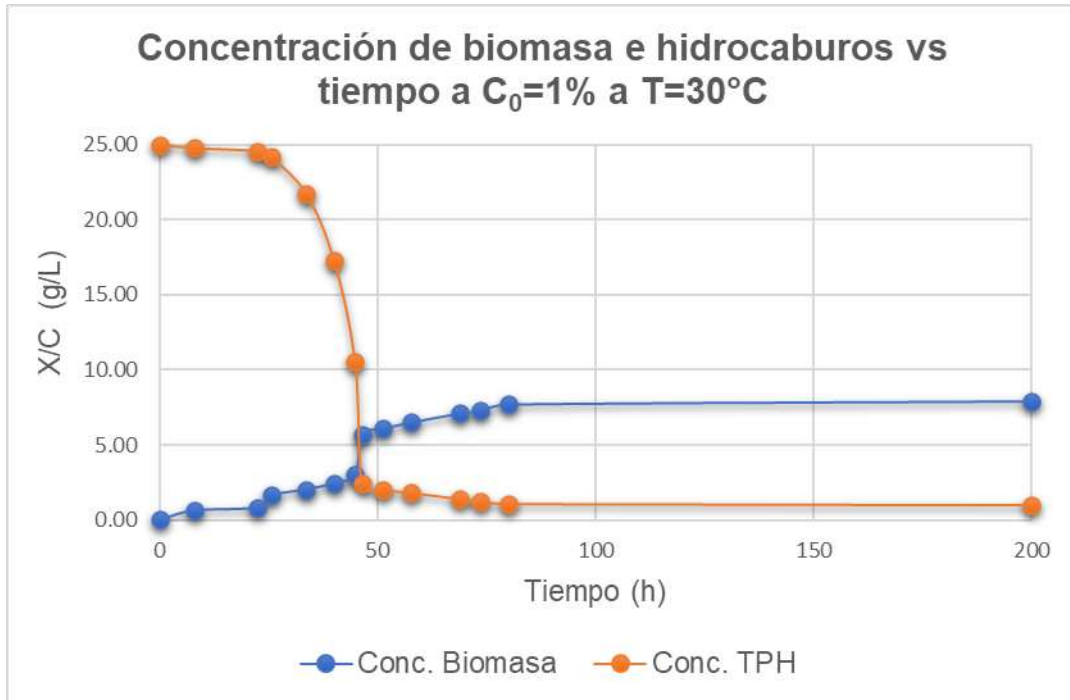


Figura 6.3: Valores experimentales de la concentración de biomasa e hidrocarburos con el tiempo a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel.

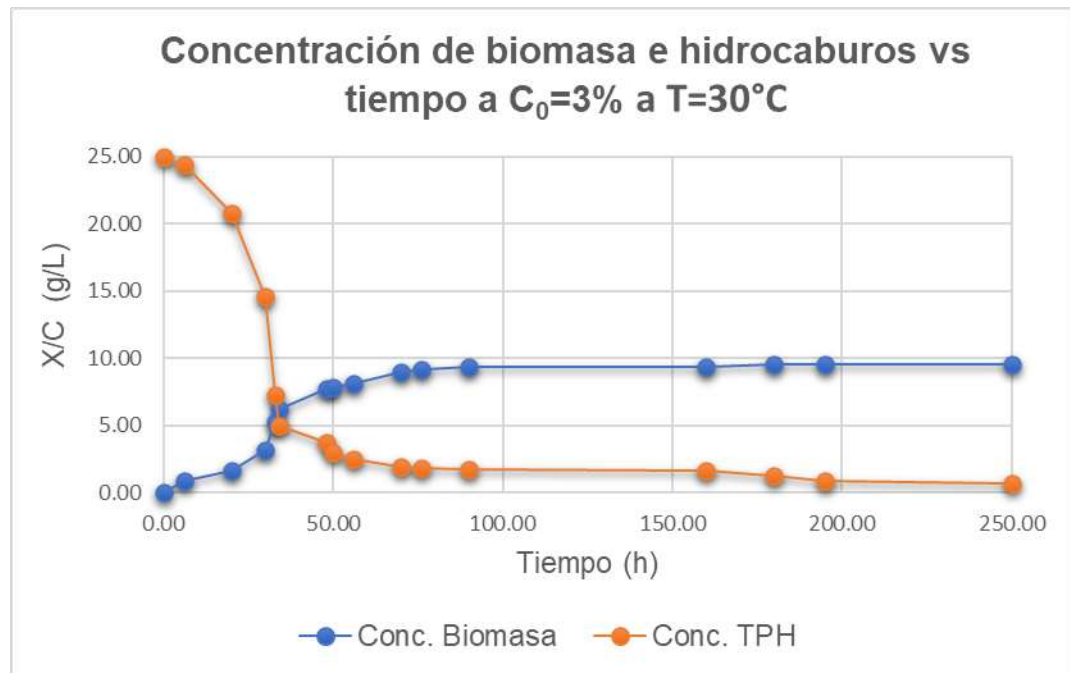


Figura 6.4: Valores experimentales de la concentración de biomasa e hidrocarburos con el tiempo a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel.

Inicialmente las mediciones de la concentración de biomasa e hidrocarburos, se realizaron a intervalos de tiempo de diferentes magnitudes, no obstante al sustituir

los datos experimentales en los modelos ajustados, se obtenían comportamientos anómalos, por lo que se realizaron nuevas mediciones de las concentraciones de biomasa e hidrocarburos, a intervalos de tiempos iguales, (con un intervalo de 5 horas) para obtener modelos cinéticos que puedan describir los comportamientos cinéticos del proceso de biodegradación de hidrocarburos usando consorcios nativos in vitro.

En las figuras 6.5 y 6.6, se presentan los resultados de las nuevas mediciones, en los que se observa que la concentración de biomasa teniendo al diésel como única fuente de energía y carbono, aumenta mientras que la concentración de diésel disminuye con el tiempo, mostrándose que a una concentración inicial de sustrato del 1% (v/v) de diésel (figura 6.5), la mayor reducción correspondió al intervalo de tiempo de 30 a 50 horas.

Por otro lado, para una concentración inicial de sustrato del 3% (v/v) de diésel, su mayor reducción correspondió con la fase exponencial del crecimiento bacteriano (figura 6.6) hasta un tiempo de 50 horas. Este rápido consumo de diésel por el consorcio utilizado podría estar relacionado con la fase de aclimatación observada en ambos experimentos realizados.

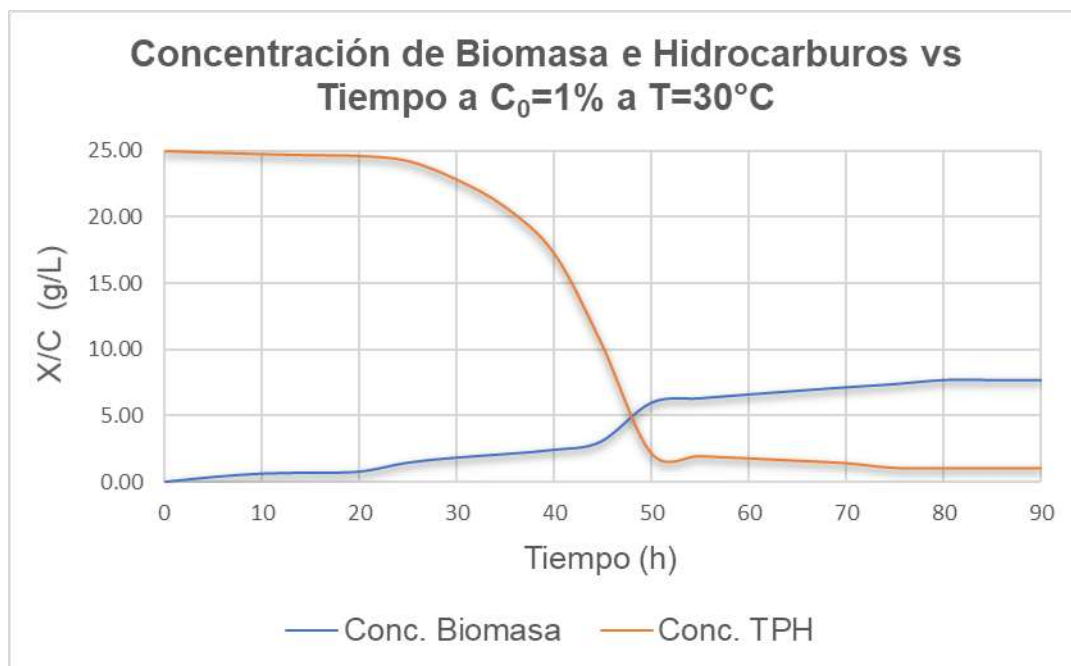


Figura 6.5: Valores experimentales corregidos de la concentración de biomasa e hidrocarburos con el tiempo a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel.

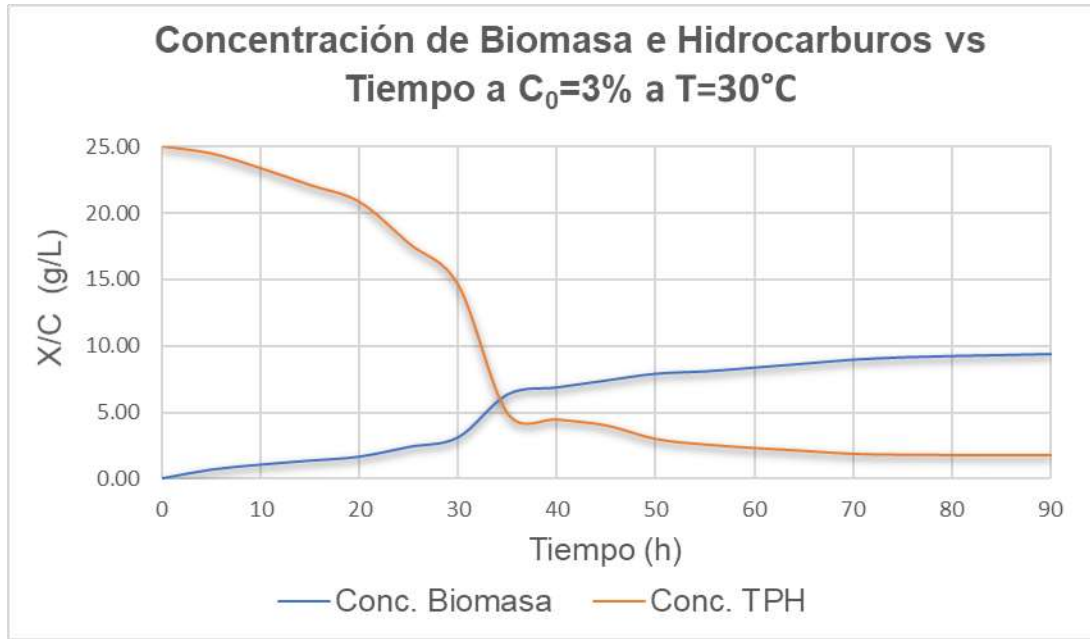


Figura 6.6: Valores experimentales corregidos de la concentración de biomasa e hidrocarburos con el tiempo a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel.

En cualquiera de los experimentos realizados (C₀=1 y 3% v/v) puede observarse que después de 50 horas de tratamiento, se produjo una cantidad pequeña de disminución de la concentración de diésel, este tiempo de experimentación corresponde con la fase estacionaria, etapa en la que el sustrato es consumido solo para mantenimiento celular, dejando una concentración residual (I₀) en el medio.

Algunos autores han propuesto modificaciones del modelo de Monod en donde el valor residual se le resta al valor de la concentración de sustrato (Giraldo-Gomez, E; Goodwin, S; Switzenbeum, M, 1992) de acuerdo con:

$$\mu = \mu_{max} \frac{C - I_0}{K_S + C - I_0} \quad (6.1)$$

Esto implica que el crecimiento es nulo cuando la concentración de sustrato equivale a I₀ y máximo cuando la concentración de sustrato es elevada. Para valores intermedios de concentración este modelo permite respetar el modelo de Monod. En esta investigación se ha observado la aparición de una concentración residual de diésel degradado, por lo que en las ecuaciones del modelo planteado se ha tenido en cuenta este parámetro.

6.3. Modelo cinético que describe el proceso de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa

Con el fin de seleccionar y obtener un modelo cinético, se evaluó la cinética de crecimiento en tres modelos propuesto. Como se comentó en el acápite 6.2, los datos utilizados en este punto fueron los que se obtuvieron a intervalos de tiempos

igual (cada 5 horas) para obtener un comportamiento que pueda ser descrito por los modelos propuestos.

Se considero como hipótesis de cálculo que toda la reacción transcurre durante la fase de crecimiento exponencial, es decir, que en la ecuación 4.1, el parámetro cinético K_d (muerte celular) se considera existente pero insignificante frente al crecimiento. A su vez, la ecuación 4.2 se pueden despreciar los dos últimos términos, asumiendo que el consumo de sustrato se debe principalmente al crecimiento bacteriano.

Por lo tanto, las ecuaciones 4.1 y 4.2, quedaron de la siguiente manera:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (6.2)$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \quad (6.3)$$

Introduciendo a la ecuación de los balances la constante cinética y sustituyendo las diferenciales por incrementos finitos se puede despejar las concentraciones de biomasa y sustrato teóricos en cada instante (t_i) para cada modelo propuesto:

- Modelo de Monod

$$X_{ti} = X_{ti-1} + \left[\frac{\mu_{max}(C_{ti-1} - I_0)}{K_s + (C_{ti-1} - I_0)} X_{ti-1} \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.4)$$

$$C_{ti} = C_{ti-1} + \left[-\frac{\mu_{max}(C_{ti-1} - I_0)}{K_s + (C_{ti-1} - I_0)} X_{ti-1} \left(\frac{1}{Y_{x/s}} \right) \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.5)$$

- Modelo de Teisser

$$X_{ti} = X_{ti-1} + \left[\mu_{max} \cdot \left(1 - \exp\left(\frac{-C_{ti-1}}{K_s}\right) \right) \cdot X_{ti-1} \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.6)$$

$$C_{ti} = C_{ti-1} + \left[-\mu_{max} \cdot \left(1 - \exp\left(\frac{-C_{ti-1}}{K_s}\right) \right) \cdot X_{ti-1} \left(\frac{1}{Y_{x/s}} \right) \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.7)$$

- Modelo de Moser

$$X_{ti} = X_{ti-1} + \left[\frac{\mu_{max}(C_{ti-1})^n}{K_s + (C_{ti-1})^n} X_{ti-1} \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.8)$$

$$C_{ti} = C_{ti-1} + \left[-\frac{\mu_{max}(C_{ti-1})^n}{K_s + (C_{ti-1})^n} X_{ti-1} \left(\frac{1}{Y_{x/s}} \right) \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.9)$$

Para el ajuste de estos modelos, se utilizó el programa Matlab con el método de Gauss-Newton y el programa de Berkeley Madonna con el método de Runge-Kutta 4. En las figuras 6.7, 6.8 y 6.9 se observa las curvas teóricas y experimentales a una concentración del 1% (v/v) de diésel obtenidas con los ajustes y los valores de los parámetros obtenidos a una concentración inicial del 1% y 3% v/v de diésel (I_0 , μ_{max} , K_s , $Y_{x/s}$, n) se muestran en la Tabla 6.1, de igual manera, se puede observar en las Figuras 6.10, 6.11 y 6.12, las curvas teóricas y experimentales de la concentración de biomasa e hidrocarburos obtenidas una concentración inicial de sustrato del 3% (v/v) de diésel; estos ajustes se realizaron con el programa de Matlab y complementando las gráficas con Excel.

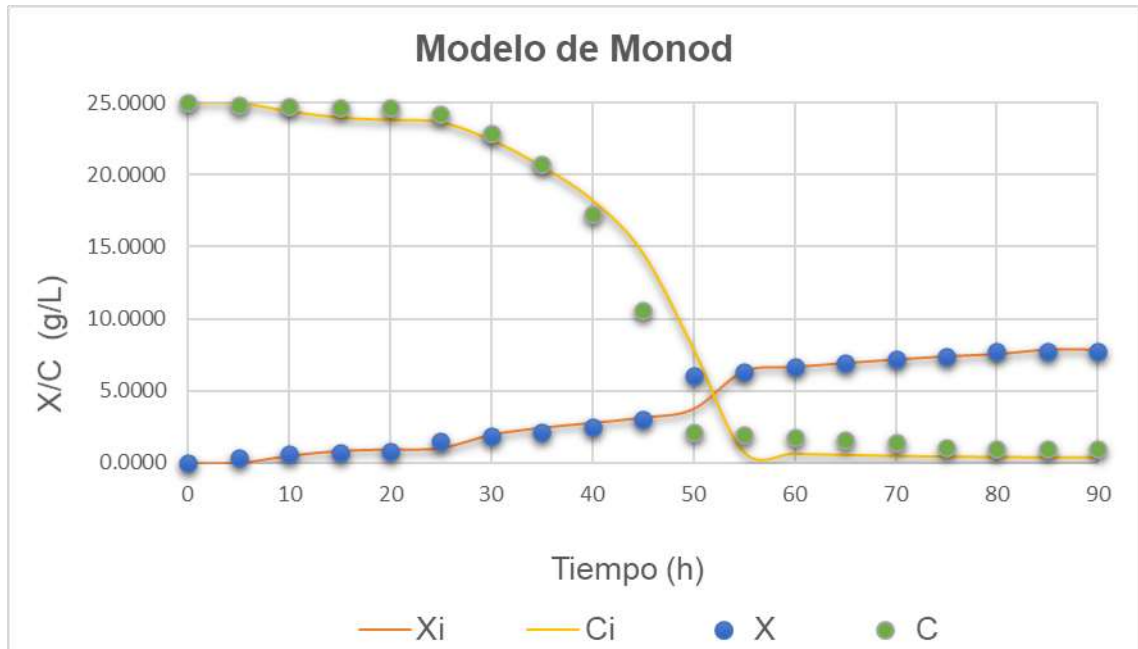


Figura 6.7: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Monod a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

