

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS MEDIANTE LA ACCIÓN DE CONSORCIOS
MICROBIANOS IN VITRO.**

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

Br. Nelly Monserrat Moraga Moreno.

PARA OPTAR EL TITULO DE:

Ingeniero Químico

TUTOR:

M.Sc. Sergio Enrique Álvarez García

Managua, Nicaragua

Mayo 2022

AGRADECIMIENTO

A Dios, por haberme acompañado durante el caminar de mi carrera, por estar siempre conmigo, haberme dado la sabiduría para culminar este trabajo y por haberme puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda mi carrera.

A mis padres y hermano, por todo su apoyo durante toda mi vida, sin importar las situaciones, que ya saben que pasan, los quiero a todos.

A mi tutor, **M.Sc. Sergio Enrique Álvarez García**, por brindarme todo su apoyo, tiempo invertido, paciencia y por transmitirme de su conocimiento durante la realización de este trabajo monográfico.

Lic. Danelis Barrios Avilés, por ser una gran amiga, por su gran apoyo, por sus sabios consejos, su comprensión y por estar en momentos difíciles durante la realización de esta tesis.

Al Ingeniero **Julio Daniel Bermúdez Espinoza**, mi mejor amigo, el mejor regalo que Diosito me ha dado por el momento, por aguantarme en toda mi vida universitaria, quien me ha apoyado, escuchado incondicionalmente, por estar siempre ahí como soporte para conversar sobre la vida, sobre las preocupaciones y sobre las cosas que valen la pena.

Al Ingeniero **Alexander Rosales Silva**, Gerente General de ARS Construcciones, Energía y Medio Ambiente, por su apoyo y respaldo técnico y económico para ejecutar y financiar esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios, por haber sido mi guía, mi fuerza y mi sostén durante todo este tiempo, que con su luz me guio para poder culminar con éxito mi carrera y a la Virgencita María por ser mi intercesora.

A mis padres, Pedro Moraga y Maritza Moreno, por su incondicional amor, por el esfuerzo y sacrificio que han hecho por mí y mi hermano, para que podamos ser personas de bien.

A mi hermano Pedro Daniel para que sirva de ejemplo que todo sueño se logra con esfuerzo y dedicación.

En especial, esta tesis se la dedico a mi abuela madrina Nelly Quezada (q.e.p.d), por ser esa persona que me quería mucho, que pensó en mi hasta su último día de vida, ese ser que esperaba lo mejor para mí y aunque no esté físicamente conmigo, sé que desde el cielo siempre me cuida y me guía para que todo salga bien.

Nelly Monserratt Moraga Moreno

RESUMEN

La presente investigación, ha tenido como objetivo optimizar el proceso de biodegradación de hidrocarburos mediante la acción de consorcios microbianos in vitro por el método de superficie de respuestas, determinando además la influencia que ejercen los factores: tipo de consorcio, concentración del sustrato y temperatura durante el proceso en las variables respuestas del proceso.

A partir de los datos experimentales obtenidos para cada tipo de consorcio, se propusieron tres modelos cinéticos: i) Modelo Teissier, ii) Modelo de Monod y iii) Modelo de Haldane, cuyos parámetros se estimaron a partir de regresión no lineal, usando el método de Runge Kutta en el Software Berkeley Maddona, estableciendo que el mejor ajuste corresponde al Modelo cinético de Teissier.

El Diseño experimental aplicado fue un diseño factorial completo de 3^k , conformado por 3 factores y 3 niveles, para un total de 27 tratamientos, para estudiar la incidencia que tienen estos factores operacionales con respecto a las variables respuestas (Concentración de Biomasa, Concentración final de Sustrato y Eficiencia).

La matriz del diseño factorial, estableció que las interacciones triples de los factores operacionales (ABC) resultaron estadísticamente no-significativa. El método de Superficie de Respuesta, determino los rangos óptimos para cada variable operacional y estableciendo los valores de las variables operacionales que generan la mayor eficiencia de remoción del contaminante hidrocarbonado en solución acuosa.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	I
DEDICATORIA.....	II
CONTENIDO.....	IV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. MARCO DE REFERENCIA.....	4
3.1. Generalidades del Petróleo y sus hidrocarburos.....	4
3.1.1. Hidrocarburos como contaminante.....	5
3.1.2. Efectos de los hidrocarburos en la salud.....	6
3.1.3. Consumo de diésel en Nicaragua.....	7
3.2. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.....	7
3.2.1. Tipos de biorremediación.....	8
3.2.2. Factores que afectan el proceso de biorremediación de hidrocarburos.....	10
3.2.3. Ventajas y desventajas de aplicar la biorremediación en el tratamiento de suelos contaminados.....	15
3.3. Papel que desempeñan los microorganismos en la biorremediación....	16
3.3.1. Consorcios microbianos en biorremediación de hidrocarburos.	18
3.4. Ciclo de crecimiento microbiano.....	19
3.4.1. Fases del Crecimiento bacteriano.....	20
3.4.2. Modelos Cinéticos de crecimiento microbiano.....	21
3.4.3. Métodos matemáticos a utilizar para encontrar los parámetros de los modelos cinéticos en el proceso de biorremediación.....	23
3.5. Diseños Experimentales.....	26
3.5.1. Diseño Factorial.....	27
3.5.2. Método de optimización con Superficie Respuesta.....	28
IV. METODOLOGÍA.....	33
4.1. Métodos y procedimientos para establecer el crecimiento microbiano de cada consorcio bacteriano adaptado al consumo de Diésel.	33
4.1.1. Determinación de la concentración de Biomasa.....	34
4.1.2. Determinación de la concentración de hidrocarburos.....	35

4.2.	Ajuste de modelos matemáticos predictivo del crecimiento microbiano de cada consorcio bacteriano adaptado al consumo de Diésel como única fuente de energía y carbono.	36
4.2.1.	Modelos matemáticos descriptivos del comportamiento cinético....	37
4.2.2.	Ajuste de los modelos Cinéticos en Berkeley Madonna.	38
4.3.	Métodos y procedimientos para la determinación de la influencia de las variables operacionales del proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro, estableciendo su incidencia en la capacidad de remoción del contaminante.....	39
4.4.	Diseño estadístico de experimentos.....	39
4.4.1.	Diseño factorial completo.....	39
4.4.2.	Método de optimización con Superficie Respuestas con tres-niveles.....	41
V.	HIPÓTESIS.....	42
VI.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
6.1.	Ajuste de modelos cinéticos microbiano de cada consorcio bacteriano adaptado al consumo de Diésel.....	43
6.1.1.	Determinación de la concentración de biomasa.	43
6.1.2.	Comportamiento cinético microbiano para los tipos de consorcios.	44
6.1.3.	Modelos matemático predictivo del crecimiento microbiano de cada consorcio bacteriano adaptado al consumo de Diésel como única fuente de energía y carbono.	45
6.2.	Influencia de las variables operacionales que gobiernan el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro.	56
6.2.1.	Diseño factorial completo 3^k	56
6.2.2.	Diseño Factorial completo para variable respuesta Concentración de Biomasa.....	57
6.2.3.	Diseño Factorial completo para variable respuesta Concentración Final de Sustrato.....	61
6.2.4.	Diseño Factorial completo para variable respuesta de la Eficiencia.....	64
6.3.	Optimización del proceso de Biodegradación de hidrocarburos mediante la acción de consorcios.....	68
6.3.1.	Optimización del proceso para variable respuesta de la Concentración de Biomasa mediante metodología de superficie respuesta.....	68

6.3.2. Optimización del proceso para variable respuesta de la Concentración final del sustrato (TPH) mediante metodología de superficie respuesta.	72
6.3.3. Optimización del proceso para variable respuesta de la Eficiencia mediante metodología de superficie respuesta.....	75
6.3.4. Resultados de la optimización del Procesos de biodegradación de hidrocarburos mediante la acción de consorcios.	78
VII. CONCLUSIONES	80
VIII. RECOMENDACIONES.....	81
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	82
ANEXOS	87

Índice de tablas

Tabla 3.1.	Cuadro resumen de métodos de resolución Runge Kutta.	25
Tabla 4.1	Relación entre DO y SV para determinación de la concentración de biomasa, gcélulas/L.	35
Tabla 4. 2.	Factores y niveles del experimento.	40
Tabla 4.3.	Variables de Respuestas.	40
Tabla 6.1.	Parámetros cinéticos obtenidos de la simulación con Berkeley Madonna para el Consorcio 1.	48
Tabla 6.2.	Parámetros cinéticos obtenidos de la simulación con Berkeley Madonna para el Consorcio 2.	51
Tabla 6.3.	Parámetros cinéticos obtenidos de la simulación con Berkeley Madonna para el Consorcio 3.	54
Tabla 6.4.	Tabla Resumen de los Parámetros cinéticos de cada consorcio.	55
Tabla 6.5.	Análisis de varianza del Diseño factorial completo para la obtención de la concentración de Biomasa.	57
Tabla 6.6.	Modelos de regresión cuadrática para el comportamiento de la relación de la concentración de biomasa.	59
Tabla 6.7.	Análisis de varianza del Diseño factorial completo para la obtención de la concentración final de sustrato.	61
Tabla 6.8.	Modelos de regresión cuadrática para el comportamiento de la relación de la concentración final de Sustrato	62
Tabla 6.9.	Análisis de varianza del Diseño factorial completo para la obtención de la Eficiencia.	64
Tabla 6.10	Modelos de regresión cuadrática para el comportamiento de la relación a la Eficiencia del proceso.	65
Tabla 6.11.	Análisis de varianza del Diseño Superficie para concentración de biomasa.	68
Tabla 6.12.	Modelos de regresión cuadrática del diseño de superficie respuesta del comportamiento de variable C. Biomasa	69
Tabla 6.13.	Análisis de varianza del Diseño Superficie Respuesta para la obtención de la concentración final del sustrato	72

Tabla 6.14.	Modelos de regresión cuadrática del diseño de superficie respuesta del comportamiento de variable C. final de sustrato TPH	73
Tabla 6.15.	Análisis de varianza del Diseño Superficie Respuesta para la obtención de la Eficiencia	75
Tabla 6.16.	Modelos de regresión cuadrática del diseño de superficie respuesta del comportamiento de la Eficiencia.	76
Tabla A.1.	Datos Experimentales de Concentración de Biomasa e hidrocarburos para el Consorcio 1.	88
Tabla A.2.	Datos Experimentales de Concentración de Biomasa e hidrocarburos para el Consorcio 2.	89
Tabla A.3.	Datos Experimentales de Concentración de Biomasa e hidrocarburos para el Consorcio 3.	90
Tabla A.4.	Tabla de resultados con los parámetros cinéticos para el Consorcio 1.	91
Tabla A.5.	Tabla de resultados con los parámetros cinéticos para el Consorcio 2.	92
Tabla A.6.	Tabla de resultados con los parámetros cinéticos para el Consorcio 3.	93
Tabla A.7.	Diseño del experimento para establecer la influencia para de los parámetros operacionales: tipos de consorcio, concentración del sustrato y temperatura en el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro.	94

Índice de Figuras

Figura 3.1	Pasos iniciales de la ruta de degradación de HAP por hongos y bacterias.	17
Figura 3.2.	Fase de crecimiento típica de una población bacteriana.	20
Figura 3.3.	Scripts para determinar un solo paso del método RK de cuarto orden.	25
Figura 3.4	Modelo general de un proceso o sistema.	26
Figura 3.5.	Superficie de respuesta. Rendimiento esperado.	29
Figura 3.6.	Forma gráfica de las funciones.	29
Figura 3.7.	Formas generales de superficies cuadráticas que pueden encontrarse.	30
Figura 4.1.	Espectrofotómetro Modelo Pharma Spec 1700 Marca Shimadzu.	34
Figura 4.2.	Cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific).	36
Figura 6.1.	Curva de calibración Do vs SV.	43
Figura 6.2.	Curvas de Crecimiento microbiano y decrecimiento del Sustrato para cada Tipo de Consorcio.	44
Figura 6.3.	Velocidad Específica de Crecimiento para cada Consorcio	45
Figura 6.4.	Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el consorcio 1 usando el modelo de Teissier.	47
Figura 6.5.	Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el consorcio 1 usando el modelo de Monod.	47
Figura 6.6.	Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el consorcio 1 usando el modelo de Haldane.	48
Figura 6.7.	Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el consorcio 2 usando el modelo de Teissier.	50
Figura 6.8.	Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el consorcio 2 usando el modelo de Monod.	50
Figura 6.9.	Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el consorcio 2 usando el modelo de Haldane.	51

Figura 6.10.	Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el Consorcio 3 usando el modelo de Teissier.	53
Figura 6.11	Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el Consorcio 3 usando el modelo de Monod.	53
Figura 6.12.	Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (TPH) para el Consorcio 3 usando el modelo de Haldane.	54
Figura 6.13.	Diagrama de Pareto estandarizado para Variable Respuesta concentración Biomasa.	58
Figura 6.14.	Gráfica de efectos principales para Concentración Biomasa.	59
Figura 6.15.	Gráfica de interacciones para Variable Respuesta Concentración de Biomasa.	60
Figura 6.16.	Diagrama de Pareto estandarizado para Variable Respuesta Concentración de sustrato final.	62
Figura 6.17.	Gráfica de efectos principales para la Variable Respuesta concentración final de sustrato.	63
Figura 6.18.	Gráfica de interacciones para la Respuesta Concentración Final de Sustrato.	63
Figura 6.19.	Diagrama de Pareto estandarizado para la Eficiencia del proceso.	65
Figura 6.20.	Gráfica de Efectos principales para la Eficiencia.	66
Figura 6.21.	Gráfica de interacción para la Eficiencia.	66
Figura 6.22.	Diagrama de Pareto para RSM de Concentración de Biomasa.	70
Figura 6.23.	Gráficas de Residuos para Concentración de Biomasa.	70
Figura 6.24.	Gráfica de Superficie Respuesta de C. Biomasa.	71
Figura 6.25.	Diagrama de Pareto de Superficie Respuesta para C. final de sustrato.	73
Figura 6.26.	Gráfica de residuos para C. final sustrato.	74
Figura 6.27.	Gráfica de Superficie Respuesta para Concentración final de Sustrato.	74
Figura 6.28.	Diagrama de Pareto del Diseño de Superficie Respuesta para Eficiencia.	76
Figura 6.29.	Gráfica de Residuos para Eficiencia.	77
Figura 6.30.	Gráfica de superficie De Eficiencia.	77

Figura 6.31.	Gráfica de optimización del proceso de biodegradación.	78
Figura A.1.	Scripts para el modelo de Teissier.	95
Figura A.2.	Scripts para el modelo de Monod.	95
Figura A.3.	Scripts para el modelo de Haldane.	96
Figura A.4.	Ventana inicial de ecuaciones Berkeley Madonna.	97
Figura A.5.	Ajuste de curva de modelo cinético a los datos experimentales.	98
Figura A.6.	Ventana de selección de Sliders.	99

Abreviaturas

HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
HA	Ácido húmico.
DCC	Diseño Central Compuesto.
RSM	Método de Superficie Respuesta.
COVs	Compuestos Orgánicos Volátiles.
BHB	Beta-hidroxi butirato
TPH	Hidrocarburos Totales de Petróleo.
RK	Runge Kutta.
ANOVA	Análisis Estadístico.
DO	Densidad Óptica.
SV	Sólidos Volátiles.
Hic	Hidrocarburo líticos.
Co	Concentración Inicial.
CB	Concentración de Biomasa.
E	Eficiencia.
D	Deseabilidad Compuesta
DDE	Diseño de Experimento.
ODE	Ecuaciones Diferenciales Ordinarias.
DE	Ecuaciones Diferenciales.
Valor F	Distribución de FISHER
MSECx	Error Cuadrático medio para C. Biomasa
MSECs	Error Cuadrático medio para C. Sustrato

Nomenclatura

C_{xm}	Concentración máxima de biomasa	gcélulas/L
C_x	Concentración de biomasa	gcélulas/L
C_s	Concentración de sustrato	g_{TPH}/L
μ	Tasa de crecimiento	h^{-1}
μ_{max}	velocidad máxima de crecimiento	h^{-1}
dC_x/dt	Velocidad de crecimiento de células	$g/L \cdot h$
K_d	Constante cinética de muerte celular	h^{-1}
q_p	Constante cinética de formación de producto	h^{-1}
$Y_{X/S}$	Rendimiento en masa celular de sustrato	$(g_{células}/g_{TPH})$
$Y_{P/S}$	Rendimiento en producto de un sustrato	$(g_{células}/g_{TPH})$
K_i	Constante de inhibición por sustrato	g_{TPH}/L
DO	Densidad Óptica	
SV	Sólidos volátiles	gcélulas/L
R^2	Medida de exactitud de ajuste	

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos con hidrocarburos es un problema mundial, debido al uso y consumo extensivo de los derivados del petróleo en las actividades de la sociedad moderna que abarcan el sector industrial, energético, transporte, entre otros, de tal forma que altera las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

Constantemente, se producen vertidos y derrames de hidrocarburos, de forma accidental o intencional, los cuales impactan directamente los diversos compartimientos ambientales que abarcan los sistemas abióticos, bióticos y antropogénicos, poniendo en peligro la existencia misma y continuidad de las diversas especies que habitan en los ecosistemas afectados, extendiéndose estas afectaciones al ámbito social, económico y cultural de la población (Infante, 1998).

La biorremediación, es una tecnología de restauración ambiental, en la que las sustancias contaminantes entre las que se encuentran los hidrocarburos - se transforman y/o mineralizan completamente, mediante el uso de microorganismos especializados en la degradación de compuestos orgánicos. Esta técnica biológica es versátil, puede adaptarse a las necesidades de cada sitio afectado, aplicando bioestimulación si únicamente se requiere adición de nutrientes, principalmente fuentes de nitrógeno y fósforo, para favorecer el crecimiento y desarrollo microbiano cuando se necesita aumentar la proporción de la flora microbiana degradadora del contaminante, adicionando microorganismo o sistemas enzimáticos capaces de fraccionar las moléculas de hidrocarburo haciéndolas menos tóxicas e incorporarlas a sus procesos metabólicos, transformándolas en dióxido de carbono y agua (Pisfil, 2019).

En Nicaragua, desde el año 2005, las empresas dedicadas a la prestación de servicios de tratamiento de suelos contaminados, están implementando métodos y técnicas utilizando microorganismos para restaurar el medio ambiente alterado por contaminantes como los hidrocarburos, sin embargo, tienen poca efectividad y no se obtiene el efecto esperado. Esto se debe principalmente al poco conocimiento de las técnicas, fundamentos teóricos y condiciones que ocurren en los procesos de biorremediación, desaprovechando todo el potencial de degradación que poseen los microorganismos nativos de los diversos compartimientos ambientales, actuado como un consorcio natural y la influencia que ejercen sobre el proceso de biorremediación (Alvarez, 2020).

En el marco de la Convocatoria de Investigadores e Innovadores Acreditados del 2020-2021 de la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería, se aprobó el Proyecto de Investigación "Biorremediación de suelos

contaminados con hidrocarburos empleando consorcios de microorganismos nativos”. La presente investigación forma parte de otras investigaciones conexas, y está optimiza el proceso de biodegradación de hidrocarburos mediante la acción de consorcios microbianos, estableciendo los rangos de las variables operacionales: *tipo de consorcio, concentración del sustrato y temperatura*, que maximizan la eficiencia de remoción del hidrocarburo contaminante.

Se desarrollaron modelos matemáticos que permitieron determinar los parámetros cinéticos de cada consorcio microbiano en la reacción sobre el sustrato (TPH) mediante el ajuste de curvas no lineales usando el método de Runge Kutta.

Se aplicaron técnicas de diseños estadísticos de experimentos, como el Diseño Factorial 3^k , cuyos resultados permitieron identificar y establecer la influencia significativa de cada variable operacional sobre el proceso y los efectos de las interacciones de las variables de los factores, que gobiernan el proceso de biorremediación de hidrocarburos in vitro.

La aplicación de los métodos de optimización con superficies de respuestas realizados en esta investigación, permitió establecer los valores operacionales de entrada al proceso para obtener la máxima concentración de biomasa durante el crecimiento de los consorcios bacterianos, que maximizan la eficiencia de remoción de hidrocarburos presentes en el medio contaminado.

Los resultados aquí obtenidos, se utilizarán en las siguientes etapas del proyecto global de investigación, a cargo del M.Sc. Sergio Enrique Álvarez García.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Optimizar el proceso de biodegradación de hidrocarburos mediante la acción de consorcios microbianos in vitro por el método de superficie de respuestas.

2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Ajustar el modelo matemático predictivo del crecimiento microbiano de cada consorcio bacteriano adaptado al consumo de Diésel como única fuente de energía y carbono.
- ❖ Determinar la influencia de las variables operacionales que gobierna el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro, estableciendo su incidencia en la capacidad de remoción del contaminante.
- ❖ Establecer los rangos de valores de las variables operacionales que optimizan la eficiencia de remoción del hidrocarburo contaminante.