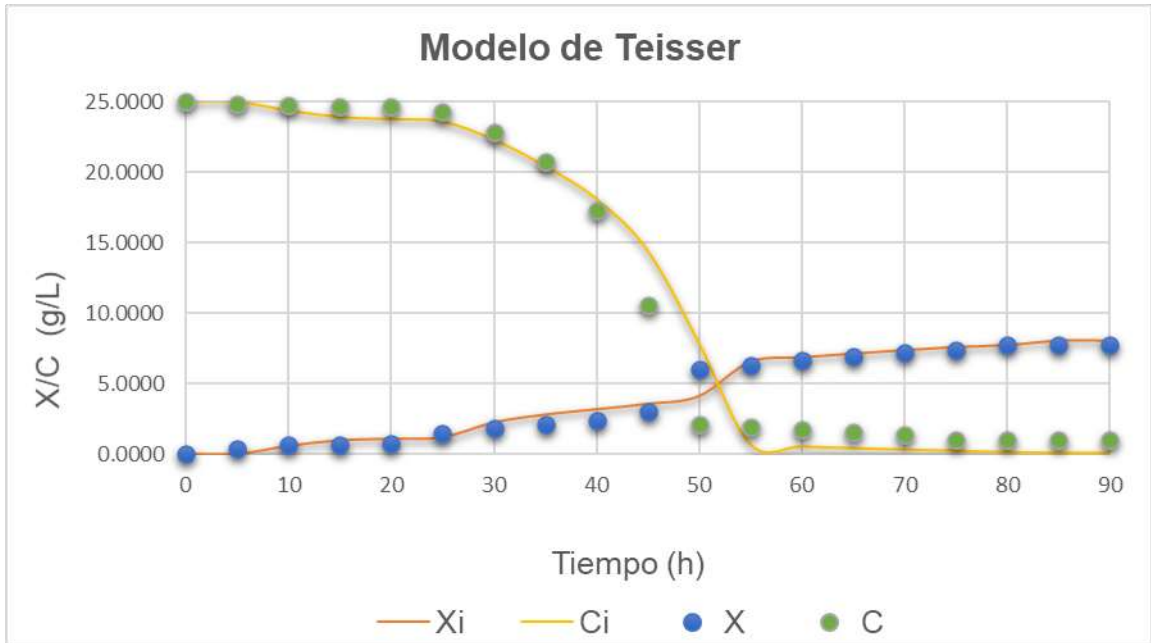


Figura 6.8: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Teisser a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

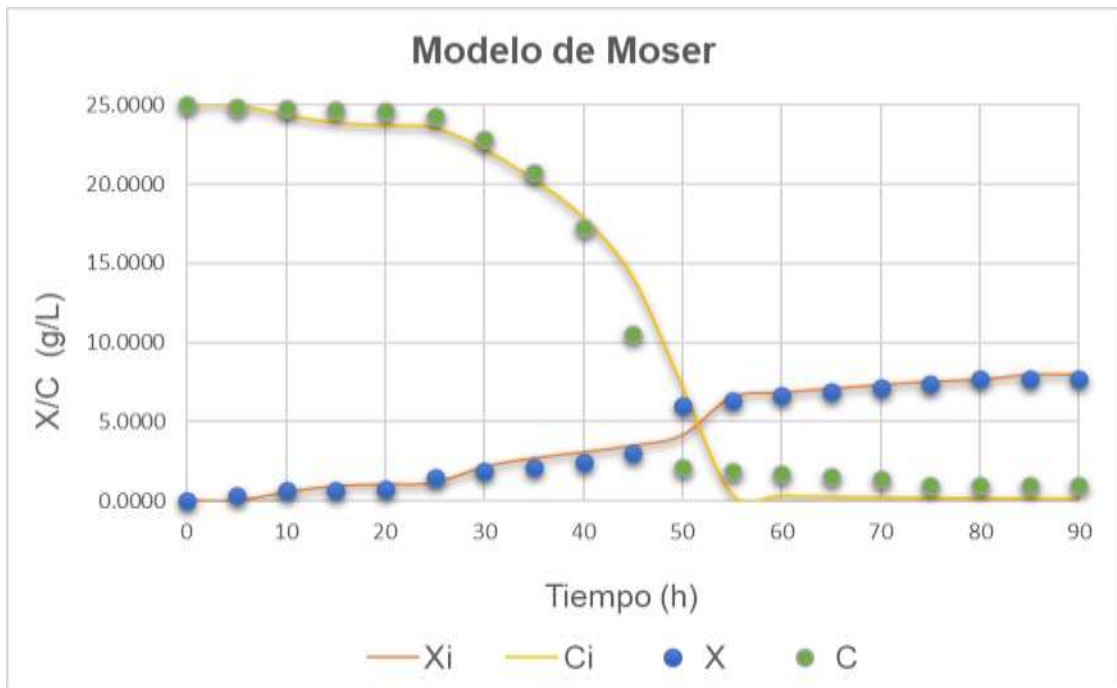


Figura 6.9: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Moser a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

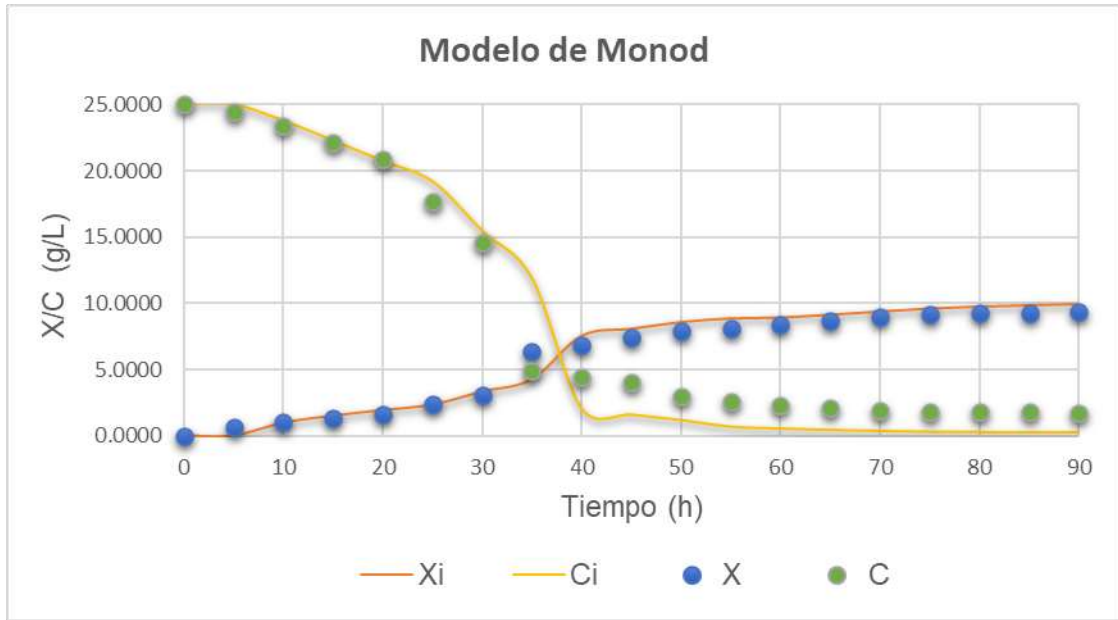


Figura 6.10: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Monod a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

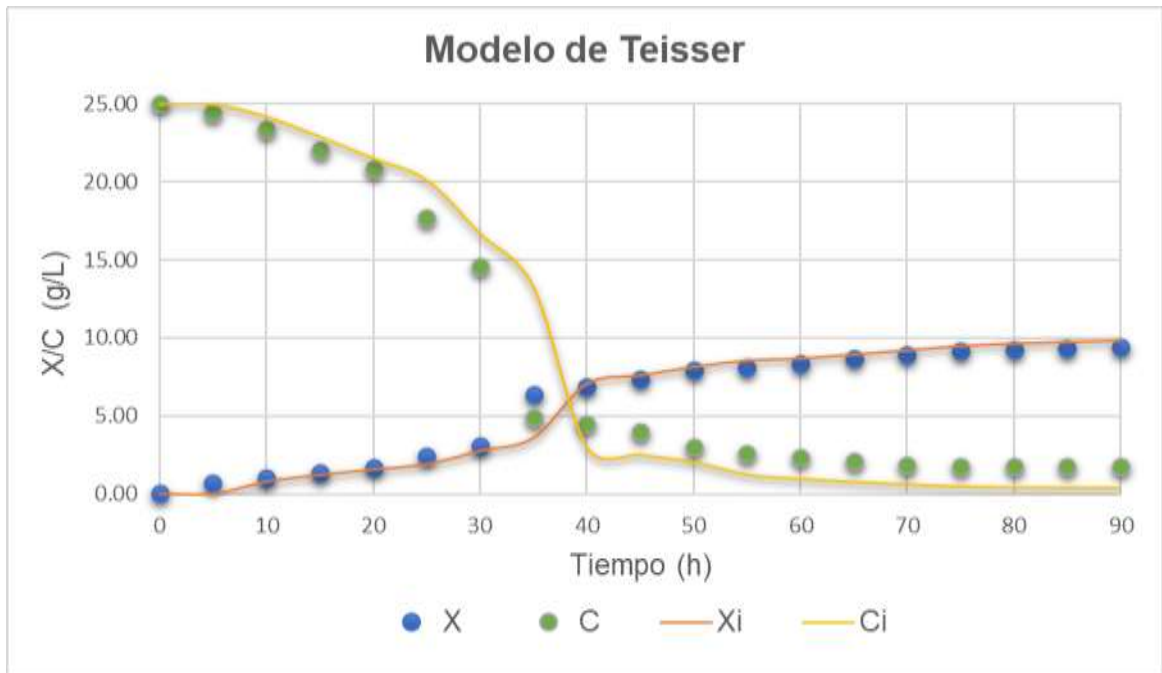


Figura 6.11: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Teisser a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

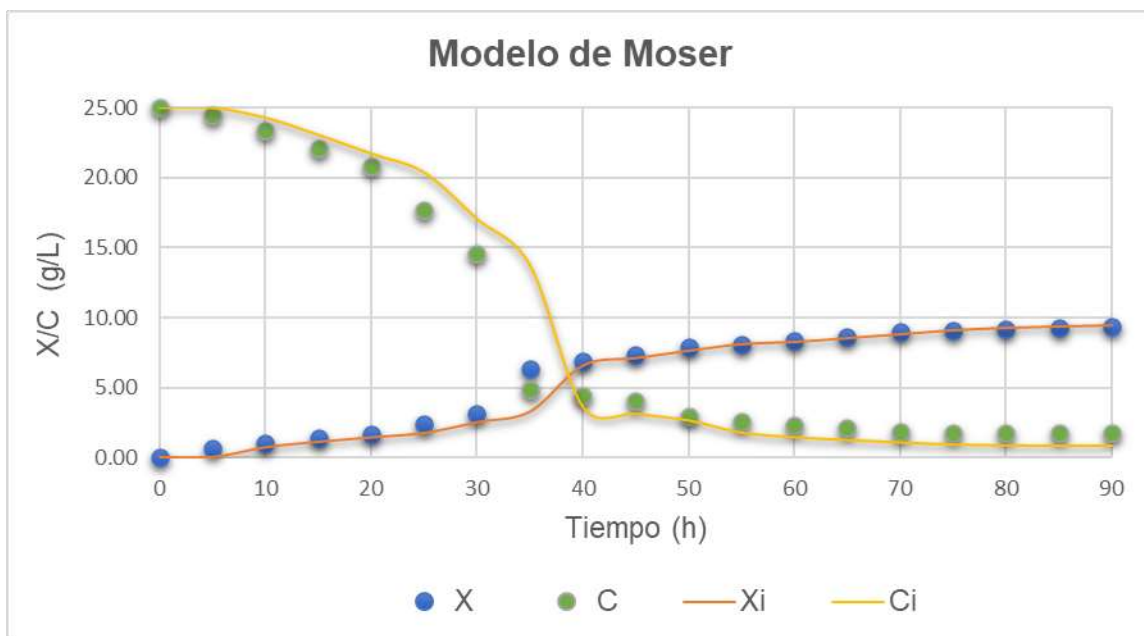


Figura 6.12: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Moser a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

Tabla 6.1: Método de Gauss-Newton para el modelo de Monod, Teisser y Moser a una concentración inicial del 1% y 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

Parámetros Cinéticos	C ₀ =1%			C ₀ =3%		
	Monod	Teisser	Moser	Monod	Teisser	Moser
I ₀ (g _{TPH} /L)	0.4808	---	---	0.5423	---	---
K _s (g _{TPH} /L)	12.4202	12.7580	14.2180	10.2726	4.0946	4.6280
μ _{max} (1/h)	0.1035	0.1265	0.1075	0.1284	0.0328	0.0119
Y _{x/s} (g _{células} /g _{TPH})	0.2708	0.4026	0.3358	0.4289	0.3843	0.2106
n	---	---	1.4364	---	---	1.4706

En el acápite 3.4.3, se estableció el modelo de Moser que en comparación a los otros modelos utilizados en este estudio es el único que considera el parámetro n, el cual incrementa su valor al aumentar la concentración inicial de diésel. No obstante, esta variación no es significativa, dado que los valores de este parámetro se encuentran en el intervalo de 1.44 a 1.47, los cuales son mayores que 1, lo que explica que existen efectos adaptativos y cooperativos, es decir, los microorganismos se adaptan de manera satisfactoria al sustrato y eso hace mejor las condiciones de crecimiento.

Por otro lado, en el modelo de Monod, se ha considerado el parámetro I₀ el cual representa el residuo del sustrato inerte. Este parámetro, aumentó, al incrementar la concentración inicial del sustrato, este hecho puede ser debido al aumento de concentración de la fracción no reaccionante al aumentar la concentración total inicial de diésel.

Por lo tanto, los parámetros en común de estos modelos cinéticos son la constante de semi-saturación (K_s), la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y el rendimiento en masa celular de sustrato ($Y_{x/s}$). La velocidad máxima de crecimiento es una característica para cada tipo de microorganismo y medio de cultivo (sustrato); los valores de este parámetro oscilaron entre 0.01 a 0.13 h⁻¹, valores ligeramente inferiores en comparación con los obtenidos en otros estudios previos (Young, C-C; Lin, T-C.;Yeh, M-S;Shen, F-T.;Chang, J-S, 2005).

En el modelo de Teisser, la concentración inicial del 1% (v/v) de diésel, produce un valor mayor de μ_{max} (0.13 h⁻¹), con relación a los otros dos modelos estudiados. Para la concentración inicial del 3% (v/v) de diésel, el mayor valor de μ_{max} se obtuvo con el modelo de Monod, reduciéndose significativamente, en prácticamente en un orden para los modelos de Teisser y Moser. Estas diferencias notorias se pueden explicar considerando las configuraciones de cada uno de los modelos (el modelo de Teisser y Moser se basa en modelos exponenciales y de potencia respectivamente), dado que la constante de saturación (K_s) se ve afectada por una mayor concentración de diésel, provocando una menor afinidad de los microorganismos por el consumo del sustrato.

Así mismo, se observa en la Tabla 6.1, que para una concentración inicial de diésel del 1% (v/v), se obtuvieron valores de K_s mayores que están entre 12 y 14 (g_{TPH}/L), comparados con los valores de 3 a 5 (g_{TPH}/L) obtenidos en el estudio de (Young, C-C; Lin, T-C.;Yeh, M-S;Shen, F-T.;Chang, J-S, 2005). Esto indica, que la reacción ha alcanzado el máximo consumo de sustrato. Para concentraciones iniciales del 3% (v/v) de diésel, se obtuvo un valor promedio de K_s entre 4 y 10 (g_{TPH}/L), en este caso para los modelos de Teisser y Moser, la disminución de K_s se debió principalmente a la disminución drástica de la velocidad máxima de crecimiento, ya que K_s es el valor de la concentración del sustrato a la que la velocidad específica de crecimiento es la mitad del valor máximo de esta.

El parámetro de $Y_{x/s}$ está asociado con la afinidad del sustrato y al rendimiento de la reacción, siendo sus valores obtenidos que están entre 0.21 y 0.43 (g_{células}/g_{TPH}), los cuales representan un buen aprovechamiento del sustrato consumido para la producción de biomasa. De igual manera, este resultado se comparó con otras investigaciones y fueron muy similares, especialmente con la investigación de (Moliterni Merlo, 2015), donde los valores oscilan entre 0.15 y 0.50 (g_{células}·g⁻¹_{TPH}).

La Tabla 6.2, muestra además los coeficientes de los ajustes de los modelos; dando como resultados que los modelos propuestos se ajustaron a los datos experimentales de manera satisfactoria con un coeficiente de ajuste mayor al 95% tanto para una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel como para una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel.

Tabla 6.2: Coeficientes de ajustes para una concentración inicial del 1 y 3% (v/v) de diésel para los diferentes modelos propuestos a temperatura de 30°C

Modelos cinéticos	Coeficiente de ajuste de los modelos cinéticos			
	C ₀ =1%		C ₀ =3%	
	R _x ²	R _c ²	R _x ²	R _c ²
Monod	0.97	0.97	0.96	0.96
Teisser	0.96	0.97	0.96	0.95
Moser	0.97	0.98	0.95	0.95

De igual manera, se utilizó el programa de Berkeley Madonna con el método Runge-Kutta 4 (cabe señalar que este método son aproximación de soluciones de ecuaciones diferenciales ordinarias) para encontrar los parámetros cinéticos. En la Tabla 6.3 se puede observar los valores de los parámetros cinéticos una concentración inicial de sustrato del 1 y 3% (v/v) de diésel y en las Figuras 6.13, 6.14 y 6.15, se obtienen las curvas teóricas y experimentales de la concentración de biomasa y sustrato a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel. De igual forma en las Figuras 6.16, 6.17 y 6.18, se encuentran las curvas teóricas y experimentales a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel.