III. MARCO DE REFERENCIA

En este capítulo se presenta el marco teórico de los conceptos que sustentan el planteamiento del problema en este estudio. Se han definido las generalidades del petróleo y sus derivados, sus propiedades y consecuencias que generan al contaminar los distintos compartimientos ambientales. Así mismo se abordó información sobre la biorremediación, sus tipos, factores que influyen en el proceso de esta y el papel que desempeñan los microorganismos en la biorremediación, por último, se describen los elementos de diseño experimental utilizados para la optimización del proceso de biorremediación.

3.1. Generalidades del Petróleo y sus hidrocarburos

El petróleo es una mezcla altamente compleja, compuesta por una gran variedad de hidrocarburos de muchos puntos de ebullición y estados (sólidos, líquido y gaseoso), que se disuelven unos en otros para formar una solución de viscosidad variable (Abasolo y Morante, 2019).

Los Hidrocarburos son compuestos orgánicos formados solamente por hidrógeno y carbono, por tanto, el petróleo crudo como sus derivados contienen diversos tipos de hidrocarburos cuyas proporciones relativas varían entre las diferentes clases de estos compuestos (Cooney, et al., 1985).

Los hidrocarburos del petróleo se dividen en dos grandes grupos: Hidrocarburos Saturados e Insaturados (alquenos, alquinos e hidrocarburos aromáticos).

- Los saturados (Alcanos): Se caracterizan porque todos los enlaces del carbono son covalentes simples. Responden a la fórmula general: $C_n H_{2n+2}$ donde $n=1, 2, 3$ [...]. estos experimentan pocas reacciones debido a que no tienen un grupo funcional, que es la parte de la molécula en donde por lo regular ocurren las reacciones.
- Alquenos u olefinas: Son hidrocarburos que tienen al menos un doble enlace entre dos átomos de carbono. Un enlace doble carbono-carbono es la parte más reactiva de un alqueno.
- Alquinos o acetilénicos: Son hidrocarburos que tienen como mínimo un triple enlace entre dos átomos de carbono. Los alquinos son relativamente no polares y casi insolubles en agua, muchos alquinos tienen olores característicos, algo desagradables, como, por ejemplo, los gases de propino y los butinos.

- **Aromáticos:** Se llaman así porque los primeros compuestos de esta serie tienen olores agradables, característicos y fuertes (vainilla, canela, etc.). El principal hidrocarburo de esta serie es el benceno, de fórmula molecular C_6H_6 . Los hidrocarburos aromáticos son compuestos muy estables y muchos de ellos, como el benceno, son excelentes disolventes no polares de sustancias como aceites y grasas.

En general, 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 asfáltenos y las resinas esencialmente inertes (Prince, et al., 1999).

3.1.1. Hidrocarburos como contaminante

A nivel mundial año con año va en aumento la demanda de hidrocarburos y sus derivados, principalmente aquellos que son de gran importancia para la sociedad como el diésel, lubricantes, etc. sin embargo, no se toma en cuenta el daño que origina la explotación de este producto.

Por ello, muchas veces esta contaminación se da en las diferentes etapas de su explotación, extracción, transporte y refinado. Los principales orígenes de aparición de hidrocarburos en el subsuelo son: centros petroquímicos y de refinación, fugas de depósitos, transporte terrestre, confinamiento inadecuado de residuos con hidrocarburos. Así como, actividades de Saneamiento in situ (genera trazas de hidrocarburos), gasolineras y talleres automotrices (bencenos, fenoles, hidrocarburos halogenados y aromáticos), industrias metalúrgicas, pintura y esmalte, madera y pesticidas, derrames por volcamientos o siniestros naturales (Pastor y Gonzales, 2004).

El destino de los hidrocarburos en el suelo fue descrito por (McGill, et al., 1981), ellos explicaron que los hidrocarburos pasan primero por dos procesos: La Volatilización y la Fotooxidación. Posteriormente, atraviesan por un proceso de descomposición biológica, donde los microorganismos, nutrientes, oxígeno, textura y el pH son fundamentales. Como resultado de este último proceso, se generan productos intermedios, células microbianas y CO_2 , el cual se va a la atmósfera. Por último, los productos derivados de la descomposición biológica siguen dos caminos: La incorporación de humus al suelo o la lixiviación.

Dicho esto, como contaminante, los hidrocarburos ocupan una posición intermedia entre altamente biodegradable, biogénicos y altamente recalcitrantes. Tienen un origen biogénico, pero por sus procesos geoquímicos y después por refinamiento se alteran de una forma importante. La fracción biodegradable se puede transformar por medio de microorganismos a una forma estabilizada. Mientras que la fracción recalcitrante tiene una alta resistencia a la

biodegradación, la fracción persistente puede bajo una serie de condiciones específicas de acuerdo al compuesto de que se trate, sufrir la biodegradación.

Por tanto, los hidrocarburos derramados en el suelo, pueden contener productos naturales no modificados. Así que su susceptibilidad para la biodegradación esta, en particular, determinada por el tiempo que tienen existiendo en el ecosistema. Además, es conveniente que la fuente de microorganismos para la biodegradación del petróleo se localice en el lugar de descarga o derrame para determinar si las condiciones que existen en el ambiente de un sitio pueden modificarse, a fin de acelerar la biodegradación de productos del petróleo recalcitrantes o persistentes, por medio de cepas particulares.

3.1.2. Efectos de los hidrocarburos en la salud

El petróleo contiene miles de compuestos químicos diferentes que varían dependiendo de la procedencia del mismo. La mayoría de los compuestos que se encuentran en el petróleo son hidrocarburos, que llegan a suponer entre el 50% y el 98% de la composición (Greenpeace, s.f.).

Al igual que sucede con otros productos químicos tóxicos, los problemas de salud causados por los hidrocarburos pueden ser difíciles de comprobar porque tardan mucho en afectar a la gente. Entre los compuestos de los hidrocarburos destacan por sus efectos en la salud los hidrocarburos aromáticos simples y los policíclicos.

Dependiendo de la composición del crudo estos pueden encontrarse en mayor o menor cantidad. En el caso de los petróleos ligeros, la presencia de los volátiles hidrocarburos aromáticos es mayor. Aquellos de anillo simple como el benceno, el tolueno y el xileno se encuentran entre los constituyentes más importantes. Estos compuestos son más tendentes a disolverse en agua y tienen una mayor biocapacitación que otros constituyentes más peligrosos, pero menos solubles.

Como, por ejemplo, el benceno penetra en el organismo principalmente por inhalación, aunque la absorción cutánea es también posible. Después de su absorción, el benceno es eliminado inalterado en la orina (menos del 1%) y en el aire expirado (10 a 50% según la actividad física y la importancia del tejido adiposo); el resto es biotransformado. La mayor parte del benceno absorbido es metabolizado, básicamente en el hígado y la médula ósea, por oxidación a fenol, quinol y catecol, que se excretan en la orina en forma de sulfatos y glucuronatos. La metabolización y eliminación del benceno es rápida (Zubizarreta, et al., 2018).

Este compuesto es considerado cancerígeno para el ser humano y no existe ningún nivel de seguridad conocido. En trabajadores expuestos al benceno se ha comprobado un incremento en la frecuencia de leucemias, mientras que, en

mujeres embarazadas, el benceno se acumula en el suministro sanguíneo del feto.

Además, los síntomas de la exposición crónica de hidrocarburos pueden ser: cambios de conducta, depresión, alteraciones del estado de ánimo y cambios de la personalidad y de la función intelectual. También se sabe que la exposición crónica produce o contribuye al desarrollo de una neuropatía distal en algunos pacientes. Otros efectos crónicos son sequedad, irritación y agrietamiento de la piel y dermatitis.

3.1.3. Consumo de diésel en Nicaragua

En el país, varios estudios realizados indican que Nicaragua es un país altamente dependiente de los hidrocarburos. En el Anuario de estadísticas macroeconómicas publicado por el Banco Central de Nicaragua (2020), muestra un consumo constante en los últimos años, siendo los valores más actuales los del año 2020, estos fueron en miles de barriles: Diésel 4309.5, Gasolina 2900.6, Fuel oil 1981.9, Gas licuado 1534.2, Kero/turbo 100.7, y Asfalto 81.2.

Además, en el anuario de estadísticas de hidrocarburos 2019, presentado por el Ministerio de Energía y Minas (2020), muestran que en el año 2019 la composición de las importaciones petroleras indicó que el 29.79% fue petróleo crudo y el restante 70.21% fueron productos terminados necesarios para satisfacer la demanda. Entre los principales hidrocarburos importados destacan: Diésel (20.12%), Gasolinas (15.09%) y Fuel Oil (22.28%) del total importado. En conjunto, estos tres productos alcanzaron el 57.48% de las importaciones totales. Es de destacar que la Refinería ya no produce Fuel Oil ni Asfaltos, estos deben ser importados en su totalidad.

3.2. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos

Biorremediación es el proceso por el cual los organismos vivos son empleados para la descontaminación efectiva de un sistema contaminado. Dicho proceso explota la diversidad genética y la versatilidad metabólica de los microorganismos para transformar contaminantes en productos finales menos tóxicos, los cuales son integrados en los ciclos biogeoquímicos naturales o de acumularlos en su biomasa reduciendo la concentración del contaminante en el medio (Rivera, et al., 2003).

La técnica de biorremediación consiste principalmente en usar microorganismos autóctonos del sitio para degradar los contaminantes presentes, se puede clasificar dependiendo del lugar o situación donde se lleve a cabo. De esta forma cuando el tratamiento se hace en el mismo lugar natural donde ocurre la contaminación se le llama biorremediación in situ y cuando se toman muestras de suelo o agua contaminada y se trasladan a otro lugar para ser tratadas en un biorreactor, plantas de tratamiento o bioláminas, se habla de biorremediación ex situ. A nivel experimental se practica la biorremediación in vitro como una manera de mantener las condiciones de trabajo controladas (Rodríguez y Sánchez, 2004).

El manejo de condiciones específicas para desarrollar la biorremediación, es el resultado de la explotación del metabolismo para catalizar reacciones químicas. En general estos procesos no se presentan si el microorganismo no se beneficia de esto, lo cual involucra la concentración final de los niveles del contaminante que se pueden obtener del metabolismo y la acción benéfica de enzimas no específicas ya que puede llegar a un nivel del compuesto tan bajo, que ya no se tome como fuente de energía.

La biorremediación es una elección apropiada para el tratamiento de muchos residuos peligrosos, antes y después de su descarga al ambiente. Este tratamiento está basado en el tipo de químico presente, el uso de microorganismos y control de las condiciones ambientales más adecuadas para el microorganismo, es por ello que debe ser acelerada y optimizada en el sitio con el fin de reducir la concentración del contaminante a un nivel tóxico menor o nulo, en un periodo razonable.

3.2.1. Tipos de biorremediación

Las técnicas de biorremediación son tecnologías de descontaminación basadas en la utilización de una amplia variedad de organismos que poseen la capacidad de eliminar los contaminantes, en esta se involucran **reacciones de oxidación-reducción** donde los contaminantes reducidos se oxidan y los contaminantes oxidados se reducen. En este sentido, la biorremediación se puede practicar mediante:

3.2.1.1. Atenuación Natural

Se denomina biorremediación intrínseca o atenuación natural, al método de remediación pasiva que depende de los procesos naturales para degradar y disminuir los contaminantes en el suelo y el agua subterránea. 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 (Gómez, et al., 2009). La atenuación natural es un proceso que llevan a cabo los suelos dentro de la misma dinámica de autodepuración, sin embargo, ante niveles excesivos de contaminante la atenuación natural no es suficiente para descontaminar.

Estos procesos se conocen como procesos de biotransformación natural. Esta técnica se aplica en aquellos casos donde existe la contaminación tanto en suelos como en agua subterráneas producida por hidrocarburos de tipo halogenado o no halogenado (Eweis, 1999).

3.2.1.2. Bioestimulación

La bioestimulación es el método más empleado para reducir la concentración de contaminantes. Este método implica la circulación de soluciones acuosas que contengan nutrientes (nitrógeno y fósforo) y/u oxígeno, a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos in situ (Van Deuren, et al., 1997).

La bioestimulación se ha aplicado con éxito para remediar suelos contaminados con gasolinas, compuestos orgánicos volátiles (COVs) y pesticida. Estudios a escala piloto, han mostrado la biodegradación de suelos contaminados con desechos de municiones. Sin embargo, Esta tecnología no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos, ya que pueden provocar limitaciones en la transferencia de O₂. Otros factores que pueden limitar su aplicación, incluyen:

- Que el tipo del suelo no favorezca el crecimiento microbiano.
- Incremento en la movilidad de los contaminantes.
- Obstrucción en los pozos de inyección provocada por el crecimiento microbiano.

Dicho lo anterior, para utilizar de manera efectiva esta tecnología es necesario realizar estudios microbiológicos para determinar la presencia de microbios degradadores de hidrocarburos. Estos deben tener la capacidad de utilizar estas moléculas como fuente de carbono y energía. También, se debe realizar la caracterización fisicoquímica del material a tratar para determinar si la acidez y la humedad son adecuadas para obtener buenos resultados.

La bioestimulación es económica y amigable con el medio ambiente porque aprovecha la capacidad del microbiota autóctono para descontaminarlo. Para obtener resultados óptimos es de suma importancia determinar la presencia de

microorganismos que puedan utilizar la sustancia contaminante como fuente de carbono.

3.2.1.3. Bioaumentación

Las técnicas de bioaumentación describe la adición de organismos o enzimas a un material con el propósito de eliminar sustancias indeseables. La bioaumentación asegura que estén presentes los microorganismos específicos capaces de degradar al compuesto contaminante no deseado hasta sus moléculas básicas. Las bacterias son los microorganismos más comúnmente utilizados para la bioaumentación (Ortiz, et al., 2005).

Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Sin embargo, antes de llevar a cabo la bioaumentación en un sitio, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Sepúlveda y Velasco, 2002). 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 (Gómez, et al., 2009).

Se ha usado para tratar suelos contaminados con herbicidas (2,4-D, clorofam), insecticidas (lindano, clordano, paratión), clorofenoles (PCP) y nitrofenoles, Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTPs) y Hidrocarburo Aromáticos Policíclicos (HAPs). También se ha aplicado efectivamente para tratar desechos con concentraciones relativamente altas de metales (Eweis, 1999).

La mayor parte de los parámetros que necesitan ser vigilados en un proyecto de Bioaumentación, están en función de crear un ambiente favorable para el desarrollo bacteriano. Una vez que el medio ambiente es receptivo para el crecimiento de las bacterias y se ha establecido un sistema de monitoreo satisfactorio, los programas de Bioaumentación no exigen trabajo intensivo ni grandes capitales.

3.2.2. Factores que afectan el proceso de biorremediación de hidrocarburos

El comportamiento de un contaminante en el suelo como lo son los hidrocarburos, así como la efectividad de la biorremediación están determinados por una variedad de factores tanto físicos como microbiológicos que interactúan de

manera compleja y que dependen de las características propias del contaminante, así como los del suelo.

Por consiguiente, para la selección adecuada de una tecnología de biorremediación con buenas perspectivas de éxito, es indispensable considerar todos los factores que pueden incidir en el proceso de biorremediación.

➤ **Cantidad y estado del hidrocarburo**

Uno de los principales factores que influye en la biorremediación es el petróleo dado que es una mezcla compleja de hidrocarburos y cada uno de estos compuestos actúa de forma diferente, dependiendo de la cantidad y el estado de este.

El estado físico en el que se encuentran los hidrocarburos tiene un efecto marcado en su biodegradación, dado que a 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, 1981) generando pasivos ambientales.

Por otro lado, los derrames por hidrocarburos en suelos se caracteriza principalmente por el movimiento vertical a lo largo del terreno más que un esparcimiento horizontal. 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. Así como, 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 y Colwell, 1990).

Por su parte, en un estudio basado en derrames marinos, descrito por Atlas (1995), demuestra que, 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.

➤ **Tipo de suelo**

El suelo está formado por una cubierta superficial llamada corteza terrestre o litosfera, que es la capa más delgada de las que forman la tierra y constituye un conjunto complejo de elementos físicos, químicos y biológicos. Uno de esos componentes son los minerales, que se forman por la meteorización de las rocas,

de materia orgánica. Todos ellos desempeñan funciones naturales como la descomposición de productos vegetales o la biodegradación de ciertos componentes que lo contaminan por medio de procesos metabólicos que llevan a cabo los microorganismos (Gómez, et al., 2008).

Cuando ocurre un derrame los contaminantes del petróleo se alojan principalmente en la parte superficial del suelo, en el cual abunda materia orgánica descompuesta, el contacto de este con las bacterias facilita la degradación de hidrocarburos (Ortega y Jiménez, 1998).

De igual forma, 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 y Lal, 2005). Lo que produce que el movimiento de carbono orgánico del suelo este 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 (Dibble y Bartha , 1979; Thomsen, 1999).

➤ **pH**

El pH es un factor químico importante que influye en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, dado que puede afectar principalmente a las poblaciones de microorganismos y así la biodisponibilidad de las fuentes de carbono y energía. Este factor se constituye como uno de los indicadores del proceso de biorremediación y aunque los microorganismos se pueden adaptar fácilmente a condiciones extremas, existen cepas microbianas que tienen un determinado rango de tolerancia (Gómez, et al., 2008).

Dicho esto, a un pH extremadamente alcalino o extremadamente ácido la biodegradación se hace lenta. Generalmente los suelos contaminados por hidrocarburos tienden a ser ácidos, lo cual limita el crecimiento y la actividad de algunos microorganismos, el rango óptimo para la biodegradación está entre 6–8 pH (Alexander, 1994). Sin embargo, para mantener una mejor capacidad degradante, por periodos de tiempo prolongados, el pH debe ser neutro, entre 7.4–7.8, evitando al máximo las fluctuaciones.

➤ **Temperatura**

La temperatura es uno de los principales factores que influyen en la biorremediación, según un estudio de Atlas (1981), 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

Así mismo, Gómez, et al., (2008), explica que la biorremediación llevada a cabo entre 20° C y 40° C muestra que este intervalo de temperatura es óptimo para la actividad microbiana, sin embargo, en climas tropicales es mejor una temperatura aproximadamente de 30 a 35° C para la actividad de algunos microorganismos, como las *Pseudomonas*. La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil. Cuando la temperatura se incrementa en 10°C la biorremediación se duplica, pero se elevan los costos.

➤ **Humedad**

Los microorganismos requieren condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células.

Poca humedad en el suelo da como resultado zonas secas y por lo tanto poca actividad de los microorganismos, empero, demasiada agua inhibe el intercambio de gases y da como resultado zonas anaerobias.

Dibble, et al., (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%.

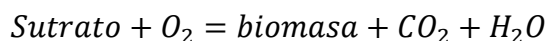
➤ **Respiración y aireación**

La respiración microbiana, se basa en que, la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, producen una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. Esta se puede producir de forma aerobia o anaerobia.

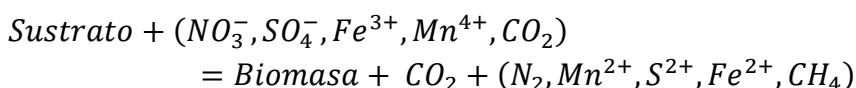
Aerobia, los microorganismos convierten en última instancia los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular microbiana por enzimas oxigenasas (Leahy y Colwell, 1990). Sin embargo, en condiciones anaerobias se utiliza sulfatos o dióxido de carbono.

El proceso de biorremediación aerobia y anaerobia puede esquematizarse de la siguiente manera:

Degradación aerobia:



Degradación anaerobia:



Dicho lo anterior, el oxígeno generalmente es el mejor aceptor de electrones, es decir, el que produce la mayor energía libre en una reacción completa. En consecuencia, para un mismo sustrato orgánico, los microorganismos que emplean el oxígeno como agente oxidante pueden generar mayor energía que aquellos que emplean nitratos, sulfatos u otros aceptores de electrones alternativos, Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos logrando de esta forma crecer a mayor velocidad, lo que implica un mayor consumo del sustrato. Por lo tanto, la biorremediación aerobia es típicamente más eficiente que la biorremediación de contaminantes orgánicos en forma anaerobia (Eweis, 1999).

➤ **Población microbiana**

Los hidrocarburos son degradados fundamentalmente por bacterias y hongos, la adaptación por exposición anterior de las comunidades microbianas a los hidrocarburos aumenta las tasas de degradación de los mismos (Riffaldi, 2005; Delille, et al., 2007; Amellal, et al., 2001). 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, et al., 2005).

La biodegradación de este contaminante requiere la cooperación de más de una única especie. Por la compleja composición del petróleo. Los microorganismos individuales pueden metabolizar solo un rango limitado de sustratos de hidrocarburos. Se requiere un conjunto de poblaciones mezcladas, sobre todo, con 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).

➤ **Nutrientes**

Los nutrientes son uno de los factores más relevantes por ser sustancias necesarias para la actividad microbiana y metabólica de los microorganismos, por lo que estos constituyentes se deben encontrar disponibles para su asimilación y síntesis, deben ser controlados para aumentar la eficiencia y el buen desarrollo de la biorremediación

El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos (nitrógeno, fósforo, oxígeno etc.) se encuentren disponibles para su asimilación y sintonización.

3.2.3. Ventajas y desventajas de aplicar la biorremediación en el tratamiento de suelos contaminados

3.2.3.1. Ventajas

- ❖ La mayor ventaja es que es un proceso natural, la biorremediación es teóricamente útil para la destrucción completa de una amplia variedad de contaminantes. En la práctica, al llegar el contaminante a un nivel más bajo que otros compuestos orgánicos más fácilmente asimilables como fuente de carbono, los microorganismos dejan de consumir los hidrocarburos.
- ❖ La biorremediación es un proceso natural, por lo tanto, la percepción del público es la de un proceso de tratamiento de residuos aceptable para el material contaminado del suelo. Los residuos para el tratamiento, por lo general, son productos inocuos como dióxido de carbono, agua y biomasa celular.
- ❖ A menudo se puede realizar en el lugar sin causar una interrupción importante de las actividades normales. Esto también elimina la necesidad de transportar cantidades de residuos fuera del sitio y las posibles amenazas para la salud humana y el ambiente que pueden ocurrir durante el transporte.
- ❖ La biorremediación puede resultar menos costosa que otras tecnologías que se utilizan para la limpieza de residuos peligrosos.

3.2.3.2. Desventajas

- ❖ La biorremediación se limita a aquellos compuestos que son biodegradables. No todos los compuestos son susceptibles a la degradación rápida y completa.
- ❖ Existe la preocupación de que los productos de biodegradación pueden ser más persistentes y tóxicos que el compuesto original.
- ❖ Los procesos biológicos son a menudo muy específicos. Entre los factores importantes del sitio necesario para el éxito incluyen la presencia de poblaciones microbianas capaces metabólicamente, las condiciones adecuadas de crecimiento medio ambiente, y los niveles adecuados de nutrientes y contaminantes.
- ❖ Es difícil extrapolar a partir de experimentos a escala de banco y los estudios a nivel piloto para las operaciones de campo a gran escala.
- ❖ A diferencia de otros tratamientos, en la biorremediación se requieren períodos de tiempo más largos para lograr resultados esperados.

3.3. Papel que desempeñan los microorganismos en la biorremediación

El petróleo está constituido por diferentes moléculas compuestas de átomos de carbono y de átomos de hidrógeno denominadas hidrocarburos que son poco solubles en agua. Sin embargo, es una rica fuente de materia orgánica y fácilmente degradable por diferentes microorganismos en condiciones aerobias.

Entre las más importantes en el caso de las bacterias son *Achromobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Rthrobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Nocardia sp.*, *Pseudomonas sp.*; en los ambientes salados se ha observado la presencia de *Vibrio sp.* En los ambientes acuáticos los géneros comúnmente aislados son las *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Nocardia sp.*, y algunos géneros de las familias *Enterobacteriaceae*, *actinomycetes*. En cuanto a géneros de hongos se han reportado *Aurebandium sp.*, *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Sporobolomyces sp.*, *Tricoderma sp.*, y *Mortierella sp.* La especie *Prothotheca zopfi* es reportada como una de las únicas algas capaces de degradar el petróleo crudo (Lozano, 2005). La adición de nutrientes orgánicos como fósforo y nitrógeno a las áreas afectadas puede incrementar la velocidad de biorremediación.

En la figura 3.1 se observa un ejemplo de la degradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) por hongos o bacterias, que demuestra que el metabolismo de los hongos es más lento y menos eficiente que el de las bacterias en la degradación de los HAPs. En el caso de HAPs, que tienen más de cuatro anillos aromáticos, las bacterias no son capaces de degradarlos, por el contrario, en estas condiciones, los hongos, suelen ser más eficientes en la degradación y mineralización de estos HAPs.

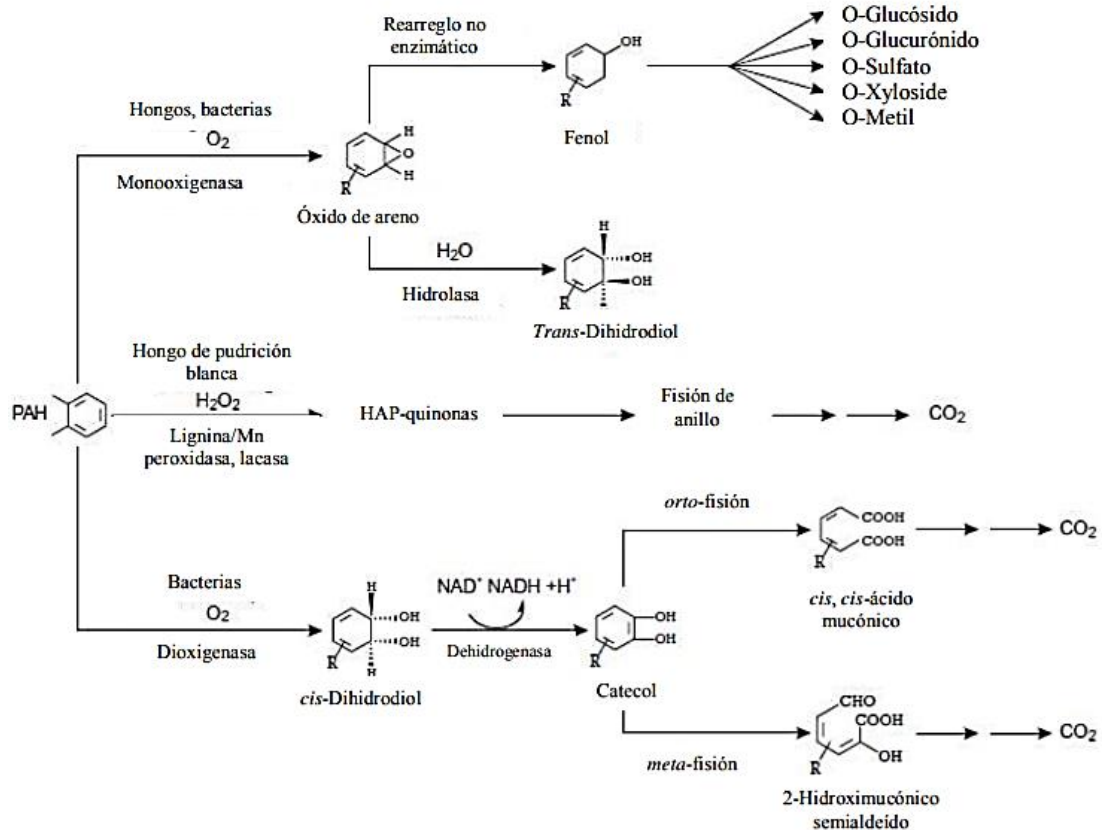


Figura 3.1. Pasos iniciales de la ruta de degradación de HAP por hongos y bacterias.

Fuente: (Singh, 2006)

En los suelos contaminados dominan las comunidades microbianas capaces de sobrevivir a la toxicidad presente en el ambiente utilizando el contaminante para su crecimiento. Las comunidades microbianas tienden a responder ante la presencia de los hidrocarburos, cambiando su estructura a una que favorezca a los organismos capaces de sobrevivir en las nuevas condiciones a expensas de otros organismos que serían reprimidos. La diversidad de especies presentes en el suelo puede ser indicador de los efectos de la contaminación y en particular la aparición de microorganismos resistentes a ésta.

Entre los microorganismos que mayormente se emplean y adaptan en la biorremediación de hidrocarburos están las bacterias dado que disponen de mejores mecanismos para asimilar los contaminantes en forma de hidrocarburos, produciendo enzimas que actúan de catalizadores y principalmente simplifican la materia orgánica en una forma más fácilmente consumible por las bacterias. Durante estos procesos producen energía para su mantenimiento y para reproducirse, generando finalmente CO₂ y calor.

3.3.1. Consorcios microbianos en biorremediación de hidrocarburos.

Como antes dicho, entre los microorganismos más eficientes para degradar hidrocarburos se encuentran las bacterias, por ende, las bacterias que conforman consorcios bacterios logran una biorremediación eficaz a la de otros microorganismos, dado que estos, crean una red con diferentes niveles de interacción que muestran una mejor adaptación, supervivencia y permanencia que les permite soportar entornos fluctuantes, otorgándoles solidez ante los cambios ambientales.

El uso de consorcios microbianos ofrece un modo de vida que promueve la alta diversidad y las interacciones sinérgicas entre especies microbianas que pueden conducir a características de degradación xenobiótica mejoradas como resultado de la coordinación metabólica y la división del trabajo (Demeter, et al., 2017; Edwards y Kjellerup, 2013; Gupta, et al., 2017). Una característica importante de los consorcios microbianos es su capacidad para realizar funciones que requieren múltiples pasos. La diversidad resultante en las rutas metabólicas le permite realizar tareas más complejas y utilizar de manera más eficiente los recursos disponibles en su entorno.

El uso de consorcios microbianos para degradar fracciones de hidrocarburos genera muchos estudios que comprueban la importancia de los microorganismos para fines de biorremediación, entre ellos están:

Kamukai-Nakamura, et al., (1996) demostraron que especies del género *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, aisladas con frecuencia de suelos contaminados con hidrocarburos, son capaces de mostrar una importante actividad degradadora de hidrocarburos. Dichos autores han demostrado como la degradación de hidrocarburos aromáticos por *Pseudomonas* depende en algunos casos de los metabolitos producidos por la degradación de los alcanos por *Acinetobacter*. En este sentido, algunas cepas de *Acinetobacter* además de degradar un gran número de alcanos producen bioemulgentes que facilitan la biodisponibilidad de los hidrocarburos (Ron y Rosenberg, 2002). Se puede pensar en consecuencia,

que estos microorganismos son útiles para la construcción de consorcio microbianos empleados como inoculantes en las técnicas de bioaumentación.

Otro género habitual es *Sphingomonas*, en el cual parece ser que la capacidad de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) es una característica general en estos microorganismos (Barkay, et al., 1999). En otro estudio, (Leys, et al., 2004) investigaron la presencia de estos microorganismos en suelos con distintas concentraciones de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) encontrando que a mayor concentración de TPH menor era su diversidad de esta especie.

En India se aisló un consorcio formado por *Achromobacter sp. BAB239*, *Pseudomonas sp. DV-AL2*, *Enterobacter sp. BAB240* y *Pseudomonas sp. BAB241*, que fue aislado de sedimentos del patio de un puerto en Gujarat, India. Este consorcio degradó de forma eficiente naftaleno en presencia de otros hidrocarburos, y fue capaz de utilizar otros hidrocarburos como fuente de carbono (Patel, et al., 2012).

Así mismo, se ha estudiado una gran gama de géneros microbianos para la degradación biótica de HAPs, entre ellos *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia*, *Gordonia* y *Marinobacter*, entre otras, donde las concentraciones del contaminante han oscilado de 300 a 1000 ppm. En cuanto a especies nativas estudiadas se tienen *Bacillus sp. ASP1*, *Pseudomonas sp. ASP2*, *Stenotrophomonas maltophilia ASP3*, *Staphylococcus sp. ASP4*, *Geobacillus sp. ASP5* y *Alcaligenes sp. ASP6*, aisladas de sedimentos del astillero Alang-Sosiya, India (Patel, et al., 2013).

En general, la formación de consorcios microbianos, en especial si estos son nativos, son de gran importancia en las tecnologías de biorremediación, ya que se ha mostrado en estudios tener gran éxito; en su mayoría se han logrado obtener porcentajes de degradación de hidrocarburos. 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.

3.4. Ciclo de crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano es un proceso de fisión binaria (la célula duplica su tamaño y luego se produce la división celular). No habrá crecimiento sin la presencia de al menos una célula viable. La tasa de crecimiento aumentará de acuerdo con la cantidad de nutriente disponible.

Cuando los microorganismos se encuentran en un ambiente óptimo para su desarrollo, se multiplican con tiempos de duplicación muy breves. Por ello, el conocimiento de cómo se expande la población celular es útil para el diseño de métodos de control para el crecimiento microbiano.

3.4.1. Fases del Crecimiento bacteriano

El crecimiento microbiano se puede ver representado por la curva de crecimiento de un cultivo microbiano, esta se puede subdividir básicamente en cuatro fases: Fase latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Madigan , et al., 1999; Prescott, et al., 1999).

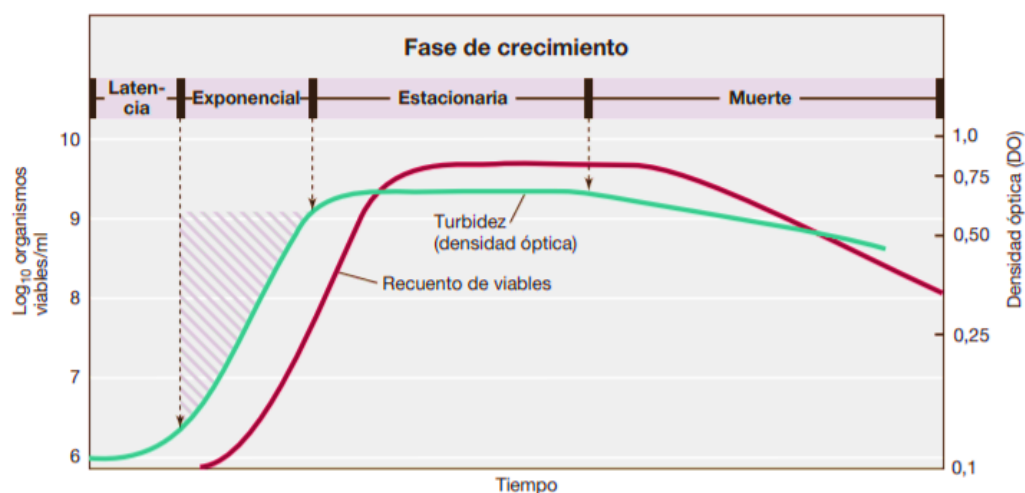


Figura 3.2. Fase de crecimiento típica de una población bacteriana.

Fuente: (Madiga, et al., 2015)

En la figura 3.2. Se presenta la curva de crecimiento bacteriano que representa el recuento de viables que mide el número de células del cultivo que son capaces de reproducirse. La densidad óptica (turbidez), una medida cuantitativa de la dispersión de la luz por un medio de cultivo, aumenta con el aumento del número de células.

Fase de latencia o de retraso: Durante esta fase, los microorganismos se adaptan al medio en el que se encuentran, empezando a metabolizar la fuente de carbono disponible para empezar el proceso de división celular. Cuando los microorganismos son sembrados en un medio con diversas fuentes de carbono, es posible que en la fase de latencia se identifique un proceso conocido como crecimiento diaúxico, es decir, el microorganismo agotará primero la fuente de carbono que pueda metabolizar más fácilmente, para después empezar a metabolizar las demás.

Fase de crecimiento: Se conoce también como 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. Este período hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células 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 el 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 de la estacionaria se caracteriza por un crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades.

Fase de muerte: Durante esta fase, las células no pueden liberar sustancias que permitan alimentar y mantener a la población, por lo tanto, el número de células decrece y se presenta la lisis celular.

3.4.2. Modelos Cinéticos de crecimiento microbiano

La microbiología predictiva se basa en el desarrollo de modelos matemáticos que permiten predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo determinadas condiciones ambientales. Los modelos matemáticos son representaciones simplificadas de un sistema o un fenómeno. Muchas veces formular un concepto teórico en forma de modelo permite poner a prueba determinadas predicciones que derivan de esos conceptos y explorar posibles consecuencias o comportamientos no previstos o no inmediatamente intuitivos (Momo y Capurro, 2006).

Un modelo matemático de crecimiento está compuesto por 3 partes: la primera corresponde a los principios químicos, físicos y biológicos involucrados en el proceso en cuestión, la segunda son las inferencias que se puedan hacer a partir de los datos existentes previamente y la tercera corresponde a las suposiciones que se deban hacer, con bases y criterios válidos. Entre los principales modelos de crecimiento de una población microbiana están:

Estructurados: Estos consideran los aspectos básicos de la célula y su especie química en cuestión, despreciando o agrupando los demás componentes en grupos generalizados que pueden llamarse lípidos, proteínas, etc.

No estructurados: Para la mayoría de casos de fermentaciones, este tipo de modelos puede describir adecuadamente el desarrollo del proceso, considerando que los microorganismos y/o células poseen una composición fija y simple. Este tipo de modelos desprecia los cambios en el medio de cultivo producto de la concentración de biomasa (Esener, et al., 1983).

Además de lo anterior los modelos se pueden clasificar como segregados y no segregados (Fredrickson, et al., 1970).

Segregados: hacen referencia a una población de microorganismos heterogénea, donde se distinguen en la población diferentes entidades con edades, formas, tamaños y composiciones internas variables.

No segregados: mientras que los no segregados, consideran que el comportamiento celular se aproxima al de una sola célula promedio que permita agrupar el desempeño de ciertas variables durante la fermentación-

Dicho lo anterior, dentro de los tipos de modelos no estructurados, se encuentran aquellos modelos que relacionan el crecimiento del microorganismo únicamente con la propia concentración de la biomasa y otros hacen depender el crecimiento de la concentración del sustrato, que suelen denominar “sustrato limitante”.

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 (Atkinson, 1974).

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{max} * \left[1 - e \left(-\frac{C_s}{K} \right) \right] * C_x \quad (\text{Ec.3.1})$$

Donde $\mu_{\text{máx}}$, C_s y K representan tasa de crecimiento específico (h^{-1}), concentración de sustrato (g/L) y constante de saturación (g/L), respectivamente.

Modelo de Monod: Modelo desarrollado en 1942, que describe una relación entre el crecimiento microbiano y el sustrato que limita el crecimiento sin ningún tipo de proceso de inhibición durante la fermentación (Duarte, 1995). Este modelo toma solamente en consideración las fases positivas de crecimiento y se asume la población microbiana como homogénea.

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_{max} \cdot C_s}{K_s + C_s} \cdot C_x \quad (\text{Ec.3.2})$$

Dónde, dC_x/dt es la velocidad de crecimiento de la célula ($\text{g/L} \cdot \text{h}$); $\mu_{\text{máx}}$ es la rapidez específica de crecimiento máxima (s^{-1}); K_s es un parámetro que representa la

concentración de sustrato a la mitad de su velocidad máxima (g/L); C_x es la concentración de células (g/L); C_s es la concentración de sustrato (g/L).

Este modelo se simplifica en las siguientes condiciones particulares:

Condición 1:

$$K_s \ll C_s \therefore \frac{dC_x}{dt} = \mu_m \cdot C_x \quad (\text{Ec.3.3})$$

Condición 2:

$$K_s \gg C_s \therefore \frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_{max}}{K_s} \cdot C_x \cdot C_s \quad (\text{Ec.3.4})$$

Modelo de Haldane: Este modelo desarrollado en 1930, y utilizado ampliamente en sistemas en discontinuo, estudia entre otras cosas, las capacidades de adaptación de microorganismos al medio. Además de esto, es matemáticamente simple para su desarrollo y es una buena representación de la presencia de sustratos inhibitorios en el medio.

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{max} \frac{C_s}{K_s + C_s + K_I(C_s)^2} \cdot C_x \quad (\text{Ec.3.5})$$

Donde $\mu_{\text{máx}}$, C_s , K_s , K_I corresponden a tasa de crecimiento específico (h^{-1}), concentración de sustrato (g/mL), constante de saturación (g/mL) y constante de inhibición por sustrato (g/mL)

3.4.3. Métodos matemáticos a utilizar para encontrar los parámetros de los modelos cinéticos en el proceso de biorremediación

El análisis de regresión es la aplicación de métodos matemático estadísticos al análisis de datos experimentales y el ajuste de modelos matemáticos a dichos datos mediante la estimación de parámetros desconocidos del modelo (Armijo, 2004).

Desde el punto de vista del análisis de regresión, los modelos se clasifican en modelos lineales y no lineales. La regresión no lineal puede ser una potente alternativa a la regresión lineal porque proporciona la funcionalidad de ajuste de curvas más flexible.

A partir de los datos experimentales recolectados se compararon los modelos cinéticos cuyos parámetros se estimaron a partir del ajuste de los datos experimentales mediante regresiones no lineales, los cuales no tienen dependencia no lineal de sus parámetros, por ejemplo:

$$f_x = a_0(1 - e^{-a_1 x}) + e \quad (\text{Ec.3.6})$$

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.

Para ello se utilizó el método más exacto y difundido para obtener soluciones aproximadas al problema de valor inicial el cual es, Runge Kutta (RK) el cual se utiliza para resolver sistemas de ecuaciones de un modelo cinético propuestos (Oviedo, 2014; Hussain et al., 2016).

Los métodos de Taylor tienen la propiedad de un error local de truncamiento de orden superior, pero la desventaja de requerir el cálculo y la evaluación de las derivadas de $f(x, y)$. Esto resulta algo lento y complicado, en la mayoría de los problemas, razón por la cual, en la práctica casi no se utilizan. El método de Euler, lamentablemente requiere de un paso muy pequeño para una precisión razonable.