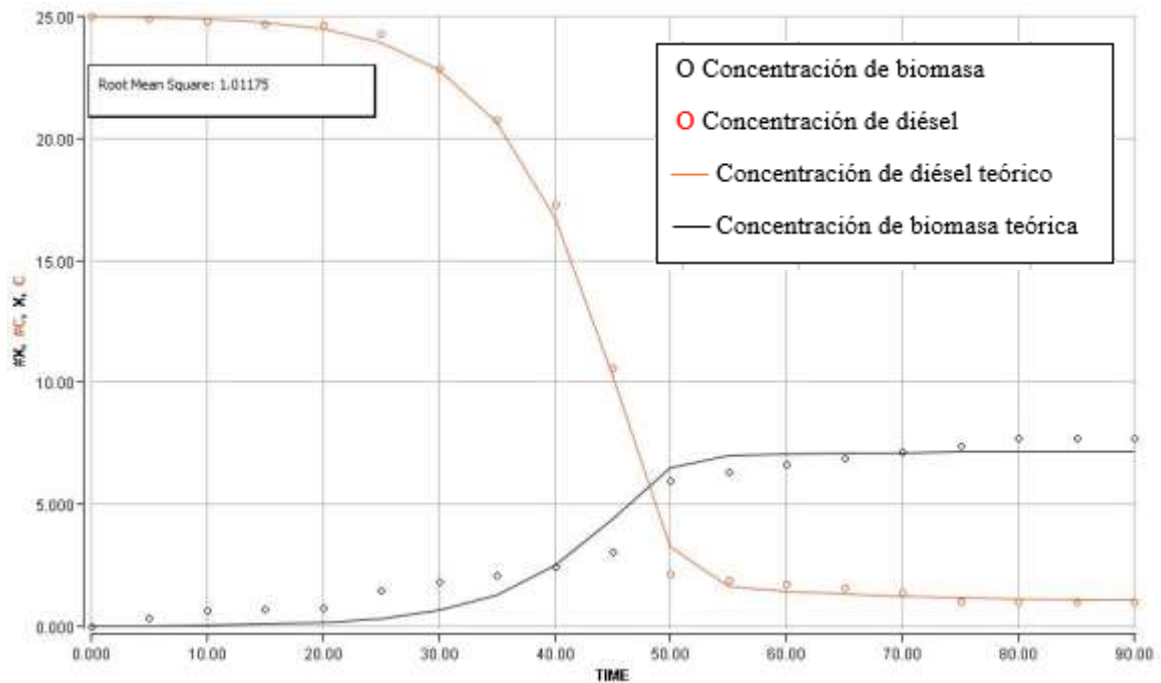


Figura 6.13: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Monod en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

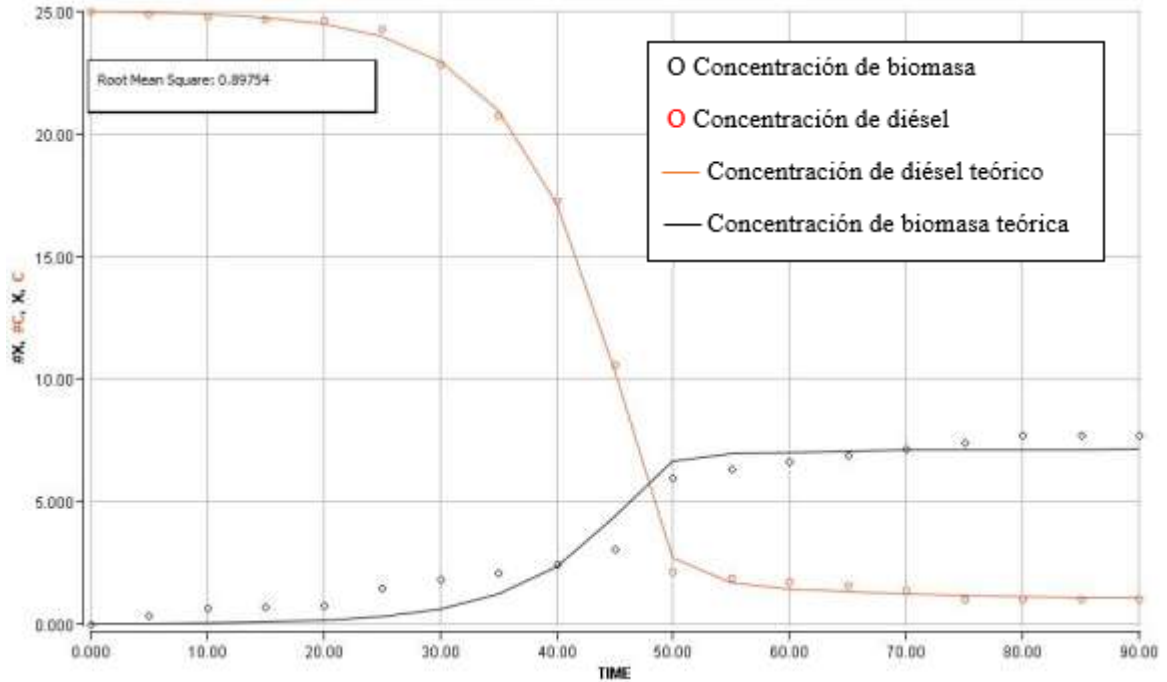


Figura 6.14: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Teisser en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

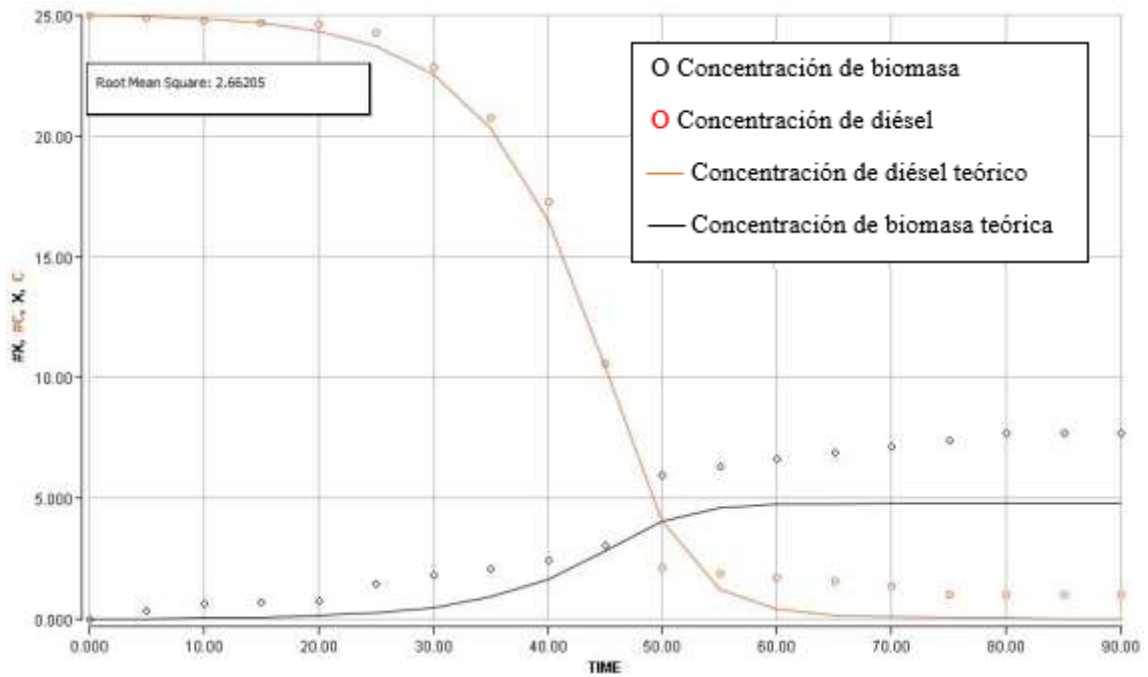


Figura 6.15: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Moser en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

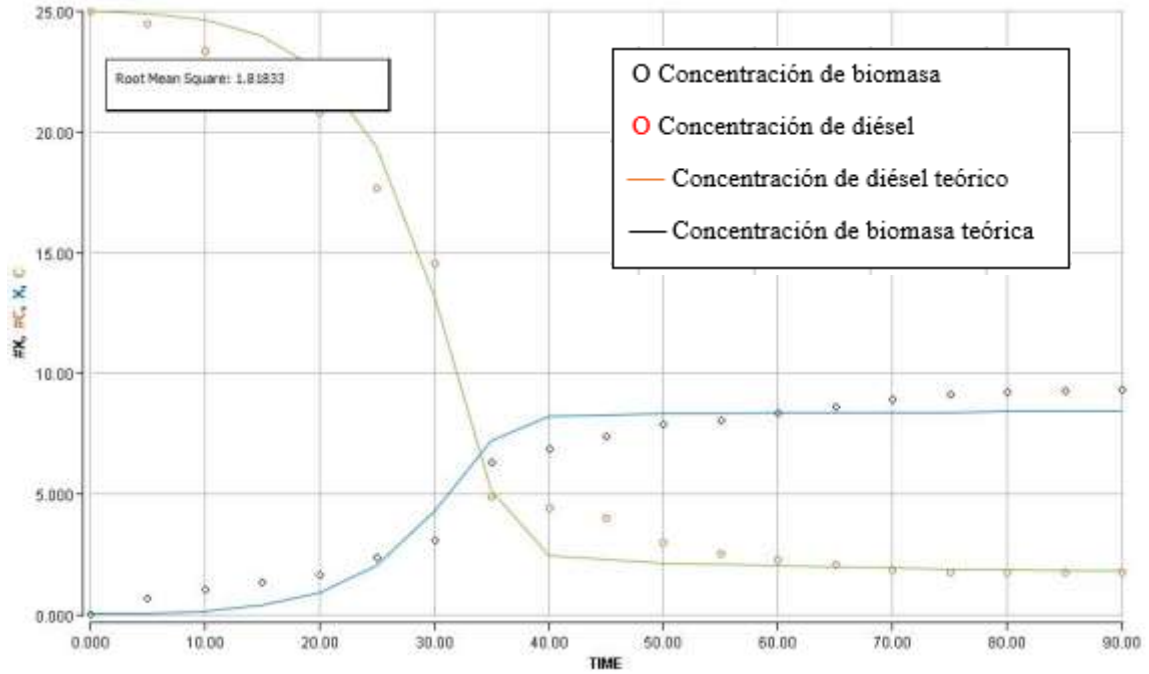


Figura 6.16: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Monod en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

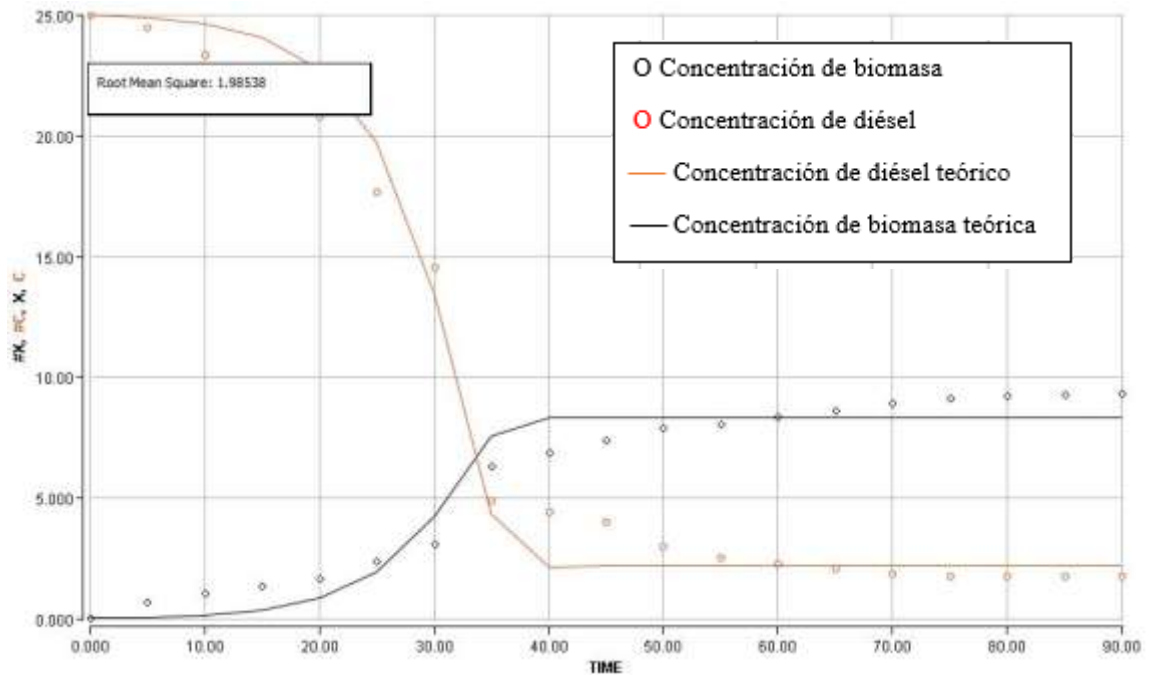


Figura 6.17: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Teisser en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

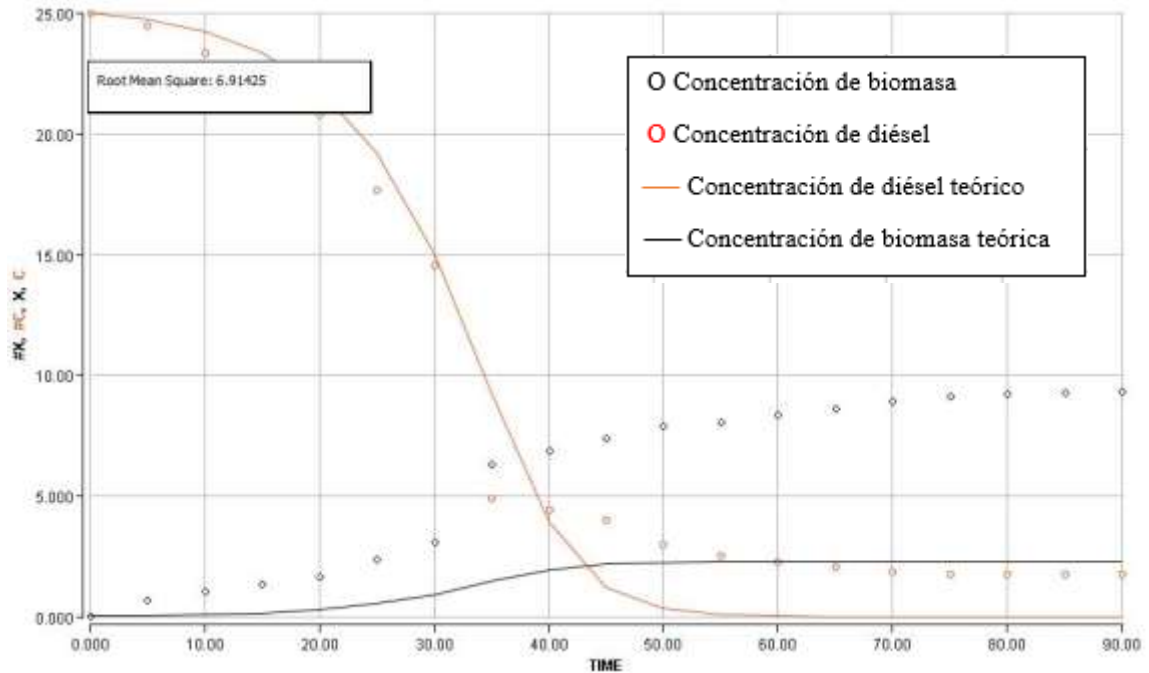


Figura 6.18: Curvas teóricas y experimentales de concentración de hidrocarburos y biomasa para el modelo de Moser en Berkeley Madonna a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

Como se pueden observar en las figuras, a una temperatura de 30°C y con concentraciones iniciales del 1 y 3 % (v/v) de diésel, los modelos de Monod y Teisser son los que mejor se ajustan al proceso de degradación, es decir, se puede observar que el coeficiente de ajuste del modelo cinético es menor en estos dos casos, esto significa que la desviación de los valores predichos y observados es mínima.

Sin embargo, en las figuras 6.16 y 6.19, el modelo de Moser no se obtuvo la convergencia en los datos que describe el proceso de degradación, es decir, que su coeficiente de ajuste es elevado, entre 2.66 y 6.91, esto significa que los valores predichos y observados están alejados.

Tabla 6.3: Método de Runge-Kutta 4 para el modelo de Monod, Teisser y Moser a una concentración inicial del 1% y 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

Parámetros Cinéticos	C ₀ =1%			C ₀ =3%		
	Monod	Teisser	Moser	Monod	Teisser	Moser
I ₀ (g _{TPH} /L)	0.2896	---	---	0.9999	---	---
K _s (g _{TPH} /L)	8.6569	6.4103	14.5071	11.2349	7.6619	14.9959
μ _{max} (1/h)	0.1900	0.1405	0.1588	0.2539	0.1753	0.1691
Y _{x/s} (g _{células} /g _{TPH})	0.2991	0.2977	0.1921	0.3627	0.3641	0.0911
n	---	---	1.3008	---	---	1.1183

Los parámetros cinéticos a concentraciones iniciales del 1 y 3 % (v/v) de diésel del programa Berkeley Madonna se asemejan a la misma tendencia que los obtenidos en Matlab. Se observa un aumento de I_0 en el modelo de Monod, lo cual indica que, a mayor concentración inicial de diésel, mayor contenido de materia orgánica que no se degrada. Un valor de K_s que esta, entre 6 y 14 (g_{TPH}/L), este aumentó ligeramente a una concentración del 3% (v/v) de diésel, esto debido a la poca afinidad del sustrato.

También se muestra la velocidad máxima de crecimiento (u_{max}) donde esta aumenta al aumentar la concentración de sustrato inicial, mostrándose valores óptimos en los 3 modelos propuestos. El parámetro $Y_{x/s}$, mostró una disminución significativa en el modelo de Moser a una concentración inicial de diésel del 3% (v/v) de diésel esto debido a su mal ajuste. Por último, el parámetro n , muestra una pequeña disminución de 1.30 a 1.12, al aumentar la concentración inicial de diésel, pero en ambos casos el parámetro n es mayor de 1, lo cual indica que existen efectos adaptativos y cooperativos en el proceso.

Por lo tanto, ambos programas muestran resultados óptimos de ajuste, siendo los modelos de Monod y Teisser los que mejor ajuste presentan en ambos casos. Sin embargo, se trabajó con los parámetros cinéticos obtenidos con el método Gauss-Newton, ya que muestra mejor ajuste en los 3 modelos planteados. En los gráficos 6.19 y 6.20, se muestran las concentraciones de biomasa e hidrocarburos obtenidos en los experimentos de biodegradación en suspensión acuosa para cada uno de los modelos propuestos, lo cual muestra que los modelos cinéticos planteados pueden predecir la biodegradación de hidrocarburos con el tiempo de manera eficiente.