Dicho lo anterior, los métodos de Runge Kutta logran la exactitud del procedimiento de la serie de Taylor sin necesitar el cálculo de derivadas de segundo orden.

El método general de Runge Kutta consiste en sustituir el problema de valor inicial aproximando a:

$$\frac{dy}{dx} = f(x, y) \dots y(x_0) = y_0 \quad (\text{Ec.3.7})$$

En esencia, los métodos de Runge-Kutta son generalizaciones de la fórmula básica de Euler:

$$y_{n+1} = y_n + h f(x_n, y_n) \quad (\text{Ec.3.8})$$

en los que el valor de la función f se reemplaza por un promedio ponderado de valores de f en el intervalo $x_i \leq x \leq x_{i+1}$, es decir

$$y_{n+1} = y_n + h(w_1 k_1 + w_2 k_2 + \dots + w_n k_n) \quad (\text{Ec.3.9})$$

En esta expresión las ponderaciones w_i , $i = 1, \dots, m$ son constantes para las que en general se pide que su suma sea igual a 1, es decir, $w_1 + w_2 + \dots + w_n = 1$, y cada k_j es la función f evaluada en un punto seleccionado (x, y) para el cual $x_i \leq x \leq x_{i+1}$. Se muestra que los k_j se definen en forma recursiva.

Se define como orden del método al número n , es decir, la cantidad de términos que se usan en el promedio ponderado, en la tabla 3.1 describe un resumen de los métodos de Runge Kutta desde el primer hasta el cuarto orden.

Tabla 3.1. Cuadro resumen de métodos de resolución Runge Kutta.

Runge Kutta	Resolución integral	Método de estimación de Euler	Resultados
Primer orden	-	$\bar{y}_{n+1}: Euler$	$y_{n+1} = y_n + hk_1$
Segundo orden	Trapezio	$\bar{y}_{n+1}: Euler$	$k_1 = f(x_n, y_n)$ $k_2 = f(x_{n+1}, y_n + h \cdot k_1)$ $y_{n+1} = y_n + \frac{h}{2}(k_1 + k_2)$
Tercer orden	Simpson	$\bar{y}_{n+1}: Euler$ $\bar{y}_{n+1/2}: Euler$	$k_1 = f(x_n, y_n)$ $k_2 = f(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{h \cdot k_1}{2})$ $k_3 = f(x_n + h, y_n - k_1 + 2h \cdot k_2)$ $y_{n+1} = y_n + \frac{h}{6}(k_1 + 4k_2 + k_3)$
Cuarto orden	Simpson	Similar a tercer orden con adición de paso intermedio	$k_1 = f(x_n, y_n)$ $k_2 = f(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{h \cdot k_1}{2})$ $k_3 = f(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{h \cdot k_2}{2})$ $k_4 = f(x_n + h, y_n + h \cdot k_3)$ $y_{n+1} = y_n + \frac{h}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4)$

Fuente: (Guerrero, et al., 2021)

Para la aplicación del Método de Runge Kutta, se puede utilizar en una hoja electrónica de cálculo (Excel) para obtener los resultados, y visualizar con mayor facilidad, las soluciones, mediante los gráficos de las cinéticas respectivas. Así mismo, se ajustan muy bien al algoritmo general formulado en la figura 3.3, la cual presenta el Scripts para determinar la pendiente del método clásico RK de cuarto orden.

```

SUB RK4 (x, y, h, ynew)
CALL Derivs(x, y, k1)
ym = y + k1 * h/2
CALL Derivs(x + h/2, ym, k2)
ym = y + k2 * h/2
CALL Derivs(x + h/2, ym, k3)
ye = y + k3 * h
CALL Derivs(x + h, ye, k4)
slope = (k1 + 2(k2 + k3) + k4)/6
ynew = y + slope * h
x = x + h
END SUB
    
```

Figura 3.3. Scripts para determinar un solo paso del método RK de cuarto orden.

Fuente: (Chapra y Canale, 2007)

3.5. Diseños Experimentales

El diseño experimental es usado frecuentemente en la investigación, principalmente en la industria, biología y ciencias agropecuarias, en las áreas del desarrollo de producción y control de calidad. Para la optimización de un proceso se deben tener en cuenta muchos factores o parámetros que este requiere y las condiciones bajo las cuáles se trabaja. El objetivo de la experimentación es estudiar los efectos de la variación de los factores que se involucran en la elaboración y determinación de la mejor combinación de ellos.

El proceso o sistema de estudio puede representarse por medio de la Figura 3.4, algunas variables del proceso x_1, x_2, \dots, x_p son controlables, mientras que otras z_1, z_2, \dots, z_q son incontrolables (Montgomery, 2005).

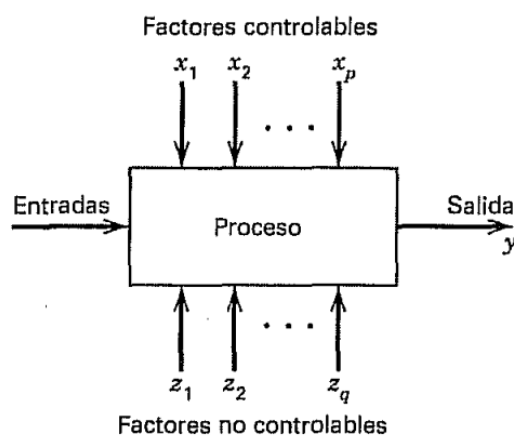


Figura 3.4. Modelo general de un proceso o sistema.

Fuente: (Montgomery, 2005)

Teniendo en cuenta el diagrama presente, los objetivos del experimento pueden ser:

- Determinar cuáles son las variables que tienen mayor influencia en la respuesta.
- Determinar el mejor valor de la x que influyen en y , de modo que tenga casi siempre un valor cercano al valor nominal deseado.
- Determinar el mejor valor de las x que influyen en y , de modo que la variable de y sea pequeña.
- Determinar el mejor valor de las x que influyen en y , de modo que minimicen los efectos de las variables incontrolables.

La aplicación del diseño experimental proporciona grandes ventajas, entre las cuales se pueden considerar (Carrasco, 2005):

- Establecer el número de corridas o experiencias que deben realizarse, además de proporcionar por medio de diseños especializados el uso de un número

menor de corridas en caso de no contar con los recursos para realizar el diseño completo.

- Determinar el mecanismo por el cual las variables independientes afectan las propiedades del producto y el comportamiento del proceso.
- Establecer la combinación de factores que den solución al problema que se presente.
- Es la base para establecer las estrategias en búsqueda de la optimización.

3.5.1. Diseño Factorial

Cuando existe más de una variable independiente en un diseño experimental recibe por nombre diseño factorial, este se entiende que en cada ensayo o réplica completa del experimento se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores (Montgomery, 2005). En un diseño factorial completo, se incluyen todas las posibles combinaciones de niveles de los distintos factores, por lo general se utiliza cuando hay cuatro o menos variables del proceso incluidas en el experimento.

En esta investigación se utilizará el diseño factorial $3^k = 3^3$ modelo que considera k factores con tres niveles cada uno y tiene $3k$ tratamientos, en el análisis existen varias notaciones diferentes que se usan, para representar estos niveles de los factores; una posibilidad es representar los niveles de los factores con los dígitos 0(bajo), 1 (intermedio) y 2 (alto). Cada combinación de tratamientos del diseño $3k$ se denotará por k dígitos, donde el primer dígito indica el nivel del factor A, el segundo dígito indica el nivel del factor B, ..., y el dígito k -ésimo indica el nivel del factor K.

El modelo de diseño de experimentos completo con tres factores, interacción y replicación tiene el siguiente modelo matemático:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (\text{Ec.3.10})$$

con ε_{ijkl} son v. a. independientes con distribución $N(0, \sigma^2) \forall i, j, k, l$

Donde $i= 1, 2, 3, j= 1, 2, 3, k= 1, 2, 3, l= 1, 2, \dots n$, las y_{ijkl} son las respuestas al tratamiento ijk -ésimo en la replicación l -ésima, con n repeticiones de cada tratamiento, μ es un parámetro común a todos los tratamientos denominado media global, α_i es un parámetro del i -ésimo nivel del factor A, β_j es el parámetro del j -ésimo nivel del factor B, γ_k es el parámetro del k -ésimo nivel del factor C. Los términos en paréntesis son los respectivos efectos de la interacción entre los diferentes niveles de los tres factores y ε_{ijkl} es la componente aleatoria del error, la cual se supone normal con media cero y varianza constante σ^2 .

El objetivo de usar este diseño factorial es desarrollar un procedimiento de análisis de influencia entre los factores en estudio (Concentración inicial de Diésel, tipo de consorcio y temperatura) acompañado de los métodos de análisis de varianza (ANOVA).

3.5.2. Método de optimización con Superficie Respuesta

Cuando se aborda un tema de optimización, se consideran algunos diseños que tienen por objetivo primordial el encontrar los parámetros de diseño ideales que optimicen la respuesta esperada, ejemplo de ellos son los diseños de Superficie de Respuesta de primer y segundo orden.

La optimización mediante el método de superficie respuesta ofrece varias ventajas al permitir la implementación de sistemas económicos, acortar los procesos unitarios y mejora la calidad de los mismos ya que permite obtener una gran cantidad de información en un pequeño número de experimentos empleando como base condiciones previamente seleccionadas de experimentaciones justificadas mediante modelos matemáticos y estadísticos.

La metodología de superficie respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas usadas para el estudio de las relaciones empíricas entre una o más respuestas que son medidas y el diseño de variables o factores que los crearon. Estos métodos estadísticos, consisten en un cuidadoso diseño de experimentos y el análisis de los subsiguientes datos, fueron introducidos, primero por Box y Wilson, más tarde desarrollados por Box y Hunter (Gómez y Batista, 2006).

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas que comprende:

1. Desarrollar una serie de experimentos (diseñar un conjunto de experimentos) que producirán una adecuada y confiable medición de la respuesta de interés.
2. Determinar un modelo matemático que ajuste de mejor manera los datos recolectados del diseño seleccionado en el paso anterior (1), a través de la conducción apropiada de pruebas de hipótesis concernientes a los parámetros del modelo.
3. Determinar los valores óptimos de los factores experimentales que producen el valor máximo (o mínimo) de la respuesta.

Por lo general la superficie respuesta se presenta gráficamente como se muestra en la Figura 3.5, donde se gráfica E (y) o el rendimiento del proceso, contra los niveles X_1 y X_2 . Para ayudar a visualizar la forma de una superficie de respuesta,

con frecuencia se grafican los contornos de la superficie, estas gráficas por lo general se proyectan en la base de los cuadrantes, cada contorno indica la altura particular de la superficie.

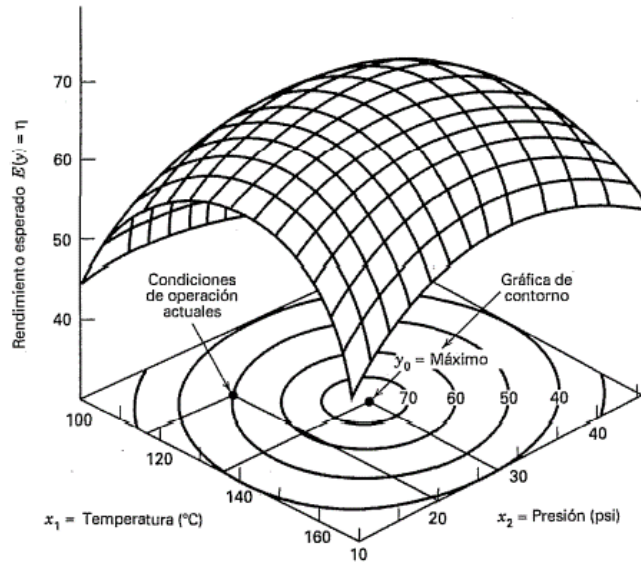


Figura 3.5. Superficie de respuesta. Rendimiento esperado.

Fuente: (Montgomery, 2005)

El posible comportamiento de las respuestas como función de los factores seleccionados, se ilustran en la Figura 3.6, en cada caso, el valor de la respuesta se incrementa de arriba abajo y los niveles de cada factor se incrementan de izquierda a derecha. Es decir, si la respuesta se comporta como en el inciso a), para cuantificar ese comportamiento la matriz de diseño necesita tener sólo dos niveles, superior e inferior. Este modelo es una suposición básica de un diseño factorial simple.

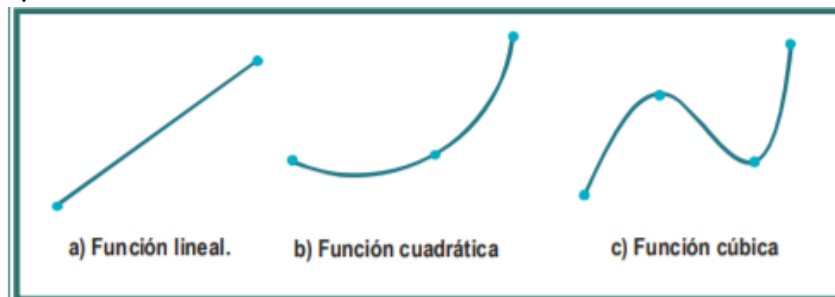


Figura 3.6. Forma gráfica de las funciones.

Si la respuesta se comporta como en el inciso b) para poder cuantificar la respuesta, el número mínimo de niveles requerido para cada factor es tres. En este comportamiento por lo general se añaden puntos centrales. Finalmente, en los casos más complejos como en el del inciso c) la matriz de diseño debe contener al menos cuatro niveles para cada factor. Por lo general un modelo

cuadrático es más que suficiente para describir el comportamiento de un proceso. La forma gráfica de estos puede ser de varios tipos los más comunes que se pueden presentar son los siguientes (Figura 3.7):

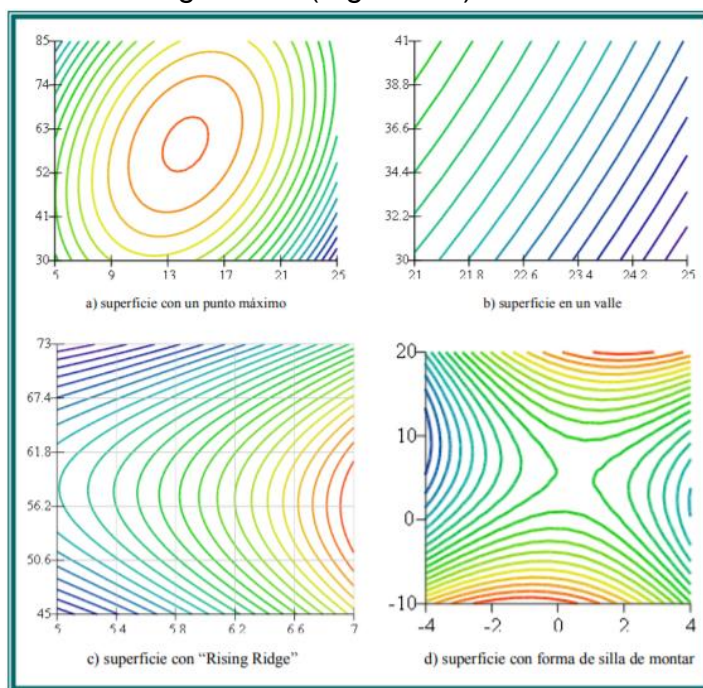


Figura 3.7. Formas generales de superficies cuadráticas que pueden encontrarse.

Los diseños de superficie respuesta permiten de manera eficiente investigar el espacio de los factores iniciales a través de la utilización de experimentos de primer orden, seguido de uno de segundo orden.

El análisis de un experimento de segundo orden puede ser realizado por aproximación de la relación de superficie de respuesta con un ajuste del modelo de regresión de segundo orden. Los diseños de segundo orden que permiten estimar eficientemente modelos de regresión de segundo orden son de gran importancia dentro de esta metodología. Estos incluyen los Diseños Central Compuesto (DCC), los Diseños Box-Behnken, Diseños a tres-Niveles, Diseño Draper-Lin y Diseños de mezcla.

De esta manera, un diseño de superficie respuesta cuando la región experimental está cerca o dentro de la región del óptimo, la segunda fase del estudio de superficie de respuesta inicia. Su principal objetivo es obtener una aproximación acertada de la superficie de respuesta en una región pequeña alrededor del óptimo e identificar condiciones de proceso óptimas. Cerca del óptimo de la superficie de respuesta, los efectos de curvatura son los términos dominantes y la superficie de respuesta puede ser aproximada por un modelo de segundo orden,

$$y_{ijklr} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i^2 + \varepsilon \quad (\text{Ec.3.11})$$

donde β_i representa el efecto lineal de x_i , β_{ij} representa la interacción lineal entre x_i , x_j , y β_{ii} representa el efecto cuadrático de x_i . Un diseño o experimento que permite estimar los coeficientes de la expresión anterior es llamado diseño de segundo orden o experimento de segundo orden, respectivamente.

Por tanto, el objetivo último de la MSR es determinar las condiciones de operación óptimas del sistema o determinar una región del espacio de los factores en la que se satisfagan los requerimientos de operación.

3.5.2.1. Diseño de Superficie Respuestas con tres-niveles.

Para realizar la optimización de las variables respuestas en el proceso de biodegradación de hidrocarburos, se aplicó la metodología de superficie respuesta en donde se utilizó un Diseño de Superficie Respuesta a 3^k (tres niveles), siendo el método más eficiente que se adapta a la investigación ofreciendo flexibilidad en el análisis. Estos diseños son un tipo de diseño central compuesto con un alfa de 1 y un bloque mayor de 27. En este diseño, los puntos axiales se encuentran en el centro de cada cara del espacio factorial, de manera que los niveles = + 1. Esta modalidad de diseño requiere de 3 niveles de cada factor. Este diseño también se puede producir al ampliar un diseño factorial o de resolución V existente con los puntos axiales adecuados.

Los diseños a tres niveles generan corridas en cada combinación de estos tres niveles. Con 3 factores experimentales, obteniendo 27 corridas, así como en este caso en la investigación. Esto podría ser ventajoso cuando los puntos en las esquinas del cubo representan combinaciones de niveles que son prohibitivamente costosas o imposibles de probar debido a las limitaciones del proceso físico.

Un Diseño de Superficie Respuesta de este tipo ha de cumplir los siguientes requisitos de diseño:

- Para cada factor, o variable independiente, se colocan tres valores igualmente espaciados, generalmente codificados como “-1”, “0” y “+1”.

- El diseño debe ser suficiente para ajustarse a un modelo cuadrático, es decir, uno que contenga términos al cuadrado, productos de dos factores, términos lineales y una intersección.
- La estimación de la varianza debería depender principalmente de la distancia hacia el centro del cubo.

Este diseño es de importancia al realizar el estudio comparativo a desarrollarse en este trabajo, por lo que es considerado como uno de los diseños de segundo orden para ajustar superficies de respuesta.

IV. METODOLOGÍA

El presente trabajo de tesis es una investigación aplicada dado que tiene por objeto resolver un problema como es la contaminación de los hidrocarburos a través de la biorremediación, estableciendo la influencia que tienen los parámetros en estudio (Consortio, Concentración inicial de Diésel y Temperatura) en la biorremediación.

Dicho lo anterior, también se clasifico como una investigación predictiva analizando alternativas e identificando áreas claves para resolver la problemática, combinada con otros elementos como la investigación descriptiva, explicativa y proyectiva, dado que se optimizó el proceso de biorremediación prediciendo la incidencia de cada parámetro en estudio por medio de métodos de diseños experimentales.

El universo de esta investigación se conformó por:

- El proceso de biodegradación de hidrocarburos por la acción de consorcios microbianos y sus parámetros operacionales
- Los consorcios bacterianos, objetos de estudio.
- El sustrato limitante siendo este el diésel, que es la sustancia contaminante objeto de estudio.
- Los modelos cinéticos que se describen y se ajustan al proceso de biodegradación.

4.1. Métodos y procedimientos para establecer el crecimiento microbiano de cada consorcio bacteriano adaptado al consumo de Diésel.

En etapas anteriores a esta investigación fueron aislados, obtenidos y conformados tres consorcios bacterianos provenientes de tres emplazamientos contaminados por hidrocarburos. Estos consorcios han sido caracterizados conforme su composición bacteriana y adaptados al consumo de diésel como única fuente de energía y carbono.

Todas las actividades realizadas, Determinación de Biomasa y Concentración final de sustrato, se realizaron en los laboratorios de Ingeniería del Departamento de Investigación y Desarrollo de la Empresa ARS Construcciones, Energía y Medio Ambiente.

Para la toma de muestras de suelos contaminadas utilizadas en el presente trabajo fueron tomadas por el Personal de los Laboratorios de dicha empresa, ARS, donde procedieron a la documentación de los muestreos realizados, a su transporte, conservación y entrega de forma confidencial y controlada. Con ello 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).

4.1.1. 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.



Figura 4.1. Espectrofotómetro Modelo Pharma Spec 1700 Marca Shimadzu.

Para determinar la medida real de la concentración de microorganismos en las muestras (g/L), se realizó el calibrado con la densidad óptica (DO), dado que esta no era 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 determinaría como la concentración de sólidos volátiles (SV), presentes en la muestra analizada.

El procedimiento que se realizó para medir la concentración de biomasa presente en la muestra de análisis fue el siguiente:

En un matraz Erlenmeyer de 1 L de capacidad se adicionó 400 mL de medio BHB al 1% (v/v) en diésel y 4 mL de un inóculo del consorcio microbiano. Esta solución obtenida, se colocó en un baño de agitación en condiciones de laboratorio.

Durante el periodo de incubación, y durante intervalos de 10 horas se tomaron muestras trasvasándolas a tubos Falcon para determinar la densidad óptica y con la curva de calibración se determinó la concentración de Sólidos Volátiles.

En la tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos de la densidad óptica y los sólidos volátiles, con los cuales se determinó la concentración real de Biomasa.

Tabla 4.1. Relación entre DO y SV para determinación de la concentración de biomasa, gcélulas/L.

DO (abs)	SV, gcélulas/L
0.00	0
1.75	890
2.50	1440
3.00	1625
3.50	1970

Con los datos obtenidos de las mediciones de DO y SV, con relación al tiempo y usando Excel se ajustó la curva de calibración de la relación entre 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, Ver Figura 6.1.

Una vez obtenido esto, los valores reales de la concentración de Biomasa se presentan en Anexo I, donde de igual forma se presenta la Concentración de hidrocarburos totales.

4.1.2. Determinación de la concentración de hidrocarburos.

La determinación de la concentración de TPH se realizó en el laboratorio Pace Analytical Services, New Orleans, Estados Unidos, utilizando cromatografía gaseosa en un cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific).



Figura 4.2. Cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific).

La fracción de Diésel presente en las muestras se extrajo con n-hexano y fue separada 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. Al inyector y el detector se les programó a una temperatura de 250 °C y 280 °C, respectivamente y la rampa térmica a emplear fue de: $T_{\text{inicial}} = 50$ °C durante 0.1 min, seguida de un gradiente de 40 °C/ min hasta una $T_{\text{final}} = 280$ °C durante 2.68 min.

El gas portador utilizado fue Helio de máxima pureza y se trabajó a flujo constante de 50 mL min⁻¹. 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.

4.2. Ajuste de modelos matemáticos predictivo del crecimiento microbiano de cada consorcio bacteriano adaptado al consumo de Diésel como única fuente de energía y carbono.

Para el desarrollo y la definición de los modelos cinéticos que mejor se ajuste al proceso 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_{S0}).
- Se agrega el inóculo inicial en el reactor de mezcla perfecta, el cual se distribuye homogéneamente, alcanzando una concentración inicial de C_{X0} .
- En seguida, se inicia una reacción bioquímica al entrar en contacto el consorcio bacteriano (inóculo 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, $C_S(t)$, y de biomasa, $C_X(t)$, 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.

4.2.1. Modelos matemáticos descriptivos del comportamiento cinético.

Dicho lo anterior, se han propuestos tres modelos matemáticos para la descripción del comportamiento cinético del proceso de biodegradación de los hidrocarburos que son:

- Modelo de Teissier
- Modelo de Monod
- Modelo de Haldane

Para ello, 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 modelos propuestos:

Balance de biomasa

$$\frac{dX}{dt} = \mu C_X - K_d C_X \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Balance de sustrato

$$-\left(\frac{dC_S}{dt}\right) = \mu C_X \left(\frac{1}{Y_{X/S}}\right) + q_p C_X \left(\frac{1}{Y_{P/S}}\right) + m_s C_X \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Donde:

- C_X es la concentración de biomasa ($g_{células}/L$);
- C_S 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 ($g_{TPH}/g_{células} h$);
- $Y_{X/S}$ es el rendimiento en masa celular de sustrato ($g_{células}/g_{TPH}$);
- $Y_{P/S}$ es el rendimiento en producto de un sustrato ($g_{producto}/g_{TPH}$);
- μ es la constante cinética de crecimiento ($1/h$).

Siendo

- Teissier

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \exp\left(\frac{-C_S}{K_S}\right)\right) \quad (\text{Ec. 4.1})$$

- Monod

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (\text{Ec. 4.4})$$

- Haldane

$$\mu_{max} \frac{C_S}{K_S + C_S + K_I(C_S)^2} \quad (\text{Ec. 4.5})$$

Donde:

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

4.2.2. Ajuste de los modelos Cinéticos en Berkeley Madonna.

Para la estimación de los parámetros cinéticos de los modelos previamente seleccionados se empleó el método de ajuste de curva no lineal usando el método de Runge Kutta.

Con base a esto, se desarrollaron los modelos mediante el programa informático Berkeley Madonna ya que ha demostrado ser una herramienta útil para el desarrollo de ecuaciones diferenciales y algoritmos como el Runge Kutta.

Berkeley Madonna es un programa que resuelve numéricamente Sistemas de Ecuaciones Diferenciales Ordinarias (ODE) y Ecuaciones de Diferencias (DE).

En el Anexo III y IV, se presentan detalladamente los scripts para cada modelo y el manejo del programa, respectivamente.

4.3. Métodos y procedimientos para la determinación de la influencia de las variables operacionales del proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro, estableciendo su incidencia en la capacidad de remoción del contaminante.

Una vez desarrollados los consorcios microbianos, e identificados aquellos microorganismos con capacidad de degradación de hidrocarburos, se estableció la influencia de los siguientes parámetros: tipo de consorcio, concentración inicial de diésel y temperatura en el desarrollo de la producción de biomasa y el consumo de hidrocarburos como contaminantes.

Para ello se realizó el diseño experimental, considerando los tres factores cada uno con tres niveles, donde se estudió la influencia de los tres tipos de consorcios: Consorcio 1, Consorcio 2, Consorcio 3 que fueron obtenidos de los emplazamientos de suelos contaminados y adaptados al consumo de diésel, las 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. De igual forma se estudió la influencia de la concentración inicial (C_0) de diésel con tres concentraciones distintas, 0.5, 1 y 3%v/v donde finalmente se optimizó el proceso de biodegradación obteniendo un valor máximo para la eficiencia de remoción de hidrocarburos.

4.4. Diseño estadístico de experimentos

Para manipular estadísticamente las variables operacionales del proceso de biodegradación del modelo propuesto y así identificar y cuantificar sus efectos con respecto a las Variables Respuestas se empleó el Diseño estadístico, para obtener información confiable con un número reducido de experimentos.

4.4.1. Diseño factorial completo

Para el caso de estudio, la optimización del proceso de biodegradación, se realizó un diseño factorial 3^3 y Análisis de Varianza (ANOVA) para cada una de las Variables Respuestas (Concentración de Biomasa, Concentración Final de

Sustrato y Eficiencia), donde se evaluaron los factores: Tipo de consorcio, Concentración inicial diésel y Temperatura, con el fin de conocer de manera estadística cuáles de estas variables independientes tienen influencia significativa sobre las variables respuestas evaluadas. El diseño se realizó sin replicas con un total de 27 experimentos. Estos resultados se muestran en la tabla presente en Anexos II.

En la tabla 4.2 se muestran los factores y niveles del experimento, seguido de las variables respuestas estudiadas mostradas en la tabla 4.3.

Tabla 4. 2. Factores y niveles del experimento.

Factores			Niveles		
Nombre del factor	Etiqueta	Unidades	Bajo	Medio	Alto
Tipo de consorcio	C	s/u	1	2	3
Concentración inicial de diésel	Co	%v/v	0.5	1	3
Temperatura	T	°C	25	30	35

Tabla 4.3. Variables de Respuesta.

Variabes Respuesta	Etiqueta	Unidades
Concentración de biomasa	CB	gcélulas/L
Concentración final de sustrato (Diésel)	CD	gcélulas/L
Eficiencia	E	%

4.4.2. Método de optimización con Superficie Respuestas con tres-niveles.

Una vez determinado los factores que influyen en el proceso, se realizó, la optimización del proceso, utilizando el método de Superficie Respuesta a tres niveles, dado que este diseño es eficiente permitiendo un ajuste de modelos cuadráticos.

Para este diseño se utilizó la misma matriz genera por el diseño factorial 3^3 , sin embargo, para el Método Superficie Respuesta (MSR) se descartaron las interacciones triples, ya que los resultados obtenidos del diseño factorial 3^3 reflejaron valores estadísticamente no significativos.

Los resultados fueron generados y analizados mediante Minitab 18 un software estadístico (Ver Anexo V), considerando: el coeficiente de determinación, (R^2), el análisis de varianza (ANOVA) el cual generó los términos cuadráticos, las gráficas de superficie respuesta y grafica de optimización determinando los valores óptimos del proceso de biodegradación.

V. HIPÓTESIS

El tipo de consorcio microbiano, la concentración inicial de diésel y la temperatura son las variables independientes que gobiernan el proceso de biorremediación de hidrocarburos in vitro.

VI. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este acápite se presentan los resultados obtenidos y la discusión de estos, donde se ha estudiado la cinética de biodegradación de hidrocarburos para los tres tipos de consorcios con respecto al tiempo, además, se muestra como punto principal la optimización del proceso a través del diseño de experimento, Factorial 3³ y Método de Superficie de Respuesta.

6.1. Ajuste de modelos cinéticos microbiano de cada consorcio bacteriano adaptado al consumo de Diésel.

6.1.1. Determinación de la concentración de biomasa.

Como resultado obtenido de las mediciones de la Densidad Óptica y Sólidos Volátiles realizados, se estableció la curva de calibración con los datos obtenidos de la Tabla 4.1. Esto se realizó usando el Software Excel, basado en la Regresión lineal, dando como resultado una recta, con estos dos valores y generando una ecuación de primer orden que relaciona DO y SV, como se refleja en la Figura 6.1, para determinar la concentración de biomasa de los microorganismos para cada tiempo de medición.

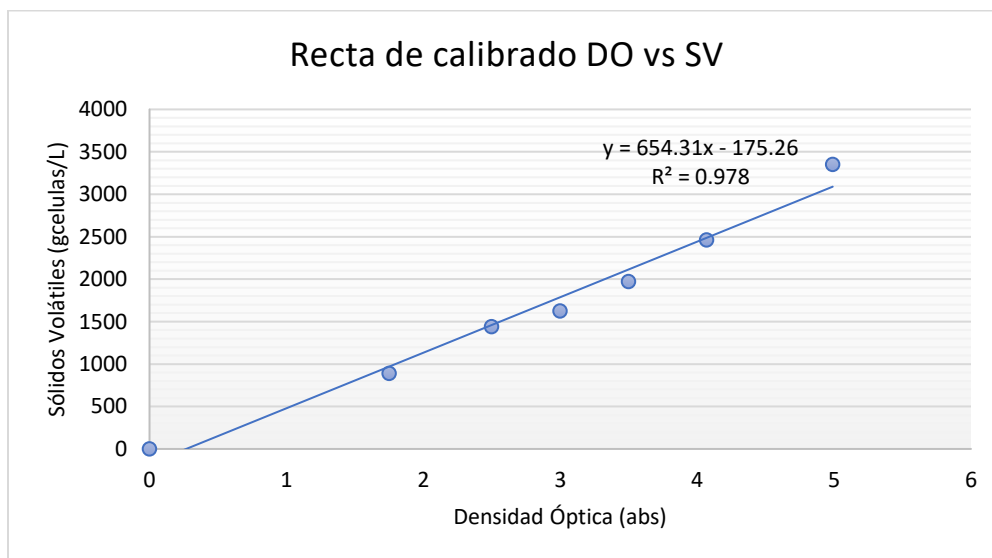


Figura 6.1. Curva de calibración Do vs SV.

En la gráfica de la figura 6.1 se muestra la ecuación de la recta, con un coeficiente de determinación del 0.978, el cual significa que el modelo se ajusta un 97.8%, y los datos presentes están estadísticamente cerca de la línea de regresión ajustada.

6.1.2. Comportamiento cinético microbiano para los tipos de consorcios.

A partir de los datos obtenidos de la ecuación lineal que relaciona la DO vs SV, se obtuvieron los valores de Concentración de biomasa para cada tipo de consorcio, en la figura 6.2 se muestra la cinética de crecimiento microbiano de los 3 tipos de consorcio: 1, 2 y 3, y el consumo del sustrato en función del tiempo.

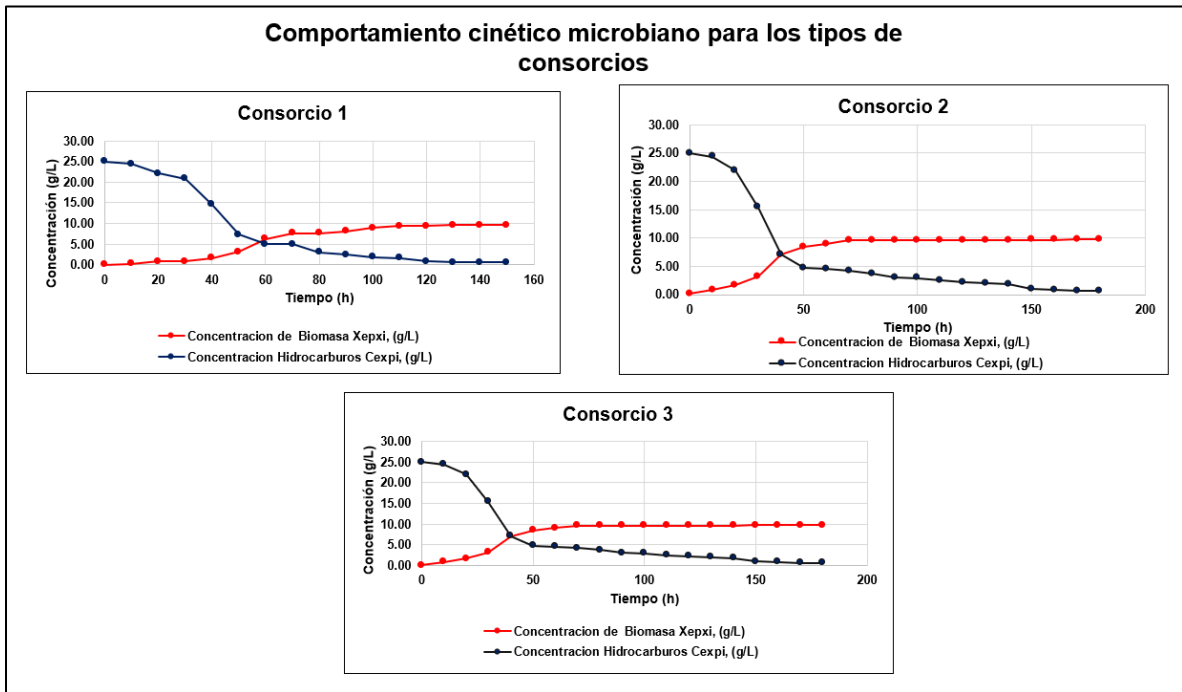


Figura 6.2. Curvas de Crecimiento microbiano y decrecimiento del Sustrato para cada Tipo de Consorcio.

En la Figura 6.3, se muestran las gráficas de velocidad de remoción para los tres tipos de consorcios 1, 2 y 3. Para el consorcio 1, se refleja que la mayor velocidad de crecimiento de biomasa se alcanza a las 60 horas con una velocidad específica de $0.31h^{-1}$, con un porcentaje de remoción del 80%, en un 40% del periodo total, sin embargo, este periodo es 17% menor que en los consorcios 2 y 3.

En el consorcio 2, a las 40 horas se alcanza el mayor pico de crecimiento de biomasa y consumo de sustrato, alcanzando un 71% de remoción, sin embargo, es viable tener en cuenta, que a las 50 horas se alcanza un porcentaje de eficiencia de remoción del 81% de ese punto en adelante la variación es mínima, lo cual permite establecer un rango óptimo de tiempo en 27% del periodo total.

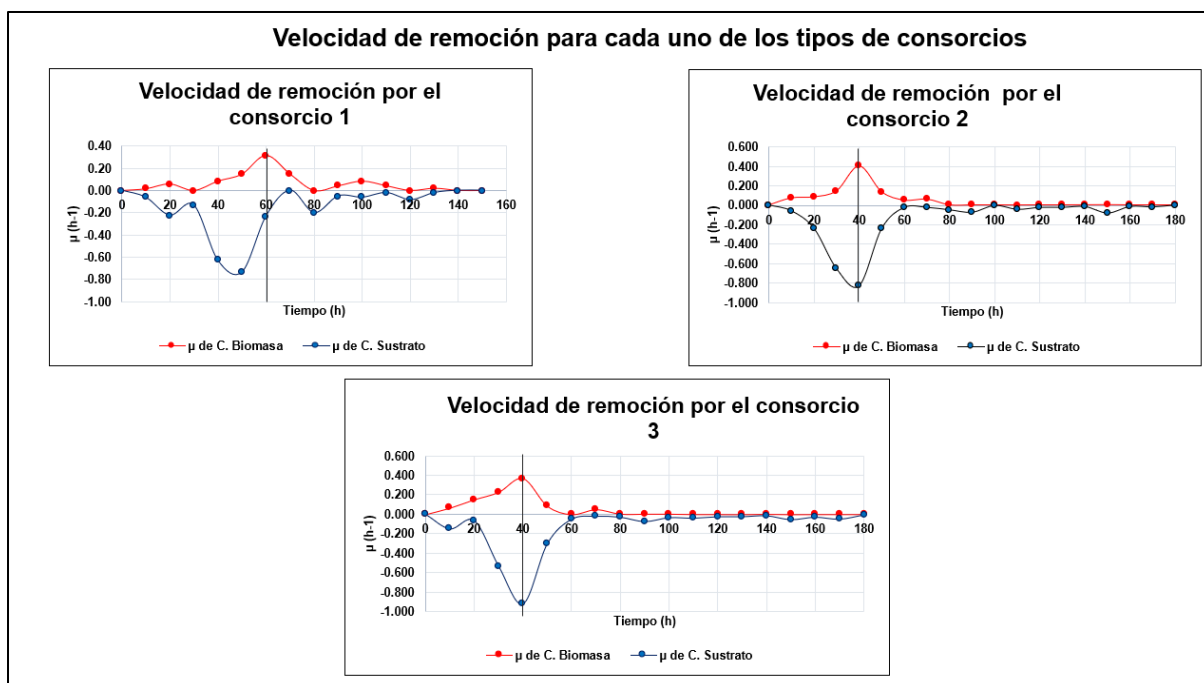


Figura 6.3. Velocidad Específica de Crecimiento para cada Consorcio.

Para el consorcio 3, se nota que el pico de crecimiento se encuentra de la misma forma que el consorcio 2, a las 40 horas, alcanzando un 66% de remoción, sin embargo, es considerable tomar en cuenta el franco de baja de pico en el cual alcanza un 12% extra a las 50 horas logrando un 79% de eficiencia de remoción en 27% del periodo total.

Dicho lo anterior, se determinó que la composición de los microorganismos para cada tipo de consorcio posee un nivel alto de biodegradación para los hidrocarburos, finalizando su etapa exponencial, después de las 40 horas, donde luego a esto se puede re-inocular, al final esta etapa.

6.1.3. Modelos matemático predictivo del crecimiento microbiano de cada consorcio bacteriano adaptado al consumo de Diésel como única fuente de energía y carbono.

El objetivo de los modelos cinéticos, es describir matemáticamente la curva de crecimiento generada por los microorganismos de interés bajo condiciones ambientales con el objeto de estimar los parámetros cinéticos que caracterizan dicha curva. Con este objetivo, para los tres tipos de consorcio 1, 2 y 3, los datos utilizados en este punto se obtuvieron a intervalos de tiempo de 3 horas, para obtener un comportamiento que pueda ser descrito y mejor evaluado con los

modelos propuestos, Teissier, Monod y Haldane, con respecto a las Ecuaciones 4.1. y 4.2.

Para esta investigación se tomó en cuenta solo la etapa Exponencial de la cinética de crecimiento dado que, es en esta etapa, donde los microorganismos se multiplican con rapidez, durante intervalo de tiempo determinado, degradando con rapidez los hidrocarburos, por tanto, para las ecuaciones 4.1 y 4.2, se despreciaron aquellas constantes que no dependen de esta etapa, como lo son, K_d (Constante Cinética de muerte), q_p (Constante Cinética deformación del producto), m_s (Contante Cinética de mantenimiento o estacionaria).

Por lo tanto, las ecuaciones 4.1 y 4.2 de los balances del proceso, quedan de la siguiente forma:

Balance de biomasa

$$\frac{dX}{dt} = \mu C_x \quad (\text{Ec.6.1})$$

Balance de sustrato

$$-\left(\frac{dC_s}{dt}\right) = \mu C_x \left(\frac{1}{Y_{x/s}}\right) \quad (\text{Ec.6.2})$$

Con estas ecuaciones 6.1 y 6.2 que muestran el balance de la reacción, se sustituyó el valor de la tasa de crecimiento (μ) por los modelos matemáticos propuestos en el acápite 4.2.1, derivando con respecto al tiempo. Para el ajuste de los modelos, se utilizó el programa Berkeley Madonna utilizando el método de Runge Kutta 4.