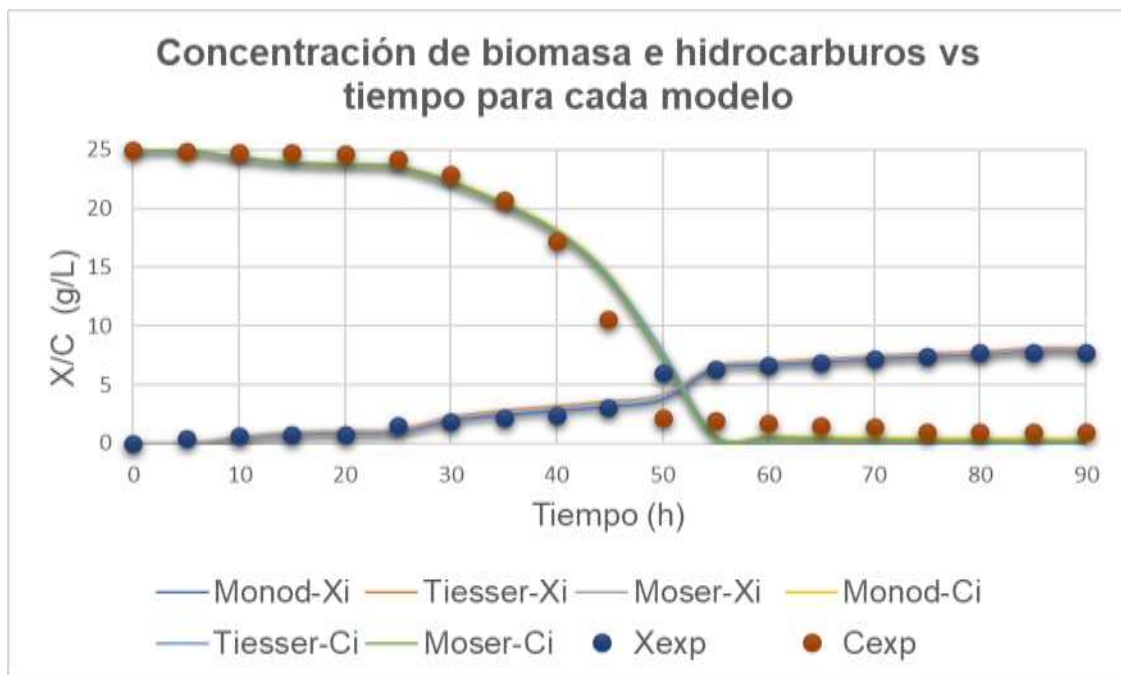


Figura 6.19: Relación de los 3 modelos propuesto a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

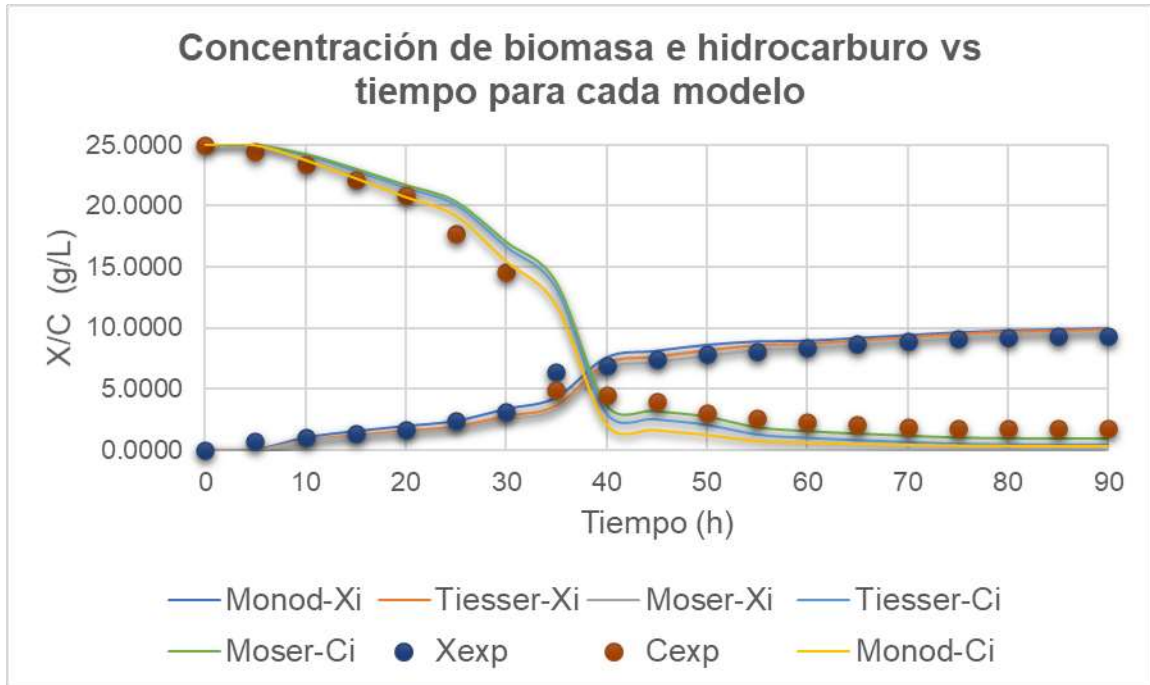


Figura 6.20: Relación de los 3 modelos propuesto a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

Por lo tanto, se muestran los resultados de los modelos cinéticos propuestos para un rango de concentración de biomasa e hidrocarburos de 0.01 a 7.72 (g_{células}/L) y 25 a 1 (g_{TPH}/L) respectivamente a intervalos de tiempo (horas) con espaciados iguales:

- Modelo de Monod

$$X_{ti} = X_{ti-1} + \left[\frac{0.1035 \cdot (C_{ti-1} - 0.4808)}{12.4202 + (C_{ti-1} - 0.4808)} X_{ti-1} \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.10)$$

$$C_{ti} = C_{ti-1} + \left[-\frac{0.1035 \cdot (C_{ti-1} - 0.4808)}{12.4202 + (C_{ti-1} - 0.4808)} X_{ti-1} \left(\frac{1}{0.2708} \right) \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.11)$$

- Modelo de Teisser

$$X_{ti} = X_{ti-1} + \left[0.1265 \cdot (1 - \exp(\frac{-C_{ti-1}}{12.7580})) \cdot X_{ti-1} \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.12)$$

$$C_{ti} = C_{ti-1} + \left[-0.1265 \cdot (1 - \exp(\frac{-C_{ti-1}}{12.7580})) \cdot X_{ti-1} \left(\frac{1}{0.4026} \right) \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.13)$$

- Modelo de Moser

$$X_{ti} = X_{ti-1} + \left[\frac{0.1075 \cdot (C_{ti-1})^{1.4364}}{14.2180 + (C_{ti-1})^{1.4364}} X_{ti-1} \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.14)$$

$$C_{ti} = C_{ti-1} + \left[-\frac{0.1075 \cdot (C_{ti-1})^{1.4364}}{14.2180 + (C_{ti-1})^{1.4364}} X_{ti-1} \left(\frac{1}{0.3358} \right) \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.15)$$

De igual manera, se muestran los resultados de los modelos cinéticos propuestos para un rango de concentración de biomasa e hidrocarburos de 0.03 a 9.38 (g_{células}/L) y 25 a 1.77 (g_{TPH}/L) respectivamente a intervalos de tiempo (horas) con espaciados iguales:

- Modelo de Monod

$$X_{ti} = X_{ti-1} + \left[\frac{0.1284 \cdot (C_{ti-1} - 0.5423)}{10.2726 + (C_{ti-1} - 0.5423)} X_{ti-1} \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.16)$$

$$C_{ti} = C_{ti-1} + \left[-\frac{0.1284 \cdot (C_{ti-1} - 0.5423)}{10.2726 + (C_{ti-1} - 0.5423)} X_{ti-1} \left(\frac{1}{0.4289} \right) \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.17)$$

- Modelo de Teisser

$$X_{ti} = X_{ti-1} + \left[0.0328 \cdot (1 - \exp(\frac{-C_{ti-1}}{4.0946})) \cdot X_{ti-1} \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.18)$$

$$C_{ti} = C_{ti-1} + \left[-0.0328 \cdot (1 - \exp(\frac{-C_{ti-1}}{4.0946})) \cdot X_{ti-1} \left(\frac{1}{0.3843} \right) \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.19)$$

- Modelo de Moser

$$X_{ti} = X_{ti-1} + \left[\frac{0.0119 \cdot (C_{ti-1})^{1.4706}}{4.6280 + (C_{ti-1})^{1.4706}} X_{ti-1} \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.20)$$

$$C_{ti} = C_{ti-1} + \left[-\frac{0.0119 \cdot (C_{ti-1})^{1.4706}}{4.6280 + (C_{ti-1})^{1.4706}} X_{ti-1} \left(\frac{1}{0.2106} \right) \right] \cdot (t_i - t_{i-1}) \quad (6.21)$$

6.4. Eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa

La eficiencia representa la máxima degradación de los hidrocarburos por el consorcio microbiano aplicado y se puede expresar como la diferencia entre concentración de hidrocarburos totales al inicio del ensayo y la concentración de hidrocarburos totales al final del ensayo dividida entre la concentración de hidrocarburos totales al inicio del ensayo como se muestra en la ecuación 4.7.

En la Figura 6.21, se muestra que después de 50 horas, se obtiene un porcentaje de remoción del 91%, por lo cual es un tratamiento eficiente para la remoción de diésel. Al finalizar el tratamiento se logró una remoción de diésel del 96%, por lo que se puede considerar que es un tratamiento muy eficiente en la remoción del contaminante, siendo este el contenido máximo de remoción de diésel a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel.

Por otro lado, a una concentración inicial de diésel del 3% (v/v) de diésel., se obtiene una eficiencia de remoción del 91% después de 60 horas, por lo cual el tratamiento es eficiente, al finalizar con el tratamiento, a sus 90 horas, se alcanza una eficiencia del 93%, lo cual indica que después de 30 horas de tratamiento, solo aumenta en un 2% su eficiencia como se muestra en la Figura 6.22.

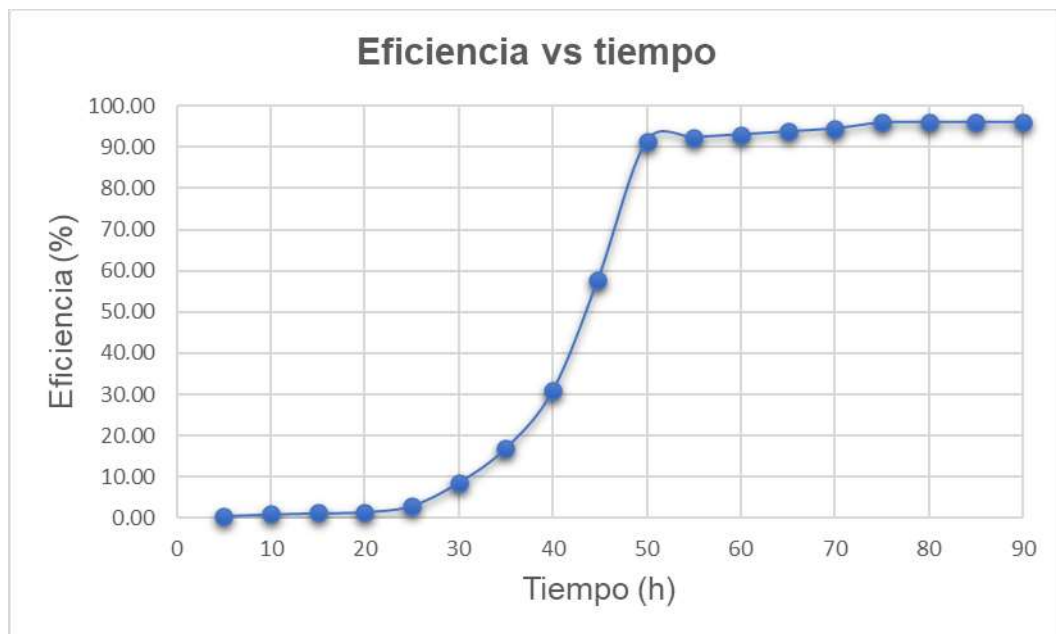


Figura 6.21: Eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa por el consorcio microbiano aplicado a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

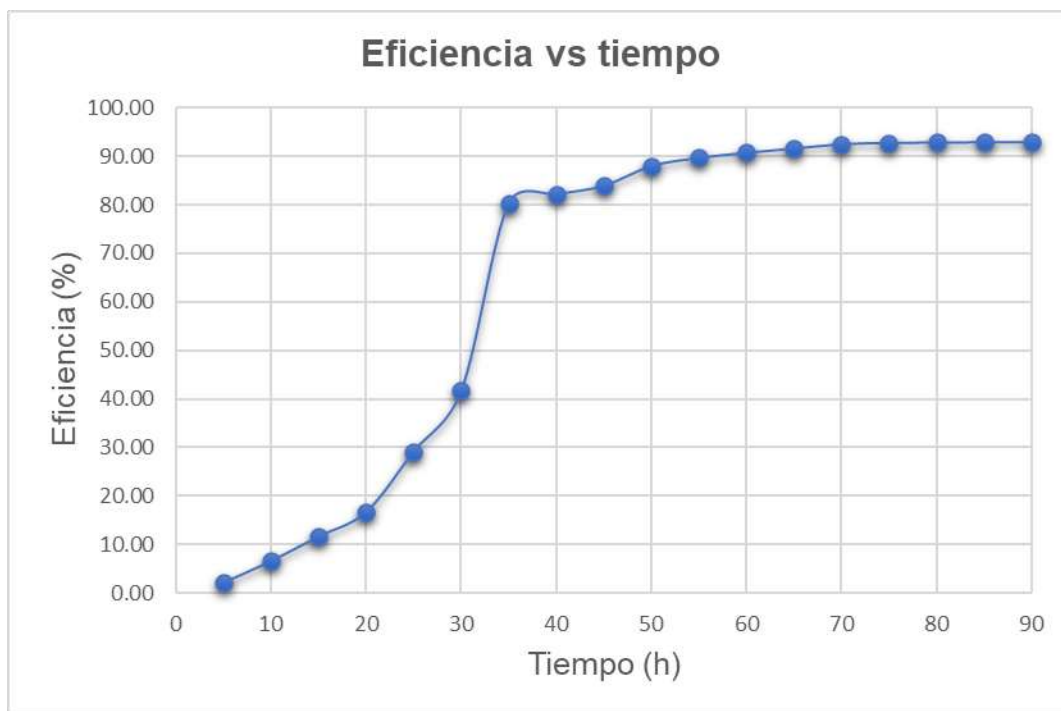


Figura 6.22: Eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en suspensión acuosa por el consorcio microbiano aplicado a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

En la Figura 6.23, se muestra la velocidad de remoción, la cual aumenta hasta un tiempo de 50 horas, después de este tiempo comienza a descender, lo cual quiere decir que el estudio de biodegradación en suspensión acuosa se puede llevar a cabo de forma eficiente hasta un tiempo de 50 horas, como también se pudo observar en la figura 6.21 dando una eficiencia del 91% a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel.

Para una concentración inicial del 3% (v/v) de sustrato (Figura 6.24), la velocidad de remoción aumenta hasta un tiempo de 35 horas, después de ese tiempo comienza a descender hasta llegar a un tiempo de 50 horas donde aumenta un poco nuevamente y vuelve a descender hasta la finalización del experimento. Cabe señalar, que a una concentración inicial de sustrato del 1% (v/v) de diésel se obtiene una mejor eficiencia y una mayor velocidad de remoción que los presentados a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel.



Figura 6.23: Velocidad de remoción en suspensión acuosa por el consorcio aplicado a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

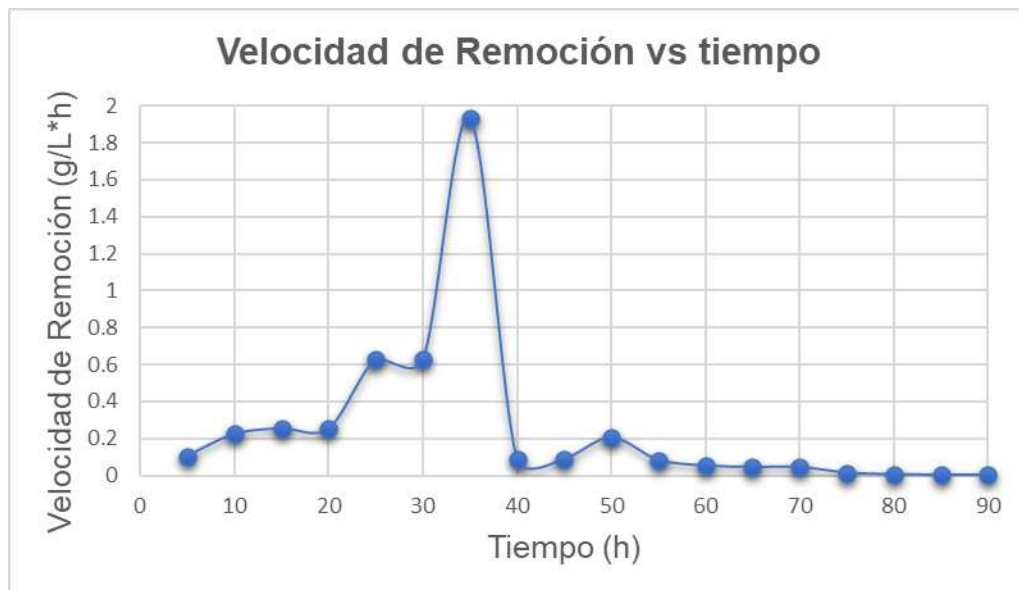


Figura 6.24: Velocidad de remoción en suspensión acuosa por el consorcio aplicado a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

Los resultados obtenidos confirman el potencial de degradación que poseen los microorganismos nativos en suspensión acuosa y permitió estructurar y validar métodos para la obtención de los modelos cinéticos para la predicción y control del proceso de biorremediación. Confirmando así, la hipótesis planteada en esta investigación.

VII. Conclusiones

- Los consorcios microbianos A, B y C, teniendo como sustrato un caldo BHB alcanzan su fase de crecimiento exponencial prácticamente a las 40 horas, lo que indica que un proceso de re-inoculación deberá efectuarse a estos intervalos de tiempo, es decir, cada 40 horas. El consorcio A, alcanza una concentración mayor de biomasa, seguido del consorcio B y C. El consorcio A alcanza su fase estacionaria a las 140 horas, el consorcio B a las 60 horas y el consorcio C a las 100 horas de iniciado el experimento.
- Los consorcios microbianos B y C, a las concentraciones iniciales de diésel de 0.5, 1 y 3 % v/v y a las temperaturas de 25, 30 y 35 ° C, no registran crecimiento de biomasa ni consumo de sustrato, por lo que se asume que podría existir una fuente de envenenamiento de los microorganismos, que inhibe su crecimiento y que provoca su muerte.
- Igual situación sucede con el consorcio A, con una concentración inicial de 0.5, 1 y 3% v/v de diésel y a las temperaturas de 25 y 35 ° C, no se registra crecimiento de biomasa, ni consumo de sustrato, de igual manera, para una concentración inicial del 0.5% de diésel a una temperatura de 30°C.
- Para el consorcio A, a las concentraciones iniciales de diésel de 1.0 y 3.0% v/v y a la temperatura de 30°C, se registran los crecimientos de biomasa y consumos de sustrato, esto debido a la presencia de la especie microbiana *Pseudomonas Fluorecens*, la cual posee un alto potencial de degradación de hidrocarburos y se adapta con mucha facilidad al sustrato utilizado como única fuente de carbono. Esta especie está presente en mayor proporción en la composición del Consorcio A con relación al Consorcio B y en el Consorcio C, no está presente.
- En cambio, las otras especies de microorganismos, aunque también se adapta al sustrato compuesto por hidrocarburos, su potencial de degradación es mucho menor que la especie *Pseudomonas* y las concentraciones de hidrocarburos pueden provocar intoxicación de la especie provocando la muerte de los organismos microbianos.
- Por otra parte, la especie *Pseudomonas* es resistente a la temperatura en el intervalo de 25 a 37 °C y esta favorece su reproducción. Estas características explican la preeminencia en el proceso de biodegradación del diésel in vitro del Consorcio A con relación al Consorcio B y C.
- Los modelos cinéticos propuestos, basados en las ecuaciones de Monod, Teisser y Moser, describen de forma bastante aproximada los comportamientos cinéticos de los procesos de biodegradación del diésel in vitro con coeficientes de ajustes de los modelos superiores a 95% en todos los casos.