6.1.3.1. Ajuste de modelo cinético para el Consorcio 1.

Para el ajuste cinético del consorcio 1, en las Figuras 6.4, 6.5 y 6.6 se observa el comportamiento cinético tanto para los datos experimentales como los datos teóricos obtenidos con los ajustes realizados a partir de las ecuaciones 6.1 y 6.2 con ayuda del programa Berkeley Madonna, los parámetros obtenidos mediante este ajuste y que describen esta cinética están presente en la Tabla 6.1.

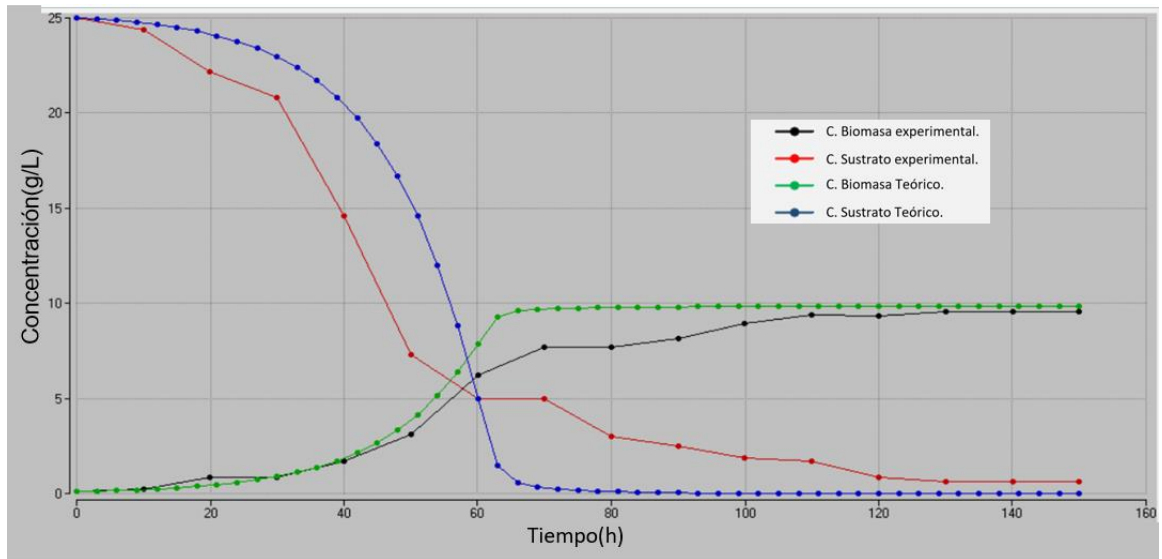


Figura 6.4. Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el consorcio 1 usando el modelo de Teissier.

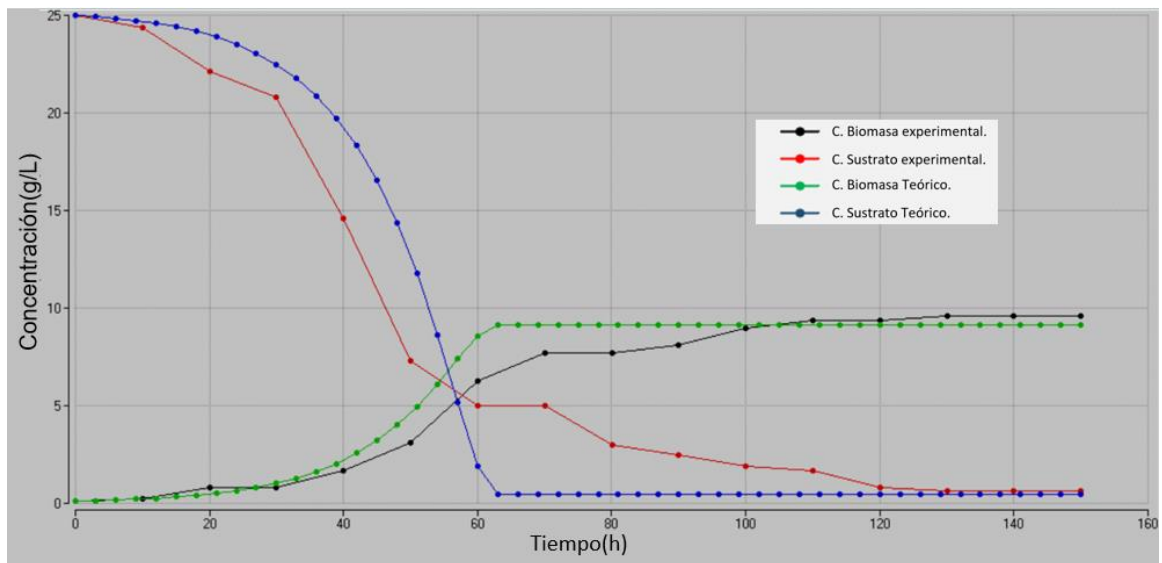


Figura 6.5. Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el Consorcio 1 usando el modelo de Monod.

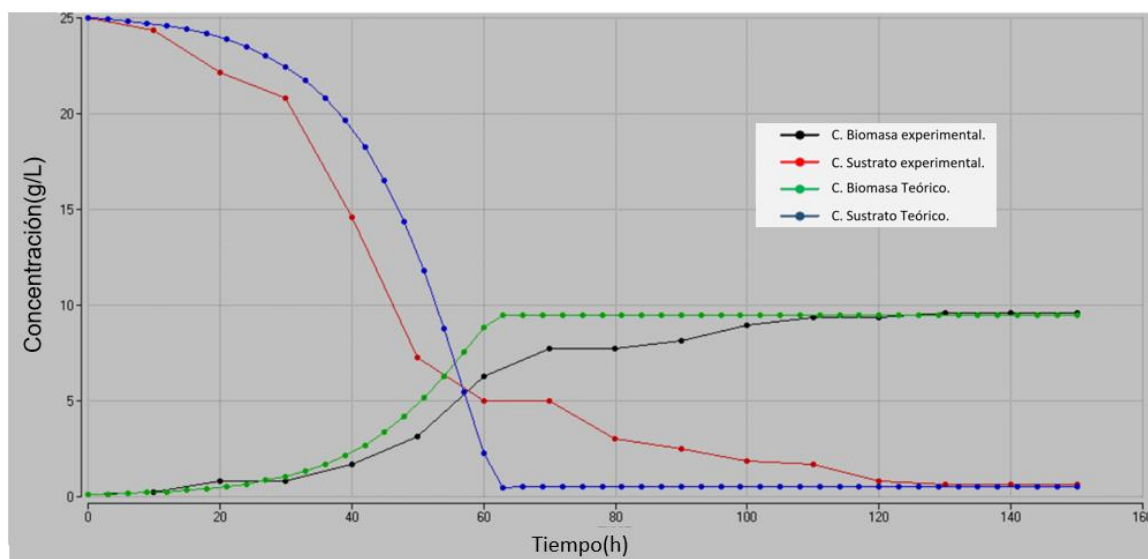


Figura 6.6. Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el Consorcio 1 usando el modelo de Haldane.

En la Tabla 6.1, se presentan los datos obtenidos de la simulación del Berkeley, siendo estos los más influyentes que describen el proceso, indicando que tanto está creciendo el microorganismo y su afinidad por el sustrato empleado en la biodegradación.

Tabla 6.1. Parámetros cinéticos obtenidos de la simulación con Berkeley Madonna para el Consorcio 1.

Tipo de Consorcio	Modelo	$\mu_{\text{máx.}}$ (h^{-1})	K_s (gCs/L)	Y_{xs} (gCél/gCs)	K_i (gCs/L)	RMSE C_x	RMSE C_s
Consorcio 1	Teissier	0.073	2.180	0.389	-	0.040	0.104
	Monod	0.085	2.334	0.367	-	0.125	0.341
	Haldane	0.078	2.104	0.383	-0.004	0.157	0.410

Los modelos de Teissier y Haldane, describen una velocidad de crecimiento similar entre sí, pero menor a la predicha por el modelo de Monod, con una tasa de crecimiento específica ($\mu_{\text{máx}}$) de 0.073, 0.078 y 0.085 h^{-1} , respectivamente, esto sugiere que se presentó un crecimiento microbiano lento a través del tiempo para los modelos, teniendo en cuenta que la tasa de crecimiento específica representa una relación entre las concentraciones iniciales y finales de biomasa.

Además, los valores de Constante de Saturación (K_s) por los modelos Teissier y Haldane, mostraron una alta afinidad de la biomasa por el sustrato como fuente de carbono. Sin embargo, el modelo propuesto por Monod mostró que el microorganismo presentó una menor afinidad por el sustrato al obtener un valor de K_s de 2.33 gCs/L .

El modelo de Haldane, por su parte, brinda información sobre los procesos de inhibición por sustrato en el medio. Con una constante de inhibición despreciable ($K_i = -0.004$ gCs/L), por tanto, es posible deducir que se descartan los posibles procesos inhibitorios por sustrato durante la biodegradación experimental.

El rendimiento entre la relación entre la biomasa obtenida y el sustrato consumido ($Y_{x/s}$), para los tres modelos propuestos, tienen valores similares, representando un buen aprovechamiento del sustrato consumido para la producción de biomasa.

Como otro factor de comparación, se presenta el porcentaje de error cuadrático medio (RMSE) tanto para la biomasa y el sustrato, donde un valor de RMSE igual a 0 (cercano a 0) indicaría un ajuste perfecto a los datos. En general, una RMSE más baja es mejor que una más alta. Dicho esto, el modelo de Teissier para el consorcio 1 obtuvo un resultado de 0.040 y 0.104 de $RMSEC_x$ Y $RMSEC_s$, respectivamente, por tanto, este modelo describe un mejor ajuste de los parámetros utilizados con respecto a los otros dos modelos.

De este modo, se muestran los resultados de los modelos cinéticos propuestos para el consorcio 1, para intervalos de 3 horas.

- Teissier

$$Cx_{ti} = Cx_{ti-1} + [0.073 * (1 - \exp(\frac{-Cs_{ti-1}}{2.1804}))Cx_{ti-1}] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.3})$$

$$Cs_{ti} = Cs_{ti-1} + [0.073 * (1 - \exp(\frac{-Cs_{ti-1}}{2.1804}))Cx_{ti-1} * (\frac{1}{0.389})] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.4})$$

- Monod

$$Cx_{ti} = Cx_{ti-1} + \left[\left(0.085 * \frac{Cs_{ti-1}}{2.334 + Cs_{ti-1}} \right) * Cx_{ti-1} \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.5})$$

$$Cx_{ti} = Cs_{ti-1} + \left[- \left(0.085 * \frac{Cs_{ti-1}}{2.334 + Cs_{ti-1}} \right) * Cx_{ti-1} * \left(\frac{1}{0.367} \right) \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.6})$$

- Haldane

$$Cx_{ti} = Cx_{ti-1} + \left[0.078 * \frac{Cs_{ti-1}}{2.104 + Cs_{ti-1} + (-0.004) * (Cs_{ti-1})^2} * Cx_{ti-1} \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.7})$$

$$Cs_{ti} = Cs_{ti-1} + \left[- (0.078 * \frac{Cs_{ti-1}}{2.104 + Cs_{ti-1} + (-0.004) * (Cs_{ti-1})^2} * Cx_{ti-1} * \left(\frac{1}{0.382} \right)) \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.8})$$

6.1.3.2. Ajuste de modelo cinético para el Consorcio 2.

Para el ajuste cinético del consorcio 2, en las Figuras 6.7, 6.8 y 6.9 se observa el comportamiento cinético para los datos experimentales y los datos teóricos obtenidos con los ajustes realizados a partir de las ecuaciones 6.1 y 6.2, los parámetros obtenidos mediante este ajuste que describen esta cinética están presente en la Tabla 6.2.

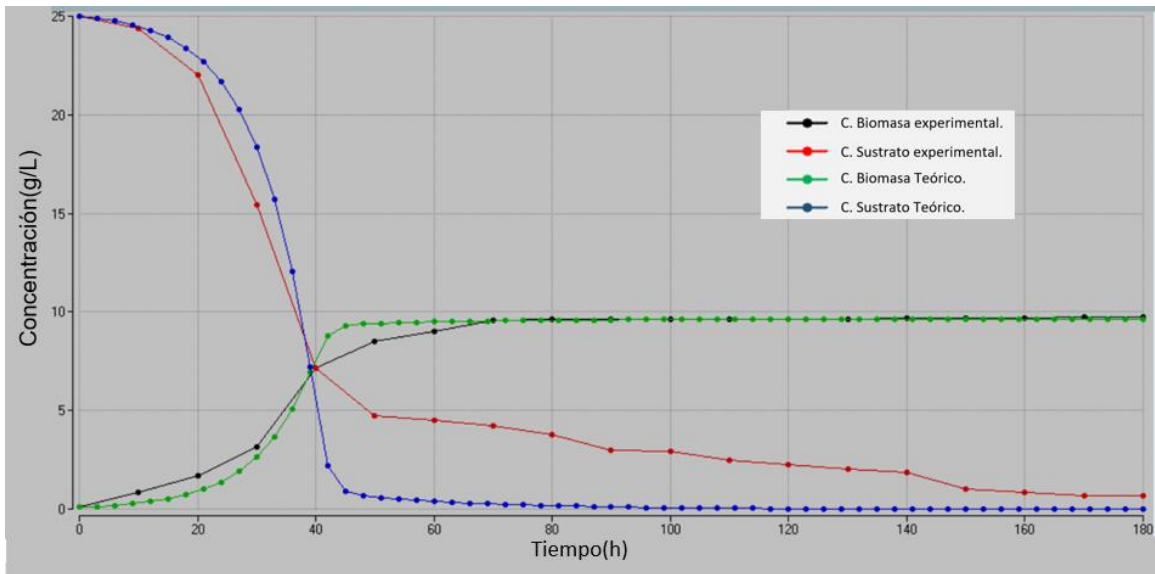


Figura 6.7. Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el consorcio 2 usando el modelo de Teissier.

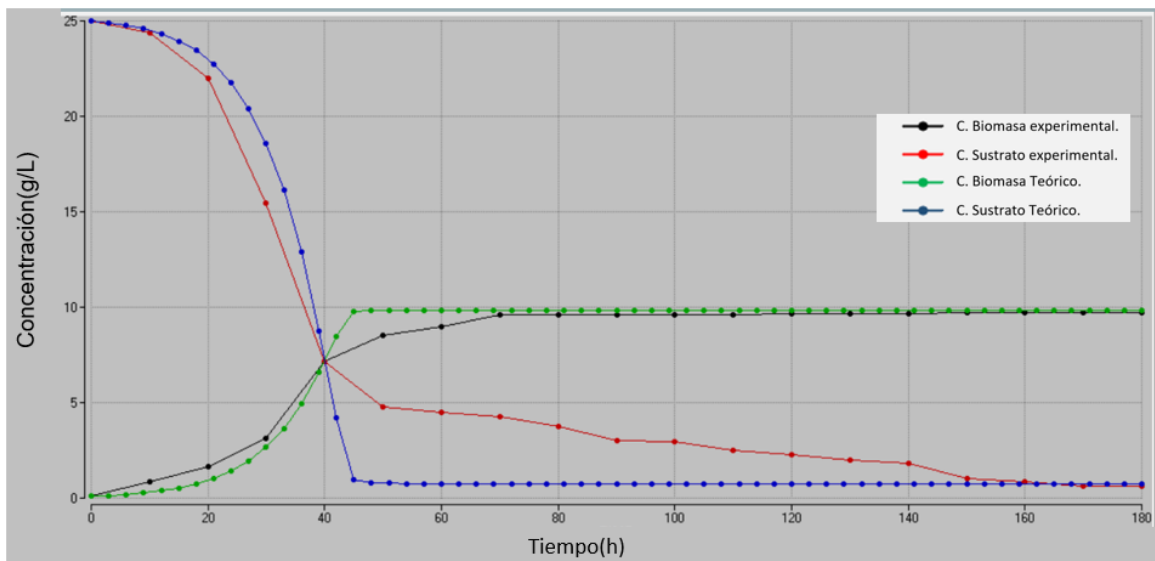


Figura 6.8. Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el Consorcio 2 usando el modelo de Monod.

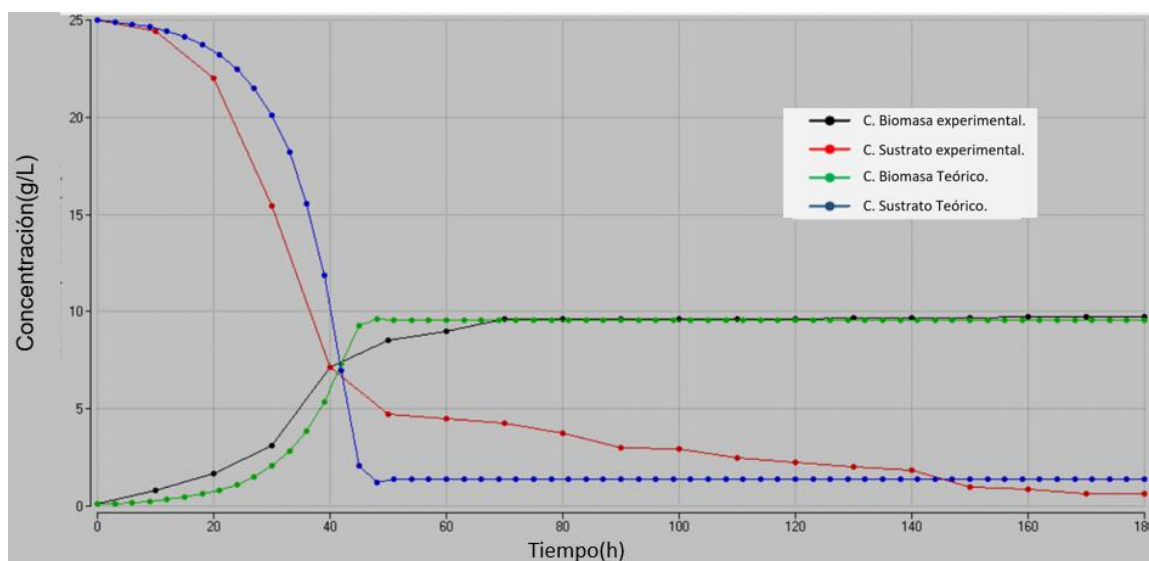


Figura 6.9. Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el Consorcio 2 usando el modelo de Haldane.

En la siguiente tabla se presentan los parámetros cinéticos obtenidos de la simulación del Berkeley para el consorcio 2, en ella se presenta para cada modelo cinético el porcentaje de error cuadrático medio (MSE) para la biomasa y el sustrato, donde el modelo de Teissier obtuvo un resultado de 0.08094 y 0.2121 de $RMSEC_x$ Y $RMSEC_s$, respectivamente, por tanto, este modelo describe un mejor ajuste de los parámetros utilizados con respecto a los otros dos modelos.

Tabla 6.2. Parámetros cinéticos obtenidos de la simulación con Berkeley Madonna para el Consorcio 2.

Tipo de Consorcio	Modelo	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Ks (gC _s /L)	Y _{xs} (gCél/gC _s)	Ki (gC _s /L)	RMSE C _x	RMSE C _s
Consorcio 2	Teissier	0.109	3.104	0.381	-	0.080	0.212
	Monod	0.125	3.396	0.401	-	0.260	0.647
	Haldane	0.178	4.578	0.399	0.024	0.470	1.178

Se establece que los modelos de Teiseer y Monod, describen una velocidad de crecimiento menor a la predicha por el modelo de Haldane aproximadamente, con una tasa de crecimiento específica ($\mu_{\text{máx}}$) de 0.109, 0.1250 y 0.178 h⁻¹, respectivamente, esto sugiere que el crecimiento microbiano es lento a través del tiempo, teniendo en cuenta que la tasa de crecimiento específica representa una relación entre las concentraciones iniciales y finales de biomasa.

El rendimiento entre la biomasa obtenida y el sustrato consumido (Y_{x/s}), para el consorcio 2, representan buen aprovechamiento del sustrato consumido para la producción de biomasa.

Además, los modelos Monod y Teissier, mostraron una alta afinidad de la biomasa por el sustrato como fuente de carbono. Sin embargo, el modelo Haldane mostró que el microorganismo presentó una baja afinidad por el sustrato al obtener un valor muy alto de K_s , así mismo este modelo descarta los posibles inhibidores por sustratos durante la biodegradación teniendo un $K_i = 0.024$ gCs/L.

A continuación, se presentan las ecuaciones de cada uno de los modelos propuestos para el consorcio 2, donde estos, se aproximan a los datos experimentales, teniendo un muy buen ajuste.

- Teissier

$$Cx_{ti} = Cx_{ti-1} + [0.109 * (1 - \exp(\frac{-Cs_{ti-1}}{3.104}))Cx_{ti-1}] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.9})$$

$$Cs_{ti} = Cs_{ti-1} + [0.109 * (1 - \exp(\frac{-Cs_{ti-1}}{3.104}))Cx_{ti-1} * (\frac{1}{0.381})] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.10})$$

- Monod

$$Cx_{ti} = Cx_{ti-1} + \left[\left(0.125 * \frac{Cs_{ti-1}}{3.396 + Cs_{ti-1}} \right) * Cx_{ti-1} \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec. 6.11})$$

$$Cs_{ti} = Cs_{ti-1} + \left[- \left(0.125 * \frac{Cs_{ti-1}}{3.396 + Cs_{ti-1}} \right) * Cx_{ti-1} * \left(\frac{1}{0.401} \right) \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.12})$$

- Haldane

$$Cx_{ti} = Cx_{ti-1} + \left[0.178 * \frac{Cs_{ti-1}}{4.578 + Cs_{ti-1} + (0.024) * (Cs_{ti-1})^2} * Cx_{ti-1} \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.13})$$

$$Cs_{ti} = Cs_{ti-1} + \left[- \left(0.178 * \frac{Cs_{ti-1}}{4.578 + Cs_{ti-1} + (0.024) * (Cs_{ti-1})^2} \right) * Cx_{ti-1} * \left(\frac{1}{0.399} \right) \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.14})$$

6.1.3.3. Ajuste de modelo cinético para el Consorcio 3.

El ajuste cinético del consorcio 3, se representa mediante las siguientes gráficas en las Figuras 6.10, 6.11 y 6.12 que por medio del programa Berkeley Madonna, se ajustó lo más cercano posible los datos teóricos a los datos experimentales, para generar los parámetros con mayor afinidad en el crecimiento microbiano para este consorcio, los resultados de esta gráfica se presentan en la Tabla 6.3.

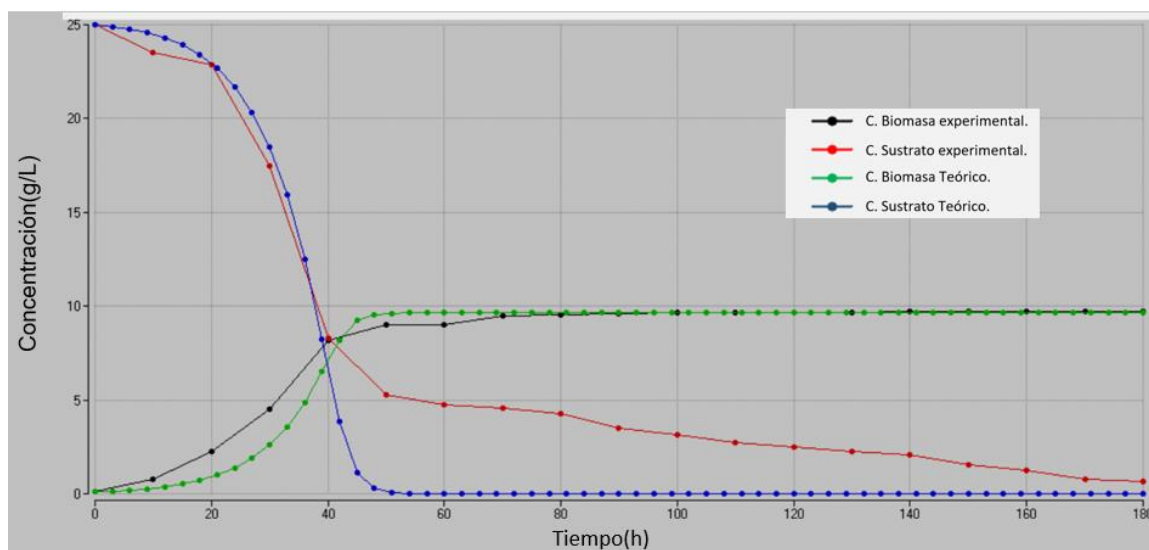


Figura 6.10. Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el Consorcio 3 usando el modelo de Teissier.

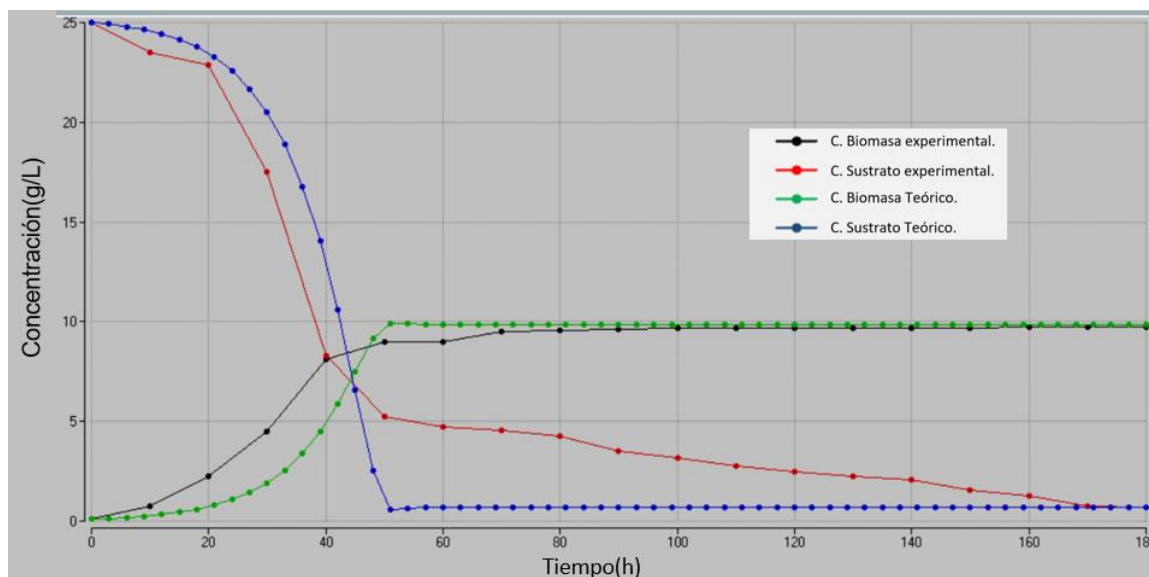


Figura 6.11. Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (hidrocarburos) para el Consorcio 3 usando el modelo de Monod.

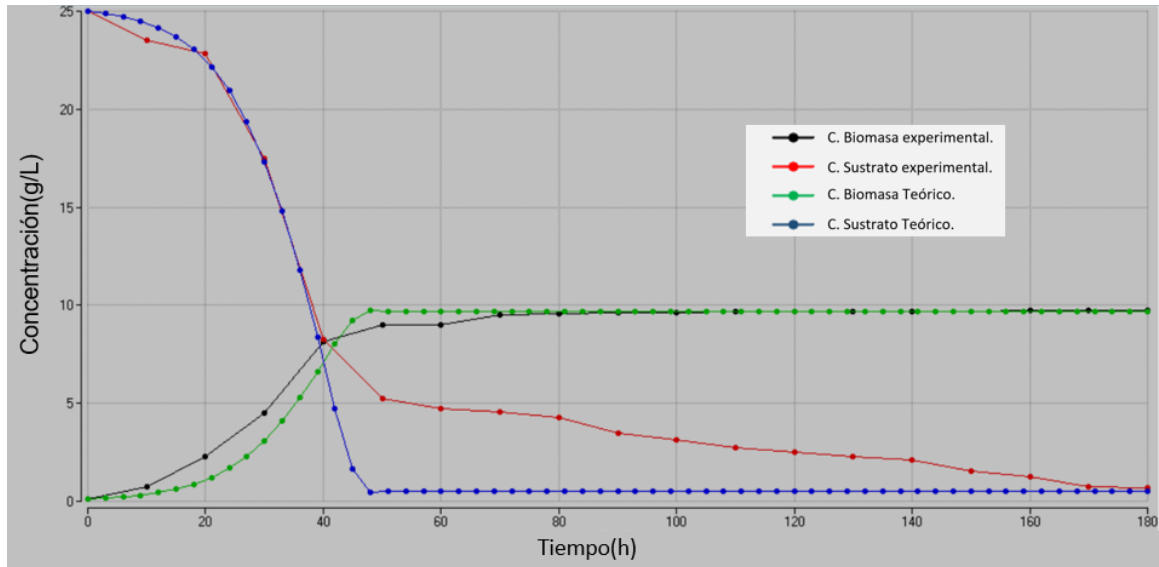


Figura 6.12. Ajuste de la curva de crecimiento de las concentraciones de biomasa y sustrato (TPH) para el Consorcio 3 usando el modelo de Haldane.

Como se puede ver en la Tabla 6.3, que al igual que los otros consorcios el modelo de Teissier presenta mayor ajuste con respecto a la gráfica de los datos teóricos de la concentración de biomasa y sustrato a 180 horas, con un error cuadrático medio (MSE) de 0.017 y 0.045 de $RMSEC_x$ Y $RMSEC_s$, respectivamente presentando así las mismas condiciones y obteniendo parámetros cinéticos similares a los otros tipos de consorcio.

Tabla 6.3. Parámetros cinéticos obtenidos de la simulación con Berkeley Madonna para el Consorcio 3.

Tipo de Consorcio	Modelo	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Ks (gC _s /L)	Y _{xs} (gCél/gC _s)	K _i (gC _s /L)	RMSE C _x	RMSE C _s
Consorcio 3	Teissier	0.109	4.798	0.382	-	0.017	0.045
	Monod	0.111	2.985	0.401	-	0.241	0.601
	Haldane	0.077	2.100	0.391	-0.020	0.178	0.456

De este modo, se muestran los resultados de los modelos cinéticos propuestos para el consorcio 3, para intervalos de 3 horas.

- Teissier

$$Cx_{ti} = Cx_{ti-1} + [0.109 * (1 - \exp(\frac{-Cs_{ti-1}}{4.798}))Cx_{ti-1}] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.15})$$

$$Cs_{ti} = Cs_{ti-1} + [0.109 * (1 - \exp(\frac{-Cs_{ti-1}}{4.798}))Cx_{ti-1} * (\frac{1}{0.381})] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.16})$$

• Monod

$$Cx_{ti} = Cx_{ti-1} + \left[\left(0.111 * \frac{Cs_{ti-1}}{2.985 + Cs_{ti-1}} \right) * Cx_{ti-1} \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.17})$$

$$Cx_{ti} = Cs_{ti-1} + \left[- \left(0.111 * \frac{Cs_{ti-1}}{2.985 + Cs_{ti-1}} \right) * Cx_{ti-1} * \left(\frac{1}{0.402} \right) \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.18})$$

• Haldane

$$Cx_{ti} = Cx_{ti-1} + \left[0.077 * \frac{Cs_{ti-1}}{2.100 + Cs_{ti-1} + (-0.020) * (Cs_{ti-1})^2} \right] * Cx_{ti-1} * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.19})$$

$$Cs_{ti-1} = Cs_{ti-1} + \left[- (0.077 * \frac{Cs_{ti-1}}{2.100 + Cs_{ti-1} + (-0.020) * (Cs_{ti-1})^2}) * Cx_{ti-1} * \left(\frac{1}{0.391} \right) \right] * (t_i - t_{i-1}) \quad (\text{Ec.6.20})$$

6.1.3.4. Resumen de los modelos Cinéticos para cada Consorcio.

La Tabla 6.4 presenta los parámetros cinéticos obtenidos para cada uno de los consorcios en estudio, siendo un resumen de todo el ajuste realizado por el método Runge Kutta en el Berkeley Madonna. Para todos los consorcios el modelo de Teissier, es el que genera un ajuste cercano a los datos experimentales, teniendo el mejor valor del error cuadrático medio en comparación a los otros modelos, describiendo de forma adecuada el crecimiento microbiano y obteniendo estimaciones precisas de los parámetros que caracterizan dicho crecimiento.

Tabla 6.4. Tabla Resumen de los Parámetros cinéticos de cada consorcio.

Tipo de Consorcio	Modelo	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Ks (gCs/L)	Yxs (gCél/gCs)	Ki (gCs/L)	RMSE C _x	RMSE C _s
Consorcio 1	Teissier	0.073	2.180	0.389	-	0.040	0.104
	Monod	0.085	2.334	0.367	-	0.125	0.341
	Haldane	0.078	2.104	0.383	-0.004	0.157	0.410
Consorcio 2	Teissier	0.109	3.104	0.381	-	0.080	0.212
	Monod	0.125	3.396	0.401	-	0.260	0.647
	Haldane	0.178	4.578	0.399	0.024	0.470	1.178
Consorcio 3	Teissier	0.109	4.798	0.382	-	0.017	0.045
	Monod	0.111	2.985	0.401	-	0.241	0.601
	Haldane	0.077	2.100	0.391	-0.020	0.178	0.456

6.2. Influencia de las variables operacionales que gobiernan el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro.

6.2.1. Diseño factorial completo 3^k

Para la determinación de la influencia de las variables operacionales que gobiernan el proceso de biodegradación se evaluaron los 3 factores (Tipo de consorcio, Concentración inicial de Diésel y Temperatura) que influyen en las variables dependientes las cuales son Concentración de Biomasa, Concentración final de sustrato y la eficiencia, donde se realizó el análisis del diseño factorial completo 3^3 no replicado, la decisión de no realizar replicas para este diseño fue tomada con base al análisis de recursos, disponibilidad económica para la investigación.

Los resultados para las variables respuestas obtenidos según el diseño factorial completo general se presenta en la Tabla A.7, en Anexos II.

Aplicando el programa Statgraphics Centurion 16.1.03 se generó el resultado de Análisis de Varianza para cada una de las variables respuesta para determinar los valores significativos en el proceso. En las tablas resumen de ANOVA para cada variable respuesta, la principal columna a analizar fue el **Valor P**. El valor P se puede utilizar para determinar si el factor es estadísticamente significativo y así determinar la aceptación o rechazo de la Hipótesis nula en relación al nivel de significancia de 0.05.

Así mismo, se muestran los modelos de regresión cuadrática para cada variable respuesta, cabe mencionar, que para esta investigación se analizó un factor cualitativo, asumiendo desde luego tres niveles, y los demás factores son cuantitativos. En esta situación teniendo 3 tipos de consorcios que son de interés, el cual se trata de un factor cualitativo que requiere tres niveles, se ajustó un modelo cuadrático con los dos factores, concentración (%v/v) y temperatura ($^{\circ}\text{C}$), con cada tipo de consorcio y para cada variable respuesta (Concentración Biomasa, Concentración final de sustrato y Eficiencia).

6.2.2. Diseño Factorial completo para variable respuesta Concentración de Biomasa.

Para el diseño factorial que tiene como variable respuesta la concentración de Biomasa, el análisis de varianza se muestra en la tabla resumen 6.5.

Tabla 6.5. Análisis de varianza del Diseño factorial completo para la obtención de la concentración de Biomasa.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Consorcio	1	0.00386778	0.00386778	0.04	0.8386
B: C. Inicial Diésel	1	2.43707	2.43707	25.52	0.0004
C: Temperatura	1	1.936	1.936	21.87	0.0009
AA	1	4.55301	4.55301	51.42	0.0000
AB	1	1.51941	1.51941	17.16	0.0020
AC	1	0.3675	0.3675	4.15	0.0690
BB	1	0.142091	0.142091	1.60	0.2339
BC	1	0.151875	0.151875	1.72	0.2196
CC	1	0.424891	0.424891	4.80	0.0533
AAB	1	0.138136	0.138136	1.56	0.2401
AAC	1	0.4225	0.4225	4.77	0.0538
ABB	1	0.580136	0.580136	6.55	0.0284
ABC	1	0.10125	0.10125	1.14	0.3100
ACC	1	0.00054444	0.00054444	0.01	0.9390
BBC	1	0.140625	0.140625	1.59	0.2362
BCC	1	0.0173361	0.0173361	0.20	0.6676
Error Total	10	0.88543	0.088543		
Total (corr.)	26	40.7576			
Resumen del modelo	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)	Error estándar del est.	Error absoluto medio	
	97.8276	94.3517	0.297562	0.138669	

A partir del ANOVA presentado en la Tabla 6.5, se determinó cuales asociaciones entre la respuesta y los factores independientes son estadísticamente significativos, en esta, se observó que los factores, Concentración inicial de Diésel (B), temperatura (C), el cuadrático del consorcio (AA), la interacción del consorcio*concentración (AB) y la interacción del consorcio*cuadrático de la concentración (ABB) son significativos sobre la variable respuesta "Concentración de Biomasa", debió a que sus valores P que son menores al valor $\alpha=0.05$, por tanto existe una asociación estadísticamente significativa entre la variable

concentración de biomasa. Además, el comportamiento del proceso de biodegradación es bien explicado por un modelo cuadrático.

Las interacciones de las tres variables independientes (ABC) resultaron ser no significativas, es decir, no existe asociación entre estas 3 variables, por lo tanto, para en el proceso pueden ser efectos despreciables.

El coeficiente de determinación R-cuadrado indico que la variabilidad en la variable respuesta concentración de biomasa, puede ser explicado en un 97.83% por el diseño factorial, por lo que solo un 2.17% de la variación no fue explicado.

En la Figura 6.13 se presenta la gráfica de Pareto, en el cual es más fácil determinar qué factores son o no significativos para la obtención de la Concentración de Biomasa. La línea vertical corresponde al 95% del límite de confianza, con el cual se puede identificar visualmente aquellos factores significativos en la concentración de la biomasa.

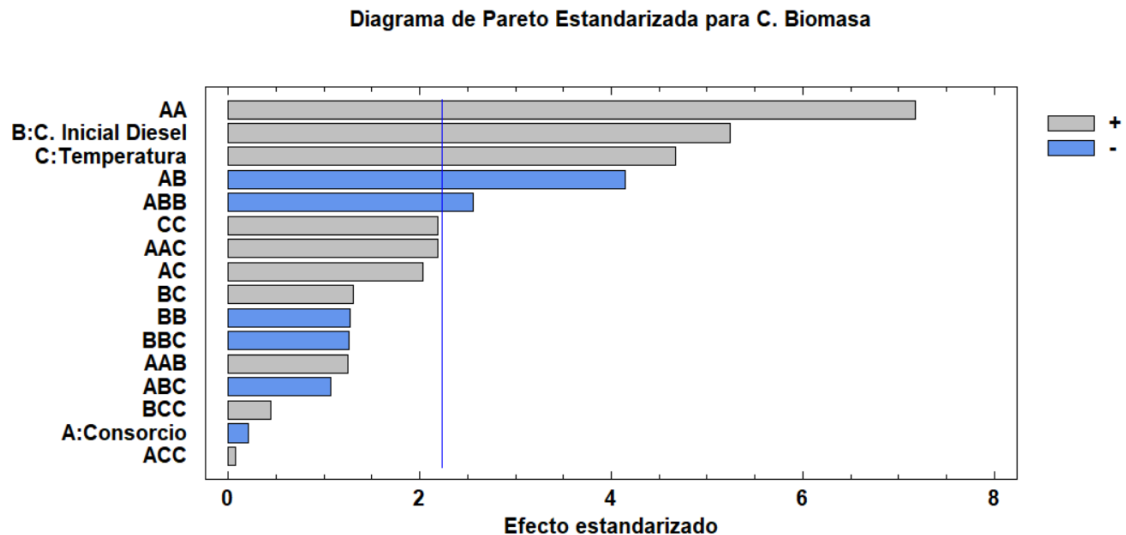


Figura 6.13. Diagrama de Pareto estandarizado para Variable Respuesta C. Biomasa.

La longitud de cada barra, es proporcional al valor absoluto del efecto estandarizado, por lo tanto, lo observado en la Figura 6.13, guarda congruencia con los resultados del ANOVA.

En la Tabla 6.6, se muestran los modelos de regresión cuadrática, los cuales predicen el comportamiento de la relación de la **concentración de biomasa** con respecto a los factores Concentración inicial de Diésel (B) y temperatura (C) para cada tipo de consorcio, el cual presenta un modelo cuadrático con curvatura lo que indica que existe un óptimo entre los niveles de los factores escogidos.

Tabla 6.6. Modelos de regresión cuadrática para el comportamiento de la relación de la concentración de biomasa.

Tipo de consorcio	x_1 =Concentración inicial diésel, x_2 =Temperatura, en unidades codificadas
Consorcio 1	$13 - 1.86x_1 - 0.711x_2 - 0.453x_1^2 + 0.137x_2^2 + 0.00286x_1x_2$
Consorcio 2	$2.26 + 4.248x_1 - 0.096x_2 - 1.0033x_1^2 + 0.00367x_2^2 - 0,0143x_1x_2$
Consorcio 3	$10.43 + 3.165x_1 - 0.662x_2 - 0.788x_1^2 + 0.0146x_2^2 + 0.005x_1x_2$

En la Figura 6.14, se presenta gráficamente los efectos principales, que predice la mayor aceptabilidad del proceso de biodegradación con respecto a la concentración de biomasa, determinada por efectos positivos en las variables operacionales, tipo de consorcio (1), concentración inicial de Diésel (3%v/v) y temperatura (35°C).