- No obstante, al resolver los modelos cinéticos propuestos por los métodos de integración de Runge-Kutta con el Software Berkeley-Madonna, el Modelo de Moser, registra mayores desviaciones reflejándose con mayores valores para el coeficiente de ajuste.
- Usando el ajuste de modelos cinéticos no lineales y resolviéndolo con el Método de Gauss-Newton, se obtiene valores mayores de μ_{\max} para el modelo cinético de Monod en comparación a los valores obtenidos en los modelos de Teisser y Moser, esta variación se explica por la configuración de cada modelo.
- Por otra parte, estos resultados comprueban la hipótesis relacionada con que los procesos de biodegradación de diésel usando consorcios microbianos autóctonos in vitro, se ajustan a modelos cinéticos sencillos, no estructurados-no segregados.
- La eficiencia de biodegradación del diésel en suspensión acuosa por la acción de los microorganismos del consorcio A, con una concentración inicial de diésel del 1% v/v y una temperatura de 30°C alcanza una tasa del 90% de remoción de diésel, en un tiempo de 50 horas.
- En tanto el mismo consorcio A, con una concentración inicial de diésel del 3% v/v y una temperatura de 30°C alcanza una tasa del 90% de remoción de diésel, en un tiempo de 60 horas. Lo cual puede explicarse, con que una mayor concentración inicial del sustrato, genera una mayor concentración residual (I_0) del sustrato, que desacelera la reacción de biodegradación, disminuyendo la eficiencia de remoción del diésel contaminante al finalizar el experimento, aunque no significativamente.

VIII. Recomendaciones

- En los estudios que continúan a esta investigación, se recomienda que las mediciones de concentraciones de biomasa y consumo de sustrato, en los procesos de biodegradación de hidrocarburos, se realicen a intervalos de tiempos iguales, lo que permitirá mayor eficiencia en la planificación y ejecución de las investigaciones así como ahorro de recursos y tiempo, logrando a la vez que los modelos cinéticos se ajusten y describan de manera más aproximada los comportamientos cinéticos de estos procesos de biodegradación de hidrocarburos.
- Por otra parte, es necesario la aplicación y desarrollo de software que permita resolver los modelos matemáticos y simular los procesos biológicos de degradación de hidrocarburos presentes en los distintos compartimientos ambientales objetos de estudios.
- Las determinaciones de las concentraciones de hidrocarburos, no se realizan en el país, por lo que debe recurrirse a Laboratorios Internacionales que están debidamente certificado y por ende los costos económicos de estas pruebas y ensayos son bastante elevados, por lo que se recomienda desarrollar investigaciones que permitan la utilización de métodos gravimétricos para la determinación de las concentraciones de hidrocarburos, estableciendo los umbrales límites para la validez de estas determinaciones.

IX. Bibliografía

- Álvarez, S. (2020). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos empleando consorcios de microorganismos nativos.
- Amellal, N., Portal, J., & Berthelin, J. (2001). Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil [Journal] // Applied Geochemistry.
- Atkinson, B. (2010). Biochemical reactors. Londres. Pion Limited, 1974.
- Atlas, R. M. (1975). Effects of Temperature and Crude Oil Composition on Petroleum Biodegradation [Journal] // Applied Microbiology. .
- Atlas, R. M. (1981). Microbial Degradation Of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective [Journal] // Microbiological Reviews.
- Atlas, R. M. (1995). Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation [Journal] // Marine Pollution Bulletin.
- Ayotamuno, J. M., Kogbara, R. B., & Taleat, M. O. (2006). Biorremediation of a petroleum-hydrocarbon polluted agricultural soil at different levels of water application in Port Harcourt, Nigeria [Journal] // Journal of Food, Agriculture & Environment.
- Baek. (2004). Effects of Soil types on the Biodegradation of Crude Oil by *Nocardia* sp. H17-1 [Journal] // Journal of Microbiology and Biotechnology.
- Balba, M., Al-Awadhi, N., & Aldaher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil : microbiological methods for feasibility assessment.
- Bento, F. M. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation [Journal] // Bioresource Technology.
- Borrassen, M., & Rike, A. (2007). Effects of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Arctic soil. Cold Regions Scienceand Technology. .
- Bronick, C., & Lal, R. (2005). Soil Structure and mangment: a review [Journal] // Geoderma.
- Buchanan, R. L., & Klawitter, L. A. (1991). Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. International Journal of Food Microbiology .
- Bundy, J., Paton, G., & Campbell C, D. (2001). Microbial communities en different soil tupes do not converge after diesel contamination [Journal] // Journal of Applied Microbiology.
- Canale, Steven C Chapra & Raymond P. (s.f.). Métodos Números para ingenieros (Quinta ed.). McGrawHill.

- Chaîneau, C. H. (2003). Bioremediation Of A Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching And Toxicity Assessments [Journal] // Water, Air, And Soil Pollution.
- Cunningham, C., & Philip, J. (2000). Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. Land Contamination and Reclamation.
- Davis, J. (1967). Petroleum Microbiology. Ed. Elsevier. Amsterdam, Holland.
- De Jonge, H. (1997). Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils [Journal].
- Del'Arco, J., & De França F, P. (2001). Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment [Journal] // Environmental pollution.
- Delignette-Muller, M. L. (1998). Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. .
- Delille, D., Pelletier, E., & Coulon, F. (2007). The influence of temperature on bacterial assemblages durin biorremediation of a diesel fuel contaminated subAntartic soil [Journal] // Cold Regions Science and Technology.
- Dibble, J. T., & Bartha, R. (1979). Effect of Environmental Parameter on the Bidegradation of Oil Sludges [Journal] // Applied and Environmental Microbiology.
- Dorn, P. B., & Salanitro, J. P. (2000). Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation.
- Drenovsky, R., Vo, D., Graham, K., & Scow, K. (2004). Soil Water Content and Organic Carbon Availability Are Major Determinants of Soil Microbial Community Composition. Microb.
- Eduardo, A. J. (2007). Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. En M. J, The growth of bacterial cultures (págs. 371-394). Barcelona, España.
- Evans, W. C., & Fuchs, G. (1988). Anaerobic degradation of aromatic compounds. Annual Review of microbiology, Ed. Ornston, L.A., Balows, A. Baumann, P. Annual Reviews, Palo Alto, C.A., USA.
- Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. P., & Schroeder, E. D. (1999). Principios de Biorrecuperación: Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. McGrawHill. Madrid.

- Gafonova, O. V., & Yarranton, H. W. (2001). The stabilization of water-in-hydrocarbon emulsions by asphaltenes and resins [Journal] // Journal of Colloid and Interface Science.
- Garcia-Ochoa, E., & VE Santos, J. C. (1999a.). Kinetic modeling of microbial processes” Rec. Res. Develop.Chem.Eng.
- García-Ochoa, F., Santos, V., & Gómez, E. (1999b). Oxygen transfer and uptake rates during xantban gum production. .
- Gill, C. O., Harrison, J. C., & Phillips, D. M. (1991). Use of temperature function integration technique to assess the hygienic efficiency of a beef carcass cooling process. Food Microbiology .
- Giraldo-Gomez, E; Goodwin, S; Switzenbeum, M. (1992). Influence of mass transfer limitations on determination of the half saturation constant for hydrogen uptake in a mixed-culture CH₄ producing enrichmente.
- Gothalwal, R. (2013). Bioremediation. In Encyclopedia of Environmental Management. . Taylor and Francis: New York, USA. .
- Greene, A., Kay, J., Jaber, K., Stehmeier, L., & Voordouw, G. (2000). Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. Applied and Enviromental Microbiology. Estados Unidos.
- Gutiérrez Pulido, H., & Salazar, R. d. (s.f.). Análisis y diseño de experimentos (Segunda ed.). McGrawHill.
- Hanson, K., Anuranjini, N., Madhavi, K., & Anjana, D. (1997). Bioremediation of crude oil contamination with Acinetobacter sp. A3. Current Microbiology. Baroda, India. .
- Hui, L. (2007). Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment [Journal] // Journal of Environmental Sciences.
- Jacobucci, D., Vasconcelos, C., A., M., & Falconi, F. (2000). Degradation of diesel oil by biosurfactants producing bacterial strains. Contaminated Soil Sediment and water. Association of Environmental Health and Sciences.
- Kao, C. (2001). Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. .
- Lawrence, A. M. (1970). Unified basis for biological treatment design and operation. J. Sanit. Eng. Div. ASCE.
- Leahy, J., & Cowell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. .
- Lee, S., Oh, B., & Kim, G. (2007). Effects of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. Bioresource Technology.

- M., N., Pinelli, D., & Fava, F. (2000). Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem.
- Macnaughton, S., Stephen, J., Venosa, A., Davis, G., & Chang, Y. y. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Biorremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area [Journal] // *Applied an Environmental Microbiology*.
- Margesin, R., Hammerle, M., & Tschërko, D. (2007). Microbial Activity and Community Composition during Bioremediation of Diesel-Oil-Contaminated Soil: Effects of Hydrocarbon Concentration, Fertilizers, and Incubation Time [Journal] // *Microbial Ecology*.
- Márquez, F., Hernández, V., & Lamela, M. (2001). Biodegradation of diesel oil in soil by a mycrobial consortium.
- Martiensen, M., & Schirmer, M. (2007). Use of surfactants to improve the biological degradation of petroleum hydrocarbons in a field site study [Journal] // *Environmental Technology*.
- Martín, A. A. (1999). *Desarrollo de Modelos Cinéticos para Bioprocesos: Aplicación a la producción de Xantano*. Universidad Complutense de Madrid, Ingeniería Química, Madrid.
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ratkowsky, D. A., & Ross, T. (2002). Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*.
- Menéndez, D., Gallego, J., Peláez, A., Fernández de Córdoba, G., Moreno, J., Muñoz, D., & Sánchez, J. (2007). Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology*.
- Moliterni Merlo, E. (2015). Biorremediación acelerada de suelos contaminados con hidrocarburos tipo diésel.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures.
- Montville, T. (2000). Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana.
- Moser, H. (1958). The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat. Washington. Carnegie Institution of Washington, 1958.

- Musarrat, J., & Zaidi, S. (2006). Bioremediation of agrochemicals and heavy metals in soil. In *Biotechnological Applications of Microorganisms. A Techno-Commercial Approach*.
- Nielsen, J., & Villadsen, J. (1994). *Bioreaction engineering principles*.
- Nyer, E. (1993). *Practical Techniques for Groundwater and Soil Remediation*. USA.
- Olson, J., Mills, G., Herbert, B., & Morris, P. (1999). Biodegradation rates of separated diesel components, *Environmental toxicology and Chemistry*.
- Phrommanich, S., Suanjit, S., Upatham, S., Grams, S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., . . . Hofmann, A. (2007). Quantitative detection of the oil degrading bacterium *Acinetobacter* sp. strain MUB1 by hybridization probe based real-time PCR. *Microbiol.*
- Pollard, S. J., Hrudehy, S. E., & Fedorack, P. M. (1994). *Biorremediation of Petroleum and Creosote-Contaminated soils: A review of Constraints [Journal] // Waste Management and Research*.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (1999). *Microbiología (4ta ed.)*. McGraw-Hill.
- Prince, R; Varadaraj, R; Fiocco, R; Lessard, R. (1999). *Bioremediation as an oil spill response tool*. *Environmental Technology*.
- R. Y. Stanier, J. L. (1989). En *Microbiologia (2 ed., págs. 195-209)*. Reverté.
- Rahman, K. (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium [Journal] // *Bioresource Technology*.
- Rahman, K., Banat, I., Thahira, J., Thayumanavan, T., & Lakshamanaperumalsamy, P. (2001). *Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant*. *Bioresource Technology*.
- Ramírez, O. M. (2011). *Evaluación de la influencia del bioestímulo sobre un suelo contaminado con diésel y su integración a la gestión ambiental*. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Reddi, L., & Inyand, H. (2000). *Geoenvironmental Engineering, Principles and applications*. . USA: Editorial Marcel Dekker.
- Riffaldi, R. (2005). *Soil Biological Activities In Monitoring The Bioremediation Of Diesel OilContaminated Soil [Journal] // Water, air and soil pollution*.
- Riser, E. (1992). *Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites*. . Editorial C. K. Smoley, USA.

- Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A., & Mackey, B. M. (1998). The effect of growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* .
- Romero, M. F. (2012). Modelización de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con gasoil. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Ingeniería en Biotecnología, Costa Rica.
- Sabaté, J., Vinas, M., & Solanas, A. (2004). Laboratory-scale biorremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soil. *International Biodeterioration & biodegradation*.
- Salinas, A., Santo, M., Soto, O., Delgado, E., Pérez, H., Aguad, L., & Medrano, H. (2007). Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium.
- Saponaro, S., Bonomo, L., Petruzzelli, G., Romote, L., & Barbaferi, M. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons slurry phase bioremediation of a manufactured gas plant site aged soil. *Water, Air, soil Pollution* .
- Semple, K. T., Dew, N., Doick, K., & Rhodes, A. (2006). Can microbial mineralization be used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil? *Environmental Pollution*.
- Sessitsch, A. (2001). Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment [Journal] // APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.
- Shannon, M. J., & Unterman, R. (1993). Evaluating bioremediation: distinguishing fact from fiction. *Annual Review of Microbiology* .
- SICA. (2017). Obtenido de <https://www.sica.int/consulta/Noticia.aspx?Idn=116040&idm=1#:~:text=En%20todo%20el%20a%C3%B1o%20se,35.86%20por%20ciento%20del%20tota>
- Solanas, A. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona.
- Song, H.-G., Wang, X., & Bartha, R. (1990). Biorremediation Potencial of Terrestrial Spills [Journal].
- Stelmack, P., Gray, M., & Pickard, M. (1999). Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. Estados Unidos.
- Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., and Van Impe, J. F. . (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review *International Journal of Food Microbiology*.

- Talat Saeed, H. A.-H., & Al-Matrouk, K. (1998). Assessment of the changes in the chemical composition of the crude oil spilled in the kuwait desert after weathering for five years [Journal] // Environment International.
- Thomassin-Lacroix, E., Eriksson, M., Reimer, K., & Mohn, W. (2002). Biostimulation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. Applied Microbiology Biotechnology. .
- Thomsen, I. K. (1999). Turnover of organic matter in differently textured soils II. Microbial activity as influenced by soil water regimes [Journal] // Geoderma.
- Tiessier, U. (1942). Rey. ScL Extrair 3208, 209. (citado por Moraine y Rogovin, 1971; Esener y col.. 1983).
- Trejos, V., Alzate, J., & Gómez, M. G. (2009). Descripción Matemática y Análisis de Estabilidad. Medellin: Universidad Nacional de Colombia.
- Tremier, A. (2005). A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted [Journal]// Bioresource Technology.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology.
- Vasudevan, N., & Rajaram, P. (2001). Bioremediation of oil sludgecontaminated soil. Environment International.
- Venosa, A., Stephen, J., Macnaughton, S., Chang, Y., & White, D. (1999). Microbial populations changes during bioremediation of an experimental oil spill. Microbial Biosystems: New Frontiers. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canada.
- Viñas, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis doctoral. . Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Volkering, F., Breure, A., & Rulkens, W. (1998). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation [Journal] // Biodegradation.
- Wang. (2008). Petroleum Hydrocarbon Degradation Potential of Soil Bacteria Native to the Yellow River Delta [Journal] // Pedosphere.
- Watanabe, K. (2001). Microrganisms relevants to bioremediation. Environmental Biotechnology. .
- Wayens, C. B. (2004). Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por Acinetobacter sp. y Pseudomonas putida para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. Cartago.

- Weelman, D., Ulery, A., Barcellona, M., & Duerr – Auster, S. (2001). Animal waster – enhanced degradation of hidrocarbon – contaminated soil. Soil Sediment Contaminat. .
- Young, C-C; Lin, T-C.;Yeh, M-S;Shen, F-T.;Chang, J-S. (2005). Identification and kinetic characteristics of an indigenous diesel-degrading *Gordonia alkanivorans* strain.
- Young-Gyun, C., Sung-Keun, R., & Sung-Taik, L. (2000). Effect of soil moisture on biorremediation of cholopheno-contaminated soil [Journal] // Biotechnology Letters.

Anexos

Índice de Anexos

Anexo I. Composición del caldo BHB.....	ii
Anexo II. Tablas de las mediciones de concentración de biomasa en los tres tipos de consorcios.....	iii
Anexo III. Tablas de los datos experimentales	iv
Anexos IV. Programas en Matlab para encontrar los parámetros cinéticos.....	viii
Anexo V. Programas en Berkeley Madonna para encontrar los parámetros cinéticos.....	xx
Anexo VI. Tablas de resultados con los parámetros encontrados con Matlab	xxii
Anexo VII. Tablas de resultados con los parámetros encontrados con Berkeley Madonna.....	xxviii
Anexo VIII: Métodos y procedimientos para la determinación de las concentraciones de biomasa microbiana y la concentración de hidrocarburos totales in vitro durante su crecimiento en sustrato diésel como única fuente de energía y carbono	xxxiv
Anexo IX: Métodos y procedimientos para el establecimiento de la influencia de los parámetros tipos de consorcio, concentración del sustrato y temperatura en el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro	xxxvii
Anexo X: Composición microbiana de consorcios A, B y C por especies	xxxix

Anexo I. Composición del caldo BHB

Tabla 1.1. Composición del caldo BHB

Compuesto	Composición
MgSO ₄	0.20 g
CaCl ₂	0.02 g
KH ₂ PO ₄	1.00 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.00 g
KNO ₃	1.00 g
FeCl ₃	0.05 g
Composición por litro de agua	

Anexo II. Tablas de las mediciones de concentración de biomasa en los tres tipos de consorcios

Tabla 2.1: Datos de concentración de biomasa para cada uno de los consorcios utilizados

Tiempo	Consortio A	Consortio B	Consortio C
horas	Concentración	Concentración	Concentración
	g_{células}/L	g_{células}/L	g_{células}/L
0	26.57	26.57	124.75
10	59.3	59.3	190.19
20	157.47	157.47	222.92
30	321.09	1564.62	779.24
40	3855.34	3528.09	2415.46
50	4051.69	3855.34	2546.36
60	4706.18	3920.79	2742.71
70	4837.07	3933.88	2808.15
80	5033.42	3933.88	2873.6
90	5818.81	3933.88	2873.6
100	6080.6	3940.42	2611.81
110	6211.5	3940.42	2546.36
120	6080.6	3940.42	2546.36
130	6146.05	3940.42	2480.91
140	6211.5	3940.42	2480.91
150	6276.95	3953.51	2480.91
160	6211.5	3953.51	2480.91
170	6211.5	3953.51	2480.91

Anexo III. Tablas de los datos experimentales

Tabla 3.1: Datos experimentales a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel

Concentración inicial = 1 %, T=30° C; Consorcio A			
Tiempo	Conc. Biomasa	Conc.TPH	% Remoción
Horas	g células/L	g TPH/L	
0	0.01	25.00	
8	0.61	24.80	0.81
22	0.81	24.59	1.63
26	1.63	24.19	3.25
34	2.03	21.75	13.01
40	2.44	17.28	30.89
45	3.05	10.57	57.72
46	5.69	2.44	90.24
51	6.10	2.03	91.88
58	6.50	1.83	92.68
69	7.11	1.42	94.31
74	7.32	1.25	95.00
80	7.72	1.10	95.60
200	7.93	1.02	95.93

Tabla 3.2: Datos experimentales a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel

Concentración inicial = 3 %, T=30° C; Consorcio A			
Tiempo	Conc. Biomasa	Conc.TPH	% Remoción
Horas	g células/L	g TPH/L	
0.00	0.03	25.00	
6.00	0.83	24.38	2.50
20.00	1.67	20.83	16.68
30.00	3.13	14.58	41.68
33.00	5.25	7.29	70.83
34.00	6.25	5.00	80.00
48.00	7.71	3.75	85.00
50.00	7.81	3.00	88.00
56.00	8.13	2.50	90.00
70.00	8.96	1.88	92.48
76.00	9.17	1.80	92.80
90.00	9.38	1.77	92.92
160.00	9.38	1.67	93.32
180.00	9.58	1.25	95.00
195.00	9.58	0.83	96.68
250.00	9.58	0.63	97.48

Tabla 3.3: Datos experimentales corregidos a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel

Concentración inicial = 1 %, T=30° C; Consorcio A				
Tiempo	Conc. Biomasa	Conc. TPH	% Remoción	Velocidad de Remoción
Horas	g células/L	g TPH/L		g TPH/L *h
0	0.01	25.00		
5	0.38	24.88	0.48	0.0240
10	0.64	24.77	0.92	0.0230
15	0.71	24.70	1.20	0.0200
20	0.78	24.63	1.48	0.0185
25	1.47	24.26	2.96	0.0296
30	1.85	22.85	8.60	0.0717
35	2.12	20.77	16.92	0.1209
40	2.44	17.28	30.89	0.1931
45	3.05	10.57	57.72	0.3221
50	6.00	2.13	91.48	0.4574
55	6.34	1.91	92.36	0.4198
60	6.63	1.74	93.04	0.3877
65	6.91	1.56	93.76	0.3606
70	7.17	1.38	94.48	0.3374
75	7.41	1.02	95.92	0.3197
80	7.72	1.00	96.00	0.3000
85	7.72	1.00	96.00	0.2824
90	7.72	1.00	96.00	0.2667

Tabla 3.4: Datos experimentales corregidos a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel

Concentración inicial = 3 %, T=30° C; Consorcio A				
Tiempo	Conc. Biomasa	Conc.TPH	% Remoción	Velocidad de Remoción
Horas	g células/L	g TPH/L		g TPH/L*h
0	0.03	25.00		
5	0.70	24.48	2.08	0.104166667
10	1.07	23.36	6.55	0.223404762
15	1.37	22.10	11.62	0.253214286
20	1.67	20.83	16.68	0.253214286
25	2.40	17.71	29.18	0.625
30	3.13	14.58	41.68	0.625
35	6.35	4.91	80.36	1.933857143
40	6.88	4.46	82.14	0.089285714
45	7.40	4.02	83.93	0.089285714
50	7.90	3.00	88.00	0.203571429
55	8.08	2.58	89.67	0.083333333
60	8.37	2.32	90.71	0.052095238
65	8.66	2.10	91.59	0.044285714
70	8.96	1.88	92.48	0.044285714
75	9.13	1.81	92.75	0.013333333
80	9.23	1.79	92.83	0.004380952
85	9.31	1.78	92.88	0.002142857
90	9.38	1.77	92.92	0.002142857

Anexos IV. Programas en Matlab para encontrar los parámetros cinéticos

```

1      %Metodo: Gauss-Newton.
2      %Hecho por: Br. Linda Fitoria.
3      %      Br. Carlos Quiroz.
4      %Tema: Estudio del comportamiento cinético de los procesos de degradación
5      %de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos in vitro.
6      %Tesis 2021-UNI-Ingeniería Química
7      %Parámetros cinéticos del Modelo de Monod
8      %CO=1%
9
10     clear
11     clc
12
13     %% Valores experimentales
14
15     t=[0;5;10;15;20;25;30;35;40;45;50;55;60;65;70;75;80;85;90];
16     X=[0.01;0.38;0.64;0.71;0.78;1.47;1.85;2.12;2.44;3.05;6;6.34;6.63;6.91;7.17;7.41;7.72;7.72;7.72];
17     C=[25;24.88;24.77;24.70;24.63;24.26;22.85;20.77;17.28;10.57;2.13;1.91;1.74;1.56;1.38;1.02;1;1;1];
18
19     %% Dimensiones
20     Xi = zeros(19,1);
21     d = zeros(19,1);
22     derivada1 = zeros(19,1);
23     derivada2 = zeros(19,1);
24     derivada3 = zeros(19,1);
25     derivada4 = zeros(19,1);
26     derivada5 = zeros(19,1);
27
28     Ci = zeros(19,1);
29     f = zeros(19,1);
30     derivada6 = zeros(19,1);
31
32     derivada7 = zeros(19,1);
33     derivada8 = zeros(19,1);
34     derivada9 = zeros(19,1);
35     derivada10 = zeros(19,1);
36     m_derivadas = zeros(19,10);
37
38     %% Metodo
39
40     x=[0.52;3.2;0.026;0.1];
41     n=19;
42     k=1;
43     f1=1;
44     f2=1;
45     f3=1;
46     f4=1;
47     while (f1>0.1 && f2>0.1 && f3>0.1 && f4>0.1)
48         if k>500
49             error('Numero maximo de iteraciones')
50         end
51         for i=2:n
52             Xi(i)=X(i-1)+((X(i-1)*x(3)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1)))*(t(i)-t(i-1));
53             d(i)=X(i)-Xi(i);
54             derivada1(i)=((-X(i-1)*x(3)*x(2))/((x(2)+C(i-1)-x(1))^2))*(t(i)-t(i-1)); %Io
55             derivada2(i)=((-X(i-1)*x(3)*(C(i-1)-x(1)))/((x(2)+C(i-1)-x(1))^2))*(t(i)-t(i-1)); %Ks
56             derivada3(i)=(X(i-1)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1))*(t(i)-t(i-1)); %umax
57             derivada4(i)=0; %Y
58
59             Ci(i)=C(i-1)+((X(i-1)*-x(3)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1)))*(1/x(4))*(t(i)-t(i-1));
60             f(i)=C(i)-Ci(i);

```

```

61 -     derivada5(i)= ((X(i-1)*x(3)*x(2))/((x(2)+C(i-1)-x(1))^2))*(1/x(4))*(t(i)-t(i-1)); %I0
62 -     derivada6(i)= ((X(i-1)*x(3)*(C(i-1)-x(1)))/((x(2)+C(i-1)-x(1))^2))*(1/x(4))*(t(i)-t(i-1)); %Ks
63 -     derivada7(i)= ((-X(i-1)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1)))*(1/x(4))*(t(i)-t(i-1)); %umax
64 -     derivada8(i)= ((X(i-1)*x(3)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1)))*(1/(x(4)^2))*(t(i)-t(i-1)); %Y
65 -
66 -     end
67 -     m_derivadas(:,1) = derivada1;
68 -     m_derivadas(:,2) = derivada2;
69 -     m_derivadas(:,3) = derivada3;
70 -     m_derivadas(:,4) = derivada4;
71 -     m_sumas1 = m_derivadas(:,1:4);
72 -
73 -     m_derivadas(:,5) = derivada5;
74 -     m_derivadas(:,6) = derivada6;
75 -     m_derivadas(:,7) = derivada7;
76 -     m_derivadas(:,8) = derivada8;
77 -     m_sumas2= m_derivadas(:,5:8);
78 -
79 -     m_transpuesta1 = m_sumas1';
80 -     m_transpuesta2 = m_sumas2';
81 -
82 -     matrizA1= m_transpuesta1*m_sumas1;
83 -     matrizA2= m_transpuesta2*m_sumas2;
84 -     matrizA= matrizA1+matrizA2;
85 -
86 -     matrizB1 = m_transpuesta1 * d;
87 -     matrizB2 = m_transpuesta2 * f;
88 -     matrizB = matrizB1+matrizB2;
89 -
90 -     S=matrizA\matrizB;
91 -     x_1=x+S;
92 -
93 -     f1=abs((x_1(1)-x(1))/x_1(1));
94 -     f2=abs((x_1(2)-x(2))/x_1(2));
95 -     f3=abs((x_1(3)-x(3))/x_1(3));
96 -     f4=abs((x_1(4)-x(4))/x_1(4));
97 -     x=x_1;
98 -     k=k+1;
99 -     end
100 -
101 -     %% Resultados
102 -     disp('El valor de I0 es');
103 -     disp(x_1(1));
104 -     disp('El valor de Ks es');
105 -     disp(x_1(2));
106 -     disp('El valor de umax es');
107 -     disp(x_1(3));
108 -     disp('El valor de Yx/s es');
109 -     disp(x_1(4));
110 -     disp(' ');
111 -     disp('El número de iteraciones necesarias fueron');
112 -     disp(k);

```

Figura 4.1: Modelo de Monod a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

```

1  %Metodo: Gauss-Newton.
2  %Hecho por: Br. Linda Fitoria.
3  %      Br. Carlos Quiroz.
4  %Tema: Estudio del comportamiento cinético de los procesos de degradación
5  %de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos in vitro.
6  %Tesis 2021-UNI-Ingeniería Química
7  %Parámetros cinéticos del Modelo de Tiesser
8  %C0=1%
9
10 clear
11 clc
12
13 %% Valores experimentales
14
15 t=[0;5;10;15;20;25;30;35;40;45;50;55;60;65;70;75;80;85;90];
16 X=[0.01;0.38;0.64;0.71;0.78;1.47;1.85;2.12;2.44;3.05;6;6.34;6.63;6.91;7.17;7.41;7.72;7.72];
17 C=[25;24.88;24.77;24.70;24.63;24.26;22.85;20.77;17.28;10.57;2.13;1.91;1.74;1.56;1.38;1.02;1;1;1];
18
19 %% Dimensiones
20 Xi = zeros(19,1);
21 d = zeros(19,1);
22 derivada1 = zeros(19,1);
23 derivada2 = zeros(19,1);
24 derivada3 = zeros(19,1);
25 derivada4 = zeros(19,1);
26 derivada5 = zeros(19,1);
27
28 Ci = zeros(19,1);
29 f = zeros(19,1);
30 derivada6 = zeros(19,1);
31 derivada7 = zeros(19,1);
32 derivada8 = zeros(19,1);
33 derivada9 = zeros(19,1);
34 derivada10 = zeros(19,1);
35 m_derivadas = zeros(19,10);
36
37
38 %% Metodo
39 x=[1.2;0.025;0.4];
40 n=19;
41 k=1;
42 f1=1;
43 f2=1;
44 f3=1;
45 while (f1>0.1 && f2>0.1 && f3>0.1)
46     if k>500
47         error('Numero maximo de iteraciones')
48     end
49
50     for i=2:n
51         Xi(i)= X(i-1)+(X(i-1)*x(2)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1))))*(t(i)-t(i-1)));
52         d(i)= X(i)-Xi(i);
53         derivada1(i)= (-X(i-1)*x(2)*C(i-1)*(exp(-C(i-1)/x(1)))*(1/x(1)^2))*(t(i)-t(i-1)); %Ks
54         derivada2(i)= (X(i-1)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1))))*(t(i)-t(i-1))); %umax
55         derivada3(i)= 0; %Y
56
57         Ci(i)= C(i-1)+(-X(i-1)*x(2)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1)))*(1/x(3)))*(t(i)-t(i-1)));
58         f(i)= C(i)-Ci(i);
59         derivada4(i)= (X(i-1)*x(2)*C(i-1)*(exp(-C(i-1)/x(1)))*(1/x(1)^2)*(1/x(3)))*(t(i)-t(i-1)); %Ks
60         derivada5(i)= (-X(i-1)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1)))*(1/x(3)))*(t(i)-t(i-1))); %umax

```

```

61 -         derivada6(i)= (X(i-1)*x(2)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1))))*(1/(x(3)^2)))*(t(i)-t(i-1)); %Y
62 -     end
63
64 -     m_derivadas(:,1) = derivada1;
65 -     m_derivadas(:,2) = derivada2;
66 -     m_derivadas(:,3) = derivada3;
67 -     m_sumas1 = m_derivadas(:,1:3);
68
69 -     m_derivadas(:,4) = derivada4;
70 -     m_derivadas(:,5) = derivada5;
71 -     m_derivadas(:,6) = derivada6;
72 -     m_sumas2= m_derivadas(:,4:6);
73
74 -     m_transpuesta1 = m_sumas1';
75 -     m_transpuesta2 = m_sumas2';
76
77 -     matrizA1= m_transpuesta1*m_sumas1;
78 -     matrizA2= m_transpuesta2*m_sumas2;
79 -     matrizA= matrizA1+matrizA2;
80
81 -     matrizB1 = m_transpuesta1 * d;
82 -     matrizB2 = m_transpuesta2 * f;
83 -     matrizB = matrizB1+matrizB2;
84
85 -     S=matrizA\matrizB;
86 -     x_l=x+S;
87
88
89 -     f1=abs((x_l(1)-x(1))/x_l(1));
90 -     f2=abs((x_l(2)-x(2))/x_l(2));
91 -     f3=abs((x_l(3)-x(3))/x_l(3));
92 -     x=x_l;
93 -     k=k+1;
94 - end
95
96     %% Resultados
97 -     disp('El valor de Ks es');
98 -     disp(x_l(1));
99 -     disp('El valor de umax es');
100 -     disp(x_l(2));
101 -     disp('El valor de Yx/s es');
102 -     disp(x_l(3));
103 -     disp(' ');
104 -     disp('El número de iteraciones necesarias fueron');
105 -     disp(k);

```

Figura 4.2: Modelo de Teisser a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

```

1 %Metodo: Gauss-Newton.
2 %Hecho por: Br. Linda Fitoria.
3 % Br. Carlos Quiroz.
4 %Tema: Estudio del comportamiento cinético de los procesos de degradación
5 %de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos in vitro.
6 %Tesis 2021-UNI-Ingeniería Química
7 %Parámetros cinéticos del Modelo de Moser
8 %C0=1%
9
10 clear
11 clc
12
13 t=[0;5;10;15;20;25;30;35;40;45;50;55;60;65;70;75;80;85;90];
14 X=[0.01;0.38;0.64;0.71;0.78;1.47;1.85;2.12;2.44;3.05;6;6.34;6.63;6.91;7.17;7.41;7.72;7.72;7.72];
15 C=[25;24.88;24.77;24.70;24.63;24.26;22.85;20.77;17.28;10.57;2.13;1.91;1.74;1.56;1.38;1.02;1;1;1];
16
17 %% Dimensiones
18 Xi = zeros(19,1);
19 d = zeros(19,1);
20 derivada1 = zeros(19,1);
21 derivada2 = zeros(19,1);
22 derivada3 = zeros(19,1);
23 derivada4 = zeros(19,1);
24 derivada5 = zeros(19,1);
25
26 Ci = zeros(19,1);
27 f = zeros(19,1);
28 derivada6 = zeros(19,1);
29 derivada7 = zeros(19,1);
30 derivada8 = zeros(19,1);

```

```

31 derivada9 = zeros(19,1);
32 derivada10 = zeros(19,1);
33 m_derivadas = zeros(19,10);
34
35 %% Metodo
36
37 x=[15;0.025;0.1;1.5];
38 n=19;
39 k=1;
40 f1=1;
41 f2=1;
42 f3=1;
43 f4=1;
44 while (f1>0.1 && f2>0.1 && f3>0.1 && f4>0.1)
45     if k>500
46         error('Numero maximo de iteraciones')
47     end
48
49     for i=2:n
50         Xi(i)=X(i-1)+(((X(i-1)*x(2)*(C(i-1)^x(4)))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(t(i)-t(i-1)));
51         d(i)= X(i)-Xi(i);
52         derivada1(i)= (-X(i-1)*x(2)*(C(i-1)^x(4))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))^2))*(t(i)-t(i-1)); %Ka
53         derivada2(i)= (X(i-1)*(C(i-1)^x(4))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(t(i)-t(i-1)); %umax
54         derivada3(i)= 0;
55         derivada4(i)= ((X(i-1)*((x(2)*(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(C(i-1)^x(4)*log(C(i-1))))...
56             -(x(2)*(C(i-1)^x(4))*((C(i-1)^x(4))*log(C(i-1)))))/(x(2)+(C(i-1)^x(4))^2))*(t(i)-t(i-1)); %n
57
58         Ci(i)= C(i-1)+(((X(i-1)*x(2)*(C(i-1)^x(4)))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(1/x(3))*(t(i)-t(i-1)));
59         f(i)= C(i)-Ci(i);
60         derivada5(i)= ((-X(i-1)*x(2)*(C(i-1)^x(4))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))^2))*(1/x(3))*(t(i)-t(i-1)); %Ka

```

```

61 - derivada6(i)= ((-X(i-1)*(C(i-1)^x(4))/(x(i)+(C(i-1)^x(4))))*(1/x(3)))^(t(i)-t(i-1)); %umax
62 - derivada7(i)= ((X(i-1)*x(2)*(C(i-1)^x(4))/(x(i)+(C(i-1)^x(4))))*(1/(x(3)^2)))^(t(i)-t(i-1)); %V
63 - derivada8(i)= (((-X(i-1)*((x(2)*(x(i)+(C(i-1)^x(4)))*(C(i-1)^x(4))*log(C(i-1))))...
64 - (-X(2)*(C(i-1)^x(4))*(C(i-1)^x(4))*log(C(i-1)))))/(x(2)+(C(i-1)^x(4))^2))*(1/x(3))^(t(i)-t(i-1)); %n
65 - end
66
67 - m_derivadas(:,1) = derivada1;
68 - m_derivadas(:,2) = derivada2;
69 - m_derivadas(:,3) = derivada3;
70 - m_derivadas(:,4) = derivada4;
71 - m_sumas1 = m_derivadas(:,1:4);
72
73 - m_derivadas(:,5) = derivada5;
74 - m_derivadas(:,6) = derivada6;
75 - m_derivadas(:,7) = derivada7;
76 - m_derivadas(:,8) = derivada8;
77 - m_sumas2 = m_derivadas(:,5:8);
78
79 - m_transpuesta1 = m_sumas1';
80 - m_transpuesta2 = m_sumas2';
81
82 - matrizA1 = m_transpuesta1*m_sumas1;
83 - matrizA2 = m_transpuesta2*m_sumas2;
84 - matrizA = matrizA1+matrizA2;
85
86 - matrizB1 = m_transpuesta1 * d;
87 - matrizB2 = m_transpuesta2 * f;
88 - matrizB = matrizB1+matrizB2;
89
90 - S=matrizA\matrizB;

```

```

91 - x_1=x+S;
92
93 - f1=abs((x_1(1)-x(1))/x_1(1));
94 - f2=abs((x_1(2)-x(2))/x_1(2));
95 - f3=abs((x_1(3)-x(3))/x_1(3));
96 - f4=abs((x_1(4)-x(4))/x_1(4));
97 - x=x_1;
98 - k=k+1;
99 - end
100
101
102 %% Resultados
103 - disp('El valor de Ks es');
104 - disp(x_1(1));
105 - disp('El valor de umax es');
106 - disp(x_1(2));
107 - disp('El valor de Yx/s es');
108 - disp(x_1(3));
109 - disp('El valor de n es');
110 - disp(x_1(4));
111 - disp(' ');
112 - disp('El número de iteraciones necesarias fueron');
113 - disp(k);

```

Figura 4.3: Modelo de Moser a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

```

1 %Metodo: Gauss-Newton.
2 %Hecho por: Br. Linda Fitoria.
3 % Br. Carlos Quiroz.
4 %Tema: Estudio del comportamiento cinético de los procesos de degradación
5 %de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos in vitro.
6 %Tesis 2021-UNI-Ingeniería Química
7 %Parámetros cinéticos del Modelo de Monod
8 %C0=3%
9
10 clear
11 clc
12
13 %% Valores experimentales
14
15 t=[0;5;10;15;20;25;30;35;40;45;50;55;60;65;70;75;80;85;90];
16 X=[0.03;0.70;1.07;1.37;1.67;2.40;3.13;6.35;6.88;7.40;7.90;8.08;8.37;8.66;8.96;9.13;9.23;9.31;9.38];
17 C=[25;24.48;23.36;22.10;20.83;17.71;14.58;4.91;4.46;4.02;3;2.58;2.32;2.10;1.88;1.81;1.79;1.78;1.77];
18
19 %% Dimensiones
20 Xi = zeros(19,1);
21 d = zeros(19,1);
22 derivada1 = zeros(19,1);
23 derivada2 = zeros(19,1);
24 derivada3 = zeros(19,1);
25 derivada4 = zeros(19,1);
26 derivada5 = zeros(19,1);
27
28 Ci = zeros(19,1);
29 f = zeros(19,1);
30 derivada6 = zeros(19,1);
31 derivada7 = zeros(19,1);
32 derivada8 = zeros(19,1);
33 derivada9 = zeros(19,1);
34 derivada10 = zeros(19,1);
35 m_derivadas = zeros(19,10);
36
37 %% Metodo
38
39 x=[1.6;1.1;0.037;0.4];
40 n=19;
41 k=1;
42 f1=1;
43 f2=1;
44 f3=1;
45 f4=1;
46 while (f1>0.1 && f2>0.1 && f3>0.1 && f4>0.1)
47     if k>500
48         error('Numero maximo de iteraciones')
49     end
50
51     for i=2:n
52         Xi(i)=X(i-1)+((X(i-1)*x(3)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1)))*(t(i)-t(i-1));
53         d(i)=X(i)-Xi(i);
54         derivada1(i)=((-X(i-1)*x(3)*x(2))/((x(2)+C(i-1)-x(1))^2))*(t(i)-t(i-1)); %Io
55         derivada2(i)=((-X(i-1)*x(3)*(C(i-1)-x(1)))/((x(2)+C(i-1)-x(1))^2))*(t(i)-t(i-1)); %Ks
56         derivada3(i)=(X(i-1)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1))*(t(i)-t(i-1)); %umax
57         derivada4(i)=0; %Y
58
59         Ci(i)=C(i-1)+((X(i-1)*-x(3)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1)))*(1/x(4))*(t(i)-t(i-1));

```

```

60 -         f(i)=C(i)-Ci(i);
61 -         derivada5(i)= ((X(i-1)*x(3)*x(2))/((x(2)+C(i-1)-x(1))^2))*(1/x(4))*(t(i)-t(i-1)); %Io
62 -         derivada6(i)= ((X(i-1)*x(3)*(C(i-1)-x(1)))/((x(2)+C(i-1)-x(1))^2))*(1/x(4))*(t(i)-t(i-1)); %Ks
63 -         derivada7(i)= ((-X(i-1)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1)))*(1/x(4))*(t(i)-t(i-1)); %umax
64 -         derivada8(i)= ((X(i-1)*x(3)*(C(i-1)-x(1)))/(x(2)+C(i-1)-x(1)))*(1/(x(4)^2))*(t(i)-t(i-1)); %Y
65 -     end
66
67 -     m_derivadas(:,1) = derivada1;
68 -     m_derivadas(:,2) = derivada2;
69 -     m_derivadas(:,3) = derivada3;
70 -     m_derivadas(:,4) = derivada4;
71 -     m_sumas1 = m_derivadas(:,1:4);
72
73 -     m_derivadas(:,5) = derivada5;
74 -     m_derivadas(:,6) = derivada6;
75 -     m_derivadas(:,7) = derivada7;
76 -     m_derivadas(:,8) = derivada8;
77 -     m_sumas2= m_derivadas(:,5:8);
78
79 -     m_transpuesta1 = m_sumas1';
80 -     m_transpuesta2 = m_sumas2';
81
82 -     matrizA1= m_transpuesta1*m_sumas1;
83 -     matrizA2= m_transpuesta2*m_sumas2;
84 -     matrizA= matrizA1+matrizA2;
85
86 -     matrizB1 = m_transpuesta1 * d;
87 -     matrizB2 = m_transpuesta2 * f;
88 -     matrizB = matrizB1+matrizB2;
89
90 -     S=matrizA\matrizB;
91 -     x_1=x+S;
92
93 -     f1=abs((x_1(1)-x(1))/x_1(1));
94 -     f2=abs((x_1(2)-x(2))/x_1(2));
95 -     f3=abs((x_1(3)-x(3))/x_1(3));
96 -     f4=abs((x_1(4)-x(4))/x_1(4));
97 -     x=x_1;
98 -     k=k+1;
99 - end
100
101 - %% Resultados
102 - disp('El valor de I0 es');
103 - disp(x_1(1));
104 - disp('El valor de Ks es');
105 - disp(x_1(2));
106 - disp('El valor de umax es');
107 - disp(x_1(3));
108 - disp('El valor de Yx/s es');
109 - disp(x_1(4));
110 - disp(' ');
111 - disp('El número de iteraciones necesarias fueron');
112 - disp(k);

```

Figura 4.4: Modelo de Monod a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.


```

1  %Metodo: Gauss-Newton
2  %Metodo Gauss-Newton.
3  %Hecho por: Br. Linda Fitoria.
4  %      Br. Carlos Quiroz.
5  %Tema: Estudio del comportamiento cinético de los procesos de degradación
6  %de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos in vitro.
7  %Tesis 2021-UNI-Ingeniería Química
8  %Parámetros cinéticos del Modelo de Tiesser
9  %CO=3%
10
11 - clear
12 - clc
13
14  %% Valores experimentales
15
16 - t=[0;5;10;15;20;25;30;35;40;45;50;55;60;65;70;75;80;85;90];
17 - X=[0.03;0.70;1.07;1.37;1.67;2.40;3.13;6.35;6.88;7.40;7.90;8.08;8.37;8.66;8.96;9.13;9.23;9.31;9.38];
18 - C=[25;24.48;23.36;22.10;20.83;17.71;14.58;4.91;4.46;4.02;3;2.58;2.32;2.10;1.88;1.81;1.79;1.78;1.77];
19
20  %% Dimensiones
21 - Xi = zeros(19,1);
22 - d = zeros(19,1);
23 - derivada1 = zeros(19,1);
24 - derivada2 = zeros(19,1);
25 - derivada3 = zeros(19,1);
26 - derivada4 = zeros(19,1);
27 - derivada5 = zeros(19,1);
28
29 - Ci = zeros(19,1);
30 - f = zeros(19,1);
31 - derivada6 = zeros(19,1);
32 - derivada7 = zeros(19,1);
33 - derivada8 = zeros(19,1);
34 - derivada9 = zeros(19,1);
35 - derivada10 = zeros(19,1);
36 - m_derivadas = zeros(19,10);
37
38  %% Metodo
39 - x=[1;0.03;0.34];
40 - n=19;
41 - k=1;
42 - f1=1;
43 - f2=1;
44 - f3=1;
45 - while (f1>0.1 && f2>0.1 && f3>0.1)
46 -     if k>500
47 -         error('Numero maximo de iteraciones')
48 -     end
49
50 -     for i=2:n
51 -         Xi(i) = X(i-1)+(X(i-1)*x(2)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1)))))*(t(i)-t(i-1));
52 -         d(i) = X(i)-Xi(i);
53 -         derivada1(i) = (-X(i-1)*x(2)*C(i-1)*(exp(-C(i-1)/x(1)))*(1/x(1)^2))*(t(i)-t(i-1)); %Ks
54 -         derivada2(i) = (X(i-1)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1))))*(t(i)-t(i-1))); %umax
55 -         derivada3(i) = 0; %Y
56
57 -         Ci(i) = C(i-1)+(-X(i-1)*x(2)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1)))*(1/x(3)))*(t(i)-t(i-1)));
58 -         f(i) = C(i)-Ci(i);
59 -         derivada4(i) = (X(i-1)*x(2)*C(i-1)*(exp(-C(i-1)/x(1)))*(1/x(1)^2)*(1/x(3)))*(t(i)-t(i-1)); %Ks
60 -         derivada5(i) = (-X(i-1)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1)))*(1/x(3)))*(t(i)-t(i-1))); %umax

```

```

61 -     derivada6(i)= (X(i-1)*x(2)*(1-(exp(-C(i-1)/x(1))))*(1/(x(3)^2)))*(t(i)-t(i-1)); %Y
62 -     end
63
64 -     m_derivadas(:,1) = derivada1;
65 -     m_derivadas(:,2) = derivada2;
66 -     m_derivadas(:,3) = derivada3;
67 -     m_sumas1 = m_derivadas(:,1:3);
68
69 -     m_derivadas(:,4) = derivada4;
70 -     m_derivadas(:,5) = derivada5;
71 -     m_derivadas(:,6) = derivada6;
72 -     m_sumas2= m_derivadas(:,4:6);
73
74 -     m_transpuesta1 = m_sumas1';
75 -     m_transpuesta2 = m_sumas2';
76
77 -     matrizA1= m_transpuesta1*m_sumas1;
78 -     matrizA2= m_transpuesta2*m_sumas2;
79 -     matrizA= matrizA1+matrizA2;
80
81 -     matrizB1 = m_transpuesta1 * d;
82 -     matrizB2 = m_transpuesta2 * f;
83 -     matrizB = matrizB1+matrizB2;
84
85 -     S=matrizA\matrizB;
86 -     x_l=x+S;
87
88
89 -     f1=abs((x_l(1)-x(1))/x_l(1));
90 -     f2=abs((x_l(2)-x(2))/x_l(2));
91 -     f3=abs((x_l(3)-x(3))/x_l(3));
92 -     x=x_l;
93 -     k=k+1;
94 -     end
95
96 -     %% Resultados
97 -     disp('El valor de Ks es');
98 -     disp(x_l(1));
99 -     disp('El valor de umax es');
100 -     disp(x_l(2));
101 -     disp('El valor de Yx/s es');
102 -     disp(x_l(3));
103 -     disp(' ');
104 -     disp('El número de iteraciones necesarias fueron');
105 -     disp(k);

```

Figura 4.5: Modelo de Teisser a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

```

1 %Metodo: Gauss-Newton.
2 %Hecho por: Br. Linda Fitoria.
3 % Br. Carlos Quiroz.
4 %Tema: Estudio del comportamiento cinético de los procesos de degradación
5 %de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos in vitro.
6 %Tesis 2021-UNI-Ingeniería Química
7 %Parámetros cinéticos del Modelo de Moser
8 %CO=3%
9
10 - clear
11 - clc
12
13 - t=[0;5;10;15;20;25;30;35;40;45;50;55;60;65;70;75;80;85;90];
14 - X=[0.03;0.70;1.07;1.37;1.67;2.40;3.13;6.35;6.88;7.40;7.90;8.08;8.37;8.66;8.96;9.13;9.23;9.31;9.38];
15 - C=[25;24.48;23.36;22.10;20.83;17.71;14.58;4.91;4.46;4.02;3;2.58;2.32;2.10;1.88;1.81;1.79;1.78;1.77];
16
17 %% Dimensiones
18 - Xi = zeros(19,1);
19 - d = zeros(19,1);
20 - derivada1 = zeros(19,1);
21 - derivada2 = zeros(19,1);
22 - derivada3 = zeros(19,1);
23 - derivada4 = zeros(19,1);
24 - derivada5 = zeros(19,1);
25
26 - Ci = zeros(19,1);
27 - f = zeros(19,1);
28 - derivada6 = zeros(19,1);
29 - derivada7 = zeros(19,1);
30 - derivada8 = zeros(19,1);
31 - derivada9 = zeros(19,1);
32 - derivada10 = zeros(19,1);
33 - m_derivadas = zeros(19,10);
34
35 %% Metodo
36
37 - x=[7;0.3;0.3;1.5];
38 - n=19;
39 - k=1;
40 - f1=1;
41 - f2=1;
42 - f3=1;
43 - f4=1;
44 - while (f1>0.1 || f2>0.1 || f3>0.1 || f4>0.1)
45 -     if k>500
46 -         error('Numero maximo de iteraciones')
47 -     end
48
49 -     for i=2:n
50 -         Xi(i)=X(i-1)+(((X(i-1)*x(2)*(C(i-1)^x(4)))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(t(i)-t(i-1)));
51 -         d(i)= X(i)-Xi(i);
52 -         derivada1(i)= (-X(i-1)*x(2)*(C(i-1)^x(4))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))^2))*(t(i)-t(i-1)); %Mn
53 -         derivada2(i)= (X(i-1)*(C(i-1)^x(4))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(t(i)-t(i-1)); %umax
54 -         derivada3(i)= 0;
55 -         derivada4(i)= ((X(i-1)*((x(2)*(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(C(i-1)^x(4))*log(C(i-1))))...
56 -             -(x(2)*(C(i-1)^x(4))*((C(i-1)^x(4))*log(C(i-1)))))/(x(2)+(C(i-1)^x(4))^2))*(t(i)-t(i-1)); %n
57
58 -         Ci(i)= C(i-1)+(((X(i-1)*x(2)*(C(i-1)^x(4)))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(1/x(3)))*(t(i)-t(i-1)));
59 -         f(i)= C(i)-Ci(i);
60 -         derivada5(i)= ((X(i-1)*x(2)*(C(i-1)^x(4)))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))^2))*(1/x(3))*(t(i)-t(i-1)); %Ms

```

```

61 - derivada6(i)= 1-(X(i-1)* (C(i-1)^x(4))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(1/x(3))^ (t(i)-t(i-1)); %umax
62 - derivada7(i)= (X(i-1)*x(2)* (C(i-1)^x(4))/(x(1)+(C(i-1)^x(4))))*(1/x(3)^2))^ (t(i)-t(i-1)); %Y
63 - derivada8(i)= (-(X(i-1)* ((x(2)* (x(1)+(C(i-1)^x(4))))*( (C(i-1)^x(4))*log(C(i-1))))...
64 - -(x(2)* (C(i-1)^x(4))* ((C(i-1)^x(4))*log(C(i-1)))))/(x(2)+(C(i-1)^x(4))^2))*(1/x(3))^ (t(i)-t(i-1)); %n
65 - end
66
67 - m_derivadas(:,1) = derivada1;
68 - m_derivadas(:,2) = derivada2;
69 - m_derivadas(:,3) = derivada3;
70 - m_derivadas(:,4) = derivada4;
71 - m_sumas1 = m_derivadas(:,1:4);
72
73 - m_derivadas(:,5) = derivada5;
74 - m_derivadas(:,6) = derivada6;
75 - m_derivadas(:,7) = derivada7;
76 - m_derivadas(:,8) = derivada8;
77 - m_sumas2= m_derivadas(:,5:8);
78
79 - m_transpuesta1 = m_sumas1';
80 - m_transpuesta2 = m_sumas2';
81
82 - matrizA1= m_transpuesta1*m_sumas1;
83 - matrizA2= m_transpuesta2*m_sumas2;
84 - matrizA= matrizA1+matrizA2;
85
86 - matrizB1 = m_transpuesta1 * d;
87 - matrizB2 = m_transpuesta2 * f;
88 - matrizB = matrizB1+matrizB2;
90 - S=matrizA\matrizB;
91 - x_1=x+S;
92
93 - f1=abs((x_1(1)-x(1))/x_1(1));
94 - f2=abs((x_1(2)-x(2))/x_1(2));
95 - f3=abs((x_1(3)-x(3))/x_1(3));
96 - f4=abs((x_1(4)-x(4))/x_1(4));
97 - x=x_1;
98 - k=k+1;
99 - end
100
101
102 %% Resultados
103 - disp('El valor de Ks es');
104 - disp(x_1(1));
105 - disp('El valor de umax es');
106 - disp(x_1(2));
107 - disp('El valor de Yx/s es');
108 - disp(x_1(3));
109 - disp('El valor de n es');
110 - disp(x_1(4));
111 - disp(' ');
112 - disp('El número de iteraciones necesarias fueron');
113 - disp(k);

```

Figura 4.6: Modelo de Moser a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

Anexo V. Programas en Berkeley Madonna para encontrar los parámetros cinéticos

```
METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME = 90
DT = 5

{Type Equations Here.}

d/dt (X) = mu*X
init X=0.01
d/dt (C) = -(mu*X)/Yxs
init C= 25
mu=mumax*(C-Io)/(Ks+C-Io)
mumax = 0.05
Io=0.55
Ks = 3
Yxs = 0.15
```

Figura 5.1: Modelo de Monod a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

```
METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME = 90
DT = 5

{Type Equations Here.}

d/dt (X) = mu*X
init X=0.01
d/dt (C) = -(mu*X)/Yxs
init C= 25
mu=mumax*(1-exp(-C/Ks))
mumax = 0.025
Ks = 1.2
Yxs = 0.4
```

Figura 5.2: Modelo de Teisser a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

```
METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME = 90
DT = 5

{Type Equations Here.}

d/dt (X) = mu*X
init X=0.01
d/dt (C) = -(mu*X)/Yxs
init C= 25
mu=(mumax*C^n)/(Ks+C^n)
mumax = 0.025
Ks = 15
Yxs = 0.2
n=1.5
```

Figura 5.3: Modelo de Moser a una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

```

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME = 90
DT = 5

{Type Equations Here.}

d/dt (X) =mu*X
init X=0.03
d/dt (C) = -(mu*X)/Yxs
init C= 25
mu=mumax*(C-Io)/(Ks+C-Io)
mumax = 0.05
Io=1.6
Ks = 1
Yxs = 0.4

```

Figura 5.4: Modelo de Monod a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

```

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME = 90
DT = 5

{Type Equations Here.}

d/dt (X) =mu*X
init X=0.03
d/dt (C) = -(mu*X)/Yxs
init C= 25
mu=mumax*(1-exp(-C/Ks))
mumax = 0.03
Ks = 1
Yxs = 0.3

```

Figura 5.5: Modelo de Teisser a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

```

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME = 90
DT = 5

{Type Equations Here.}

d/dt (X) =mu*X
init X=0.03
d/dt (C) = -(mu*X)/Yxs
init C= 25
mu=(mumax*C^n)/(Ks+C^n)
mumax = 0.03
Ks = 7
Yxs = 0.3
n=1.5

```

Figura 5.6: Modelo de Moser a una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C.

Anexo VI. Tablas de resultados con los parámetros encontrados con Matlab

Tabla 6.1: Modelo de Monod con una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.01	25.0000	0.0100	25.0000
5	0.38	24.8800	0.0134	24.9873
10	0.64	24.7700	0.5103	24.3988
15	0.71	24.7000	0.8591	23.9608
20	0.78	24.6300	0.9529	23.8031
25	1.47	24.2600	1.0466	23.6457
30	1.85	22.8500	1.9697	22.4147
35	2.12	20.7700	2.4656	20.5768
40	2.44	17.2800	2.8005	18.2570
45	3.05	10.5700	3.1660	14.5992
50	6	2.1300	3.7575	7.9575
55	6.34	1.9100	6.3640	0.7860
60	6.63	1.7400	6.6786	0.6597
65	6.91	1.5600	6.9458	0.5737
70	7.17	1.3800	7.1959	0.5043
75	7.41	1.0200	7.4205	0.4550
80	7.72	1.0000	7.5695	0.4308
85	7.72	1.0000	7.8803	0.4080
90	7.72	1.0000	7.8803	0.4080

Tabla 6.2: Modelo de Teisser con una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.01	25.0000	0.0100	25.0000
5	0.38	24.8800	0.0154	24.9865
10	0.64	24.7700	0.5862	24.3679
15	0.71	24.7000	0.9867	23.9088
20	0.78	24.6300	1.0943	23.7455
25	1.47	24.2600	1.2018	23.5824
30	1.85	22.8500	2.2609	22.2955
35	2.12	20.7700	2.8250	20.4283
40	2.44	17.2800	3.1977	18.0933
45	3.05	10.5700	3.5850	14.4360
50	6	2.1300	4.1367	7.8709
55	6.34	1.9100	6.5835	0.6806
60	6.63	1.7400	6.8976	0.5251
65	6.91	1.5600	7.1646	0.4120
70	7.17	1.3800	7.4130	0.3105
75	7.41	1.0200	7.6349	0.2251
80	7.72	1.0000	7.7701	0.1255
85	7.72	1.0000	8.0881	0.0857
90	7.72	1.0000	8.0881	0.0857

Tabla 6.3: Modelo de Moser con una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.01	25.0000	0.0100	25.0000
5	0.38	24.8800	0.0147	24.9860
10	0.64	24.7700	0.5591	24.3467
15	0.71	24.7000	0.9414	23.8725
20	0.78	24.6300	1.0442	23.7049
25	1.47	24.2600	1.1469	23.5373
30	1.85	22.8500	2.1596	22.2063
35	2.12	20.7700	2.7081	20.2947
40	2.44	17.2800	3.0839	17.8995
45	3.05	10.5700	3.5000	14.1234
50	6	2.1300	4.1572	7.2729
55	6.34	1.9100	6.5561	0.4739
60	6.63	1.7400	6.8553	0.3753
65	6.91	1.5600	7.1105	0.3091
70	7.17	1.3800	7.3466	0.2597
75	7.41	1.0200	7.5572	0.2268
80	7.72	1.0000	7.6788	0.2196
85	7.72	1.0000	7.9927	0.1880
90	7.72	1.0000	7.9927	0.1880

Tabla 6.4: Modelo de Monod con una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.03	25.00	0.0300	25.0000
5	0.70	24.48	0.0436	24.9684
10	1.07	23.36	1.0145	23.7468
15	1.37	22.10	1.5437	22.2556
20	1.67	20.83	1.9657	20.7111
25	2.40	17.71	2.3817	19.1705
30	3.13	14.58	3.3640	15.4624
35	6.35	4.91	4.2903	11.8746
40	6.88	4.46	7.5662	2.0743
45	7.40	4.02	8.0994	1.6168
50	7.90	3.00	8.6016	1.2185
55	8.08	2.58	8.8792	0.7171
60	8.37	2.32	8.9387	0.5780
65	8.66	2.10	9.1627	0.4717
70	8.96	1.88	9.3921	0.3932
75	9.13	1.81	9.6228	0.3347
80	9.23	1.79	9.7739	0.3088
85	9.31	1.78	9.8718	0.2937
90	9.38	1.77	9.9527	0.2815

Tabla 6.5: Modelo de Teisser con una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.03	25.00	0.0300	25.0000
5	0.70	24.48	0.0349	24.9872
10	1.07	23.36	0.8145	24.1820
15	1.37	22.10	1.2449	22.9049
20	1.67	20.83	1.5937	21.5180
25	2.40	17.71	1.9422	20.1217
30	3.13	14.58	2.7884	16.6994
35	6.35	4.91	3.6287	13.2822
40	6.88	4.46	7.0775	3.0170
45	7.40	4.02	7.6287	2.5119
50	7.90	3.00	8.1589	2.0452
55	8.08	2.58	8.5729	1.2490
60	8.37	2.32	8.6994	0.9681
65	8.66	2.10	8.9638	0.7750
70	8.96	1.88	9.2298	0.6172
75	9.13	1.81	9.5010	0.4722
80	9.23	1.79	9.6650	0.4180
85	9.31	1.78	9.7661	0.3951
90	9.38	1.77	9.8483	0.3793

Tabla 6.6: Modelo de Moser con una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.03	25.00	0.0300	25.0000
5	0.70	24.48	0.0317	24.9919
10	1.07	23.36	0.7400	24.2902
15	1.37	22.10	1.1309	23.0707
20	1.67	20.83	1.4477	21.7309
25	2.40	17.71	1.7643	20.3820
30	3.13	14.58	2.5338	17.0749
35	6.35	4.91	3.3009	13.7687
40	6.88	4.46	6.6113	3.6691
45	7.40	4.02	7.1505	3.1756
50	7.90	3.00	7.6755	2.7118
55	8.08	2.58	8.1448	1.8375
60	8.37	2.32	8.3038	1.5174
65	8.66	2.10	8.5826	1.3105
70	8.96	1.88	8.8617	1.1421
75	9.13	1.81	9.1484	0.9852
80	9.23	1.79	9.3152	0.9308
85	9.31	1.78	9.4152	0.9107
90	9.38	1.77	9.4958	0.8980

Anexo VII. Tablas de resultados con los parámetros encontrados con Berkeley Madonna

Tabla 7.1: Modelo de Monod con una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.01	25	0.01	25
5	0.38	24.88	0.02	24.97
10	0.64	24.77	0.04	24.9
15	0.71	24.7	0.08	24.76
20	0.78	24.63	0.17	24.48
25	1.47	24.26	0.33	23.92
30	1.85	22.85	0.66	22.82
35	2.12	20.77	1.3	20.68
40	2.44	17.28	2.49	16.71
45	3.05	10.57	4.42	10.26
50	6	2.13	6.5	3.29
55	6.34	1.91	7	1.62
60	6.63	1.74	7.06	1.43
65	6.91	1.56	7.09	1.31
70	7.17	1.38	7.12	1.24
75	7.41	1.02	7.13	1.18
80	7.72	1	7.15	1.13
85	7.72	1	7.16	1.1
90	7.72	1	7.17	1.06

Tabla 7.2: Modelo de Teisser con una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.01	25	0.01	25
5	0.38	24.88	0.02	24.97
10	0.64	24.77	0.04	24.9
15	0.71	24.7	0.08	24.77
20	0.78	24.63	0.16	24.51
25	1.47	24.26	0.31	23.99
30	1.85	22.85	0.62	22.97
35	2.12	20.77	1.21	20.996
40	2.44	17.28	2.36	17.11
45	3.05	10.57	4.38	10.34
50	6	2.13	6.64	2.73
55	6.34	1.91	6.95	1.69
60	6.63	1.74	7.02	1.45
65	6.91	1.56	7.06	1.32
70	7.17	1.38	7.09	1.24
75	7.41	1.02	7.1	1.18
80	7.72	1	7.12	1.13
85	7.72	1	7.13	1.1
90	7.72	1	7.14	1.07

Tabla 7.3: Modelo de Moser con una concentración inicial del 1% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.01	25	0.01	25
5	0.38	24.88	0.02	24.95
10	0.64	24.77	0.04	24.86
15	0.71	24.7	0.07	24.68
20	0.78	24.63	0.14	24.35
25	1.47	24.26	0.26	23.72
30	1.85	22.85	0.48	22.54
35	2.12	20.77	0.9	20.35
40	2.44	17.28	1.64	16.5
45	3.05	10.57	2.8	10.5
50	6	2.13	4.02	4.11
55	6.34	1.91	4.58	1.23
60	6.63	1.74	4.73	0.41
65	6.91	1.56	4.78	0.17
70	7.17	1.38	4.8	0.083
75	7.41	1.02	4.8	0.046
80	7.72	1	4.81	0.0279
85	7.72	1	4.81	0.018
90	7.72	1	4.81	0.0123

Tabla 7.4: Modelo de Monod con una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.03	25	0.03	25
5	0.7	24.48	0.07	24.89
10	1.07	23.36	0.16	24.62
15	1.37	22.1	0.39	23.99
20	1.67	20.83	0.92	22.55
25	2.4	17.71	2.07	19.38
30	3.13	14.58	4.31	13.2
35	6.35	4.91	7.23	5.16
40	6.88	4.46	8.21	2.45
45	7.4	4.02	8.27	2.28
50	7.9	3	8.31	2.17
55	8.08	2.58	8.34	2.09
60	8.37	2.32	8.36	2.03
65	8.66	2.1	8.38	1.98
70	8.96	1.88	8.39	1.94
75	9.13	1.81	8.4	1.91
80	9.23	1.79	8.41	1.88
85	9.31	1.78	8.42	1.86
90	9.38	1.77	8.43	1.84

Tabla 7.5: Modelo de Teisser con una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.03	25	0.03	25
5	0.7	24.48	0.07	24.89
10	1.07	23.36	0.16	24.64
15	1.37	22.1	0.37	24.06
20	1.67	20.83	0.86	22.73
25	2.4	17.71	1.95	19.73
30	3.13	14.58	4.23	13.46
35	6.35	4.91	7.54	4.36
40	6.88	4.46	8.36	2.13
45	7.4	4.02	8.34	2.18
50	7.9	3	8.33	2.2
55	8.08	2.58	8.33	2.21
60	8.37	2.32	8.33	2.21
65	8.66	2.1	8.33	2.21
70	8.96	1.88	8.33	2.21
75	9.13	1.81	8.33	2.21
80	9.23	1.79	8.33	2.21
85	9.31	1.78	8.33	2.21
90	9.38	1.77	8.33	2.21

Tabla 7.6: Modelo de Moser con una concentración inicial del 3% (v/v) de diésel a una temperatura de 30°C

t (h)	X (g/L)	C (g/L)	Xi (g/L)	Ci (g/L)
0	0.03	25	0.03	25
5	0.7	24.48	0.05	24.73
10	1.07	23.36	0.1	24.24
15	1.37	22.1	0.18	23.37
20	1.67	20.83	0.32	21.83
25	2.4	17.71	0.56	19.2
30	3.13	14.58	0.94	15.02
35	6.35	4.91	1.46	9.32
40	6.88	4.46	1.95	3.92
45	7.4	4.02	2.2	1.23
50	7.9	3	2.27	0.37
55	8.08	2.58	2.3	0.12
60	8.37	2.32	2.3	0.045
65	8.66	2.1	2.31	0.018
70	8.96	1.88	2.31	0.0078
75	9.13	1.81	2.31	0.0036
80	9.23	1.79	2.31	0.0018
85	9.31	1.78	2.31	0.000094
90	9.38	1.77	2.31	0.00051

Anexo VIII: Métodos y procedimientos para la determinación de las concentraciones de biomasa microbiana y la concentración de hidrocarburos totales in vitro durante su crecimiento en sustrato diésel como única fuente de energía y carbono

De previo a esta etapa de investigación se han aislado y obtenido tres consorcios bacterianos adaptados al consumo de diésel como fuente única de carbono y energía, capaces de degradar a este hidrocarburo. Así mismo se ha realizado la caracterización de las comunidades bacterianas que integran estos consorcios obtenidos.

- Determinación de la concentración de biomasa

La concentración de biomasa con respecto al tiempo se determinó, midiendo la densidad óptica (DO) del cultivo mediante espectrofotometría a 600 nm, eliminando la turbidez correspondiente al medio de cultivo sin inóculo con la realización de blancos. Estas medidas se realizaron durante los experimentos en un espectrofotómetro Modelo Pharma Spec 1700 (Ver Figura 8.1).



Figura 8.1: Espectrofotómetro Modelo Pharma Spec 1700 Marca Shimadzu.

Para determinar la medida real de la concentración de microorganismos en las muestras (g/L), se realizó la calibración de la curva de DO, dado que esta no es la medida real de la concentración de microorganismos en las muestras de los experimentos, no obstante, es una medida fácil y rápida. Se asumió que la concentración real de microorganismos se determinó como la concentración de sólidos volátiles (SV), presentes en la muestra analizada.

El procedimiento de trabajo aplicado para medir la concentración de biomasa presente en la muestra de análisis fue el siguiente:

- En un matraz Erlenmeyer de 1L de capacidad se adicionaron 400mL de medio BHB al 1% (v/v) en diésel y 4mL de un inóculo del consorcio microbiano. Esta solución obtenida, se colocó en un baño de agitación a una temperatura de 25°C y con una velocidad de agitación de 130rpm.

- A lo largo del periodo de incubación, y durante intervalos de 5 a 10 horas se tomaron muestras trasvasándolas a tubos Falcon para determinar la DO y con la curva de calibración se determinó la concentración de sólidos volátiles (SV).

Tabla 8.1: Relación entre DO y SV para determinación de la concentración de biomasa, $g_{células}/L$

DO	SV ($g_{células}/L$)
DO ₀	SV ₀
DO ₁	SV ₁
DO ₂	SV ₂
DO ₃	SV ₃
DO ₄	SV ₄

(Elaboración propia)

Con los datos obtenidos de las mediciones de DO y SV con relación al tiempo y usando EXCEL, se ajustaron la curva de calibración que relaciona DO y SV, obteniendo la ecuación para determinar la concentración de biomasa de los microorganismos en cada momento de tiempo de medición y el valor de R^2 , como medida de la exactitud del ajuste.

- Determinación de la concentración de hidrocarburos totales de petróleo

La medida de la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (TPH), en el presente caso la fracción de diésel, ha sido, el parámetro analítico utilizado en estos experimentos para establecer la capacidad de degradación de hidrocarburos por los microorganismos presentes en el consorcio.

La determinación de la concentración de TPH se realizó mediante cromatografía gaseosa en un cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific), en los Laboratorios de Pace Analytical Services, New Orleans.



Figura 8.2: Cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific)

En este, se extrajo con n-hexano y separó en una micro-columna ULTRA FAST capilar con una longitud de 5 m, 0.1 mm de diámetro interno y 0.4 μm de espesor de fase con un detector de ionización de llama, la fracción de diésel presente en las muestras. El inyector y el detector se programaron a una temperatura de 250°C y 280°C, respectivamente y la rampa térmica empleada fue con $T_{\text{inicial}} = 50^\circ\text{C}$ durante 0.1 minutos, seguida de un gradiente de 40°C/min hasta una $T_{\text{final}} = 280^\circ\text{C}$ durante 2.68 minutos.

El gas portador utilizado fue helio de máxima pureza y se trabajó a flujo constante de 50 mL/min. Los gases de llama utilizados fueron aire, nitrógeno e hidrógeno. El volumen de muestra utilizado por análisis fue de 1.5 μL y la inyección de la misma se realizó en modo Split. El equipo trabajó en modo automático dado que consta de un muestreador programable.

Anexo IX: Métodos y procedimientos para el establecimiento de la influencia de los parámetros: tipos de consorcio, concentración del sustrato y temperatura en el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro

Una vez desarrollados los consorcios microbianos, e identificados aquellos microorganismos con capacidad de degradación de hidrocarburos, se procedió al establecimiento de la influencia del tipo de consorcio, de la concentración del sustrato y de la temperatura en el desarrollo de la reacción bioquímica para la producción de biomasa y el consumo de hidrocarburos contaminantes. Para ello se llevaron a cabo las corridas necesarias de experimentos discontinuos de biodegradación in vitro con los tres tipos de consorcios: consorcio A, consorcio B y consorcio C, de previo aislados de los emplazamientos de suelos contaminados y adaptados al consumo de diésel.

El diseño del experimento aplicado se presenta en la Tabla 9.1, en el que se han considerado tres factores cada uno con tres niveles. Se estudió la influencia de tres temperaturas de reacción: 25, 30 y 35 °C, todas dentro del rango para microorganismos mesófilos, para analizar la dependencia de la producción de biomasa relacionado con el crecimiento de los consorcios microbianos capaces de degradar hidrocarburos (HiC) con ésta. A su vez, se estudió la influencia de la concentración inicial (C_0) de diésel con tres concentraciones distintas de: 0.5, 1 y 3 % en volumen. No obstante, a las temperaturas de 25 y 35 °C, no se pudo registrarse crecimiento microbiano, de igual manera para una concentración inicial del 0.5% de diésel para una temperatura de 30°C.

Tabla 9.1. Diseño del experimento para establecer la influencia para los parámetros operacionales: tipos de consorcio, concentración del sustrato y temperatura en el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro

Consortio	Factores		Variables Respuestas	
	C ₀ (%v/v)	Temperatura (°C)	Concentración de biomasa (Microorganismo)	Concentración final del sustrato (Diesel)
A	0.5	25		
	1.0			
	3.0			
	0.5	30		
	1.0			
	3.0			
	0.5	35		
	1.0			
	3.0			
B	0.5	25		
	1.0			
	3.0			
	0.5	30		
	1.0			
	3.0			
	0.5	35		
	1.0			
	3.0			
C	0.5	25		
	1.0			
	3.0			
	0.5	30		
	1.0			
	3.0			
	0.5	35		
	1.0			
	3.0			

(Elaboración propia)

Anexo X: Composición microbiana de consorcios A, B y C por especies

Tabla 10.1: Composición de los consorcios A, B y C

Consorcio A	Consorcio B	Consorcio C
Achromobacter xylooxidans	Micrococcus spp	Achromobacter xylooxidans
Burkholdeira cepaciae	Pseudomonas fluorescens	Aeromonas sobria
Ochrobactrum anthropi	Sphingobacterium multivorum	Ochrobactrum anthropi
Pseudomonas fluorescens	Sphingobacterium spp	Rhizobium radiobacter
Sphingomonas paucimobilis	Staphylococcus lentus	Staphylococcus lentus
Sphingomonas paucimobilis	Staphylococcus sciuri	-
Staphylococcus lentus	Stenotrophomonas maltophilia	-
Stenotrophomonas maltophilia	-	-