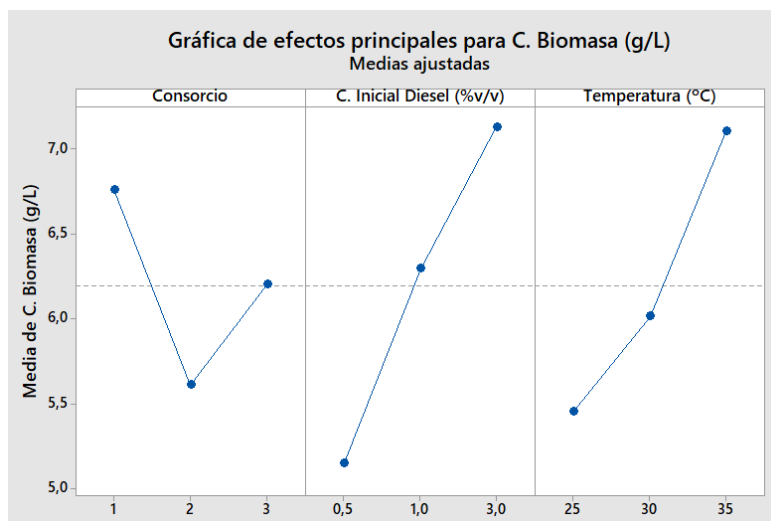


Figura 6.14. Gráfica de efectos principales para C. Biomasa.

De acuerdo al análisis del diseño factorial, se evalúa las interacciones de los factores y su influencia en la concentración de Biomasa. En la Figura 6.14 se observan las interacciones entre Consorcio*Concentración, Consorcio*Temperatura y Concentración*Temperatura, que indican los niveles de cada factor donde hubo mayor valor de concentración de biomasa, notándose que el nivel alto de concentración de sustrato produce el mejor desempeño, mientras que los consorcios 1 o 3, y la temperatura de 35°C pueden ser las más efectivas para aumentar la concentración de la Biomasa.

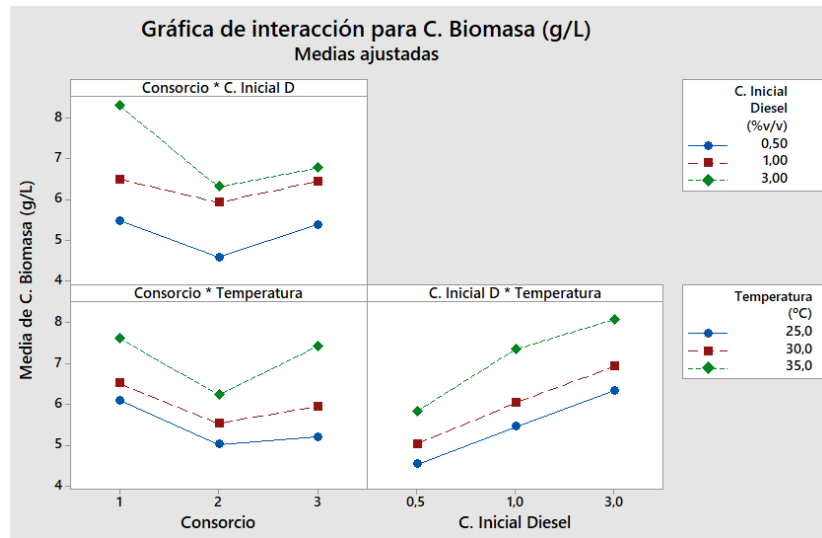


Figura 6.15. Gráfica de interacciones para Variable Respuesta C. Biomasa.

6.2.3. Diseño Factorial completo para variable respuesta Concentración Final de Sustrato.

En cuanto al diseño factorial que tiene como variable respuesta la concentración final del Sustrato, el análisis de varianza se muestra en la siguiente tabla resumen 6.7, que al igual que en el ANOVA para la concentración de biomasa, los efectos Concentración inicial de diésel (B), el cuadrático del consorcio (AA), y la interacción del consorcio*cuadrático de la concentración (ABB) son estadísticamente significativos, por lo tanto estas variables respuestas se relacionan entre si durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos.

Tabla 6.7. Análisis de varianza del Diseño factorial completo para la obtención de la concentración final de sustrato.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Consorcio	1	0.606801	0.606801	2.89	0.1199
B: C. Inicial Diésel	1	16.5208	16.5208	78.73	0.0000
C: Temperatura	1	0.725404	0.725404	3.46	0.0926
AA	1	3.38	3.38	16.11	0.0025
AB	1	4.5633	4.5633	21.75	0.0009
AC	1	0.246533	0.246533	1.17	0.3039
BB	1	11.2523	11.2523	53.62	0.0000
BC	1	0.452408	0.452408	2.16	0.1728
CC	1	0.0133796	0.0133796	0.06	0.8058
AAB	1	1.52934	1.52934	7.29	0.0223
AAC	1	0.508844	0.508844	2.42	0.1505
ABB	1	2.42321	2.42321	11.55	0.0068
ABC	1	0.003125	0.003125	0.00	0.9700
ACC	1	0.0641778	0.0641778	0.31	0.5924
BBC	1	0.238469	0.238469	1.14	0.3115
BCC	1	0.0294694	0.0294694	0.14	0.7157
Error Total	10	2.09855	0.209855		
Total (corr.)	26	90.1659			
Resumen del modelo	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)	Error estándar del est.	Error absoluto medio	
	97.6726	93.9487	0.458099	0.225264	

El coeficiente de determinación R-cuadrado, indicado en el ANOVA, demostró que la variabilidad en la respuesta puede ser explicado en un 97.6726% por el diseño factorial, por lo que solo un 2.33% de la variación no fue explicado por el diseño.

En la figura 6.16, gráfica de Pareto se muestra la influencia de los factores significativos para la concentración final del sustrato. Donde la línea vertical corresponde al 95% del límite de confianza, indicando que hay significancia respecto a la respuesta deseada, siendo proporcional al valor absoluto del efecto estandarizado, por lo tanto, lo observado en el Diagrama de Pareto guarda congruencia con los resultados del ANOVA.

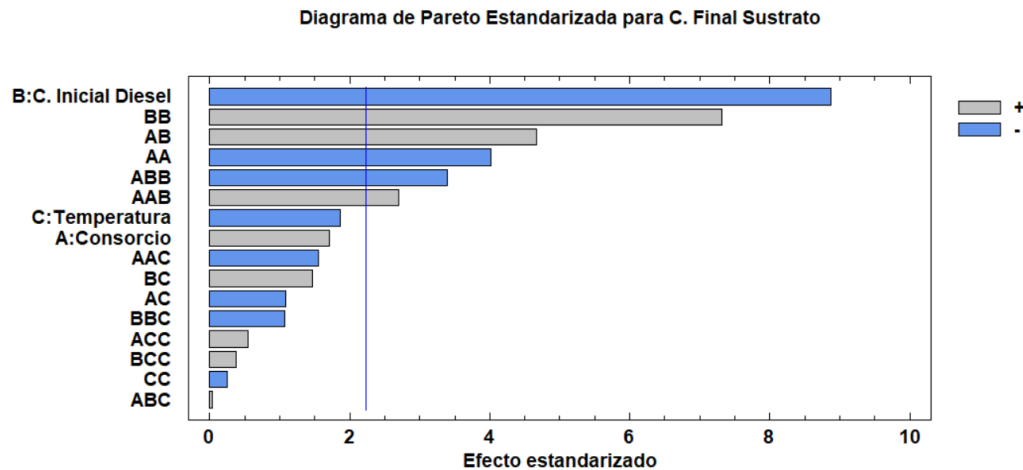


Figura 6.16. Diagrama de Pareto estandarizado para Variable Respuesta Concentración de sustrato final.

En la Tabla 6.8, se muestran los modelos de regresión cuadrática, los cuales predicen el comportamiento de la relación de la **concentración final de sustrato** con respecto a los factores B, C para cada tipo de consorcio (Tipo 1, 2 y 3). El cual al igual que en la variable respuesta de Biomasa presenta un modelo cuadrático con curvatura que indica que existe un óptimo entre los niveles de los factores escogidos: Consorcio, concentración inicial de diésel y temperatura.

Tabla 6.8. Modelos de regresión cuadrática para el comportamiento de la relación de la concentración final de sustrato.

Tipo de consorcio	x_1 =Concentración inicial diésel, x_2 =Temperatura, en unidades codificadas
Consorcio 1	$15.7 - 13.15x_1 - 0.056x_2 + 3.117x_1^2 - 0.0023x_2^2 + 0.019x_1x_2$
Consorcio 2	$7.7 - 13.53x_1 + 0.509x_2 + 3.183x_1^2 - 0.0111x_2^2 + 0.0241x_1x_2$
Consorcio 3	$20.65 - 4.116x_1 - 0.719x_2 + 0.820x_1^2 + 0.0078x_2^2 + 0.0189x_1x_2$

La Figura 6.17, gráfica de efectos principales, se observó la aceptabilidad del proceso de biodegradación en relación a la variable Concentración final de sustrato en efectos negativos, generando un menor valor de este, en los

siguientes niveles: para el tipo de consorcio 1 y/o 2, un nivel alto de concentración del sustrato (3%v/v) y temperatura de 35°C.

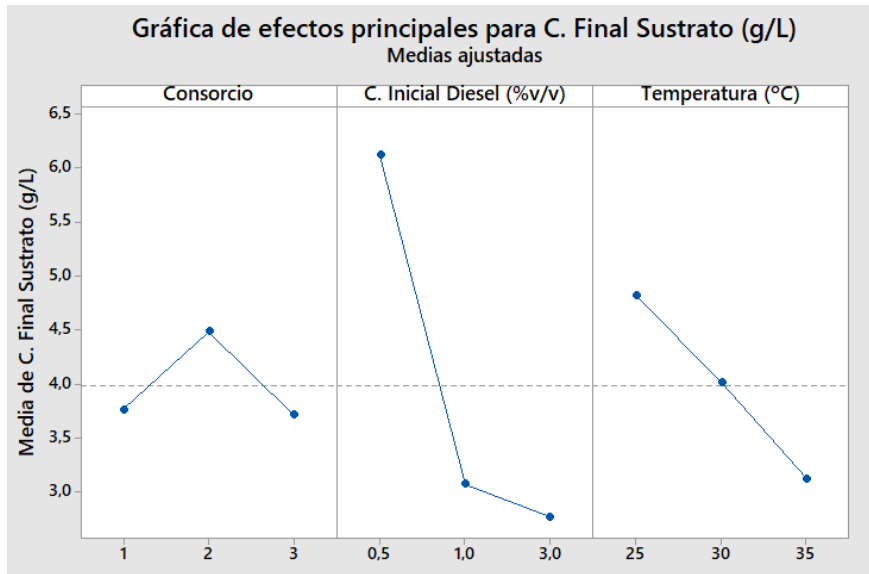


Figura 6.17. Gráfica de efectos principales para la Variable Respuesta C. final de sustrato.

Mediante las gráficas de interacciones se evaluó las relaciones de los factores y su influencia en la concentración final de TPH. En la Figura 6.18 las interacciones entre Consorcio*Concentración, Consorcio*Temperatura y Concentración*Temperatura indican cuales son los niveles de estos factores en cada interacción donde hubo menor valor de la concentración final del sustrato. Donde el nivel alto de concentración inicial del sustrato (3%v/v) produce la mayor disminución de la concentración final del sustrato, sumado a las condiciones del consorcio 1 y la temperatura de 35°C.

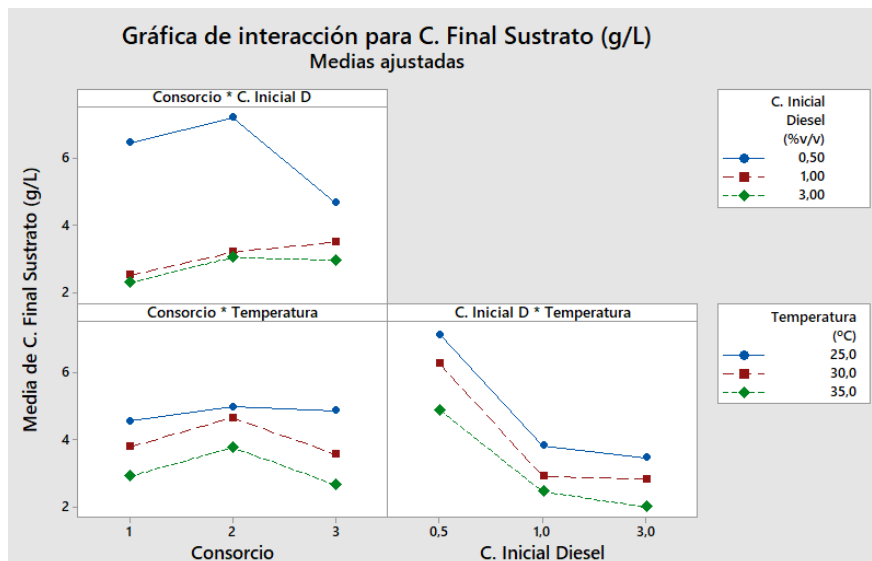


Figura 6.18. Gráfica de interacciones para la Respuesta Concentración Final de Sustrato.

6.2.4. Diseño Factorial completo para variable respuesta de la Eficiencia.

La eficiencia en el proceso de biodegradación se centra en el máximo rendimiento que se puede alcanzar utilizando los mismos recursos de los que se dispone, por tanto, es de mucho interés el conocimiento de la influencia de los factores que lo conforman, para esta variable respuesta Eficiencia, el análisis de varianza se muestra en la tabla resumen 6.9.

Tabla 6.9. Análisis de varianza del Diseño factorial completo para la obtención de la Eficiencia.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Consorcio	1	1.01548	1.01548	0.13	0.7212
B: C. Inicial Diésel	1	200.226	200.226	26.57	0.0004
C: Temperatura	1	11.6065	11.6065	1.54	0.2429
AA	1	35.9171	35.9171	4.77	0.0539
AB	1	32.0133	32.0133	4.25	0.0662
AC	1	3.94453	3.94453	0.52	0.4859
BB	1	218.407	218.407	28.99	0.0003
BC	1	7.23853	7.23853	0.96	0.3501
CC	1	10.14	10.14	1.35	0.2730
AAB	1	43.7362	43.7362	5.80	0.0367
AAC	1	8.14151	8.14151	1.08	0.3231
ABB	1	62.3047	62.3047	8.27	0.0165
ABC	1	0.005	0.005	0.00	0.9800
ACC	1	18.8935	18.8935	2.51	0.1444
BBC	1	3.81551	3.81551	0.51	0.4930
BCC	1	7.00484	7.00484	0.93	0.3577
Error Total	10	75.3471	7.53471		
Total (corr.)	26	1419.96			
Resumen del modelo	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)	Error estándar del est.	Error absoluto medio	
	94.6937	86.20360	2.74494	1.22263	

En el análisis de Varianza que tiene como variable respuesta Eficiencia del proceso, se observa que los factores, Concentración inicial de diésel (B), el cuadrático de la concentración (BB), la interacción del cuadrático de consorcio*concentración (AAB), la interacción del consorcio*el cuadrático de la concentración (ABB), son significativos sobre la Eficiencia, debió a que sus valores de probabilidad (P) que son menores que el valor $\alpha=0.05$.

Así mismo, en el ANOVA, se estable que el coeficiente de determinación R-cuadrado indica que la variabilidad en la respuesta puede ser explicado en un 94.6937% por el diseño factorial, por lo que solo un 5.3063% de la variación no fue explicado por el diseño.

En el análisis de la Eficiencia, la gráfica de Pareto de la Figura 6.19, muestra congruencia con los resultados del ANOVA antes descrito y que la influencia de los efectos BB, B, ABB, AAB son significativos para la Eficiencia, siendo la interacción cuadrática de la concentración (BB) la que tiene mayor impacto sobre el proceso de biorremediación de hidrocarburos.

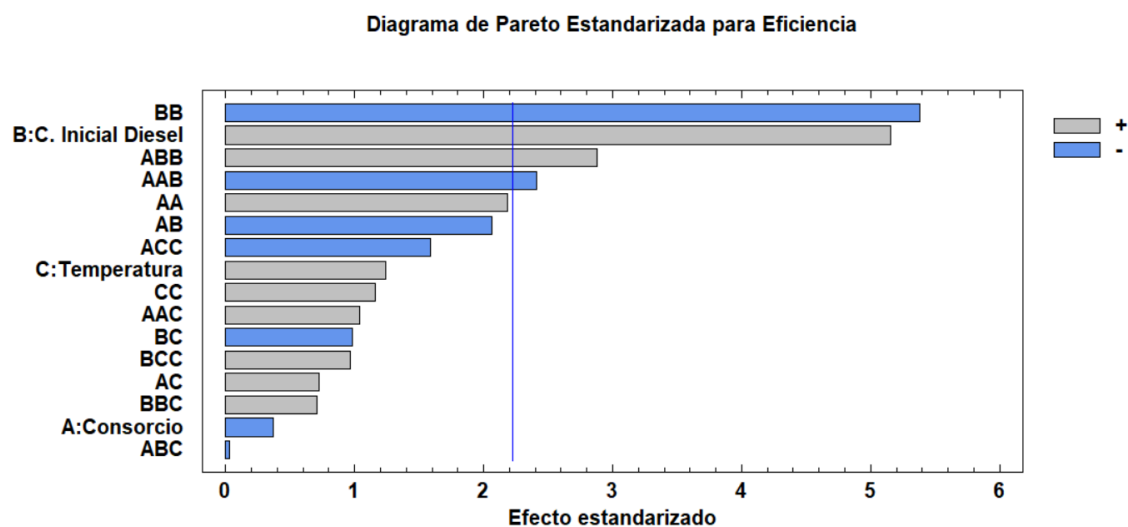


Figura 6.19. Diagrama de Pareto estandarizado para la Eficiencia del proceso.

En la Tabla 6.10, se muestran los modelos de regresión cuadrática, el cual predice el comportamiento de la relación de **eficiencia** con respecto a los factores B, C para cada tipo de consorcio analizado en la investigación, donde se observan valores cuadráticos que puede presentar curvatura indicando valores óptimos en el proceso.

Tabla 6.10. Modelos de regresión cuadrática para el comportamiento de la relación a la Eficiencia del proceso.

Tipo de consorcio	x_1 =Concentración inicial diésel, x_2 =Temperatura, en unidades codificadas
Consorcio 1	$155 + 53.6x_1 - 7.78x_2 - 13.13x_1^2 + 0.143x_2^2 - 0.077x_1x_2$
Consorcio 2	$69 + 54.13x_1 - 2.04x_2 - 12.73x_1^2 + 0.0445x_2^2 - 0.097x_1x_2$
Consorcio 3	$17.4 + 16.46x_1 + 2.87x_2 - 3.280x_1^2 - 0.0312x_2^2 - 0.0754x_1x_2$

La Figura 6.20, gráfica de efectos principales para la eficiencia, se observó que el tipo de consorcio 1 y 3, nivel alto de concentración del sustrato (3%v/v) y

temperatura de 35°C hay un mayor grado de eficiencia durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos.

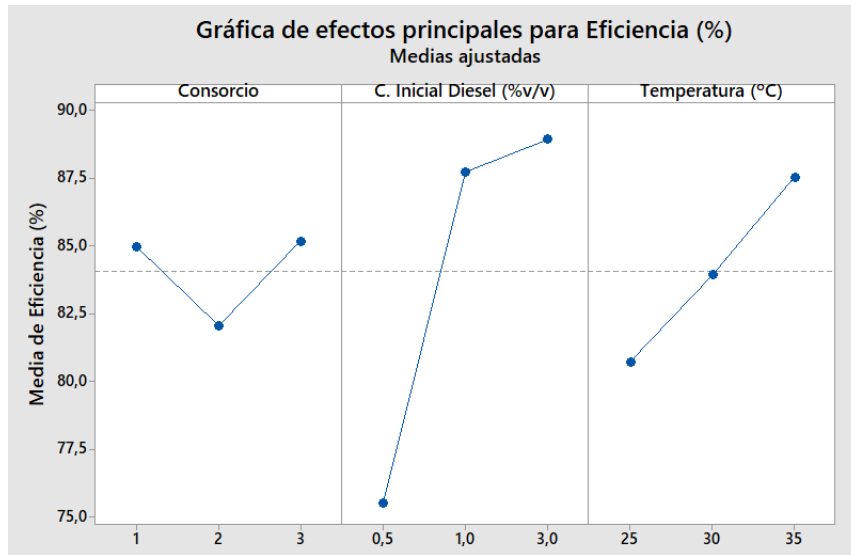


Figura 6.20. Gráfica de Efectos principales para la Eficiencia.

En la Gráfica de interacciones, indican cuales son los niveles de estos factores en cada interacción donde hubo mayor eficiencia en el proceso. Siendo los consorcios que presentan los mejores resultados son el 1 y 3, sin embargo, la interacción entre concentración*temperatura nos demuestra que, sin importar el tipo de consorcio, la mayor eficiencia se logra con una temperatura de 35°C y concentración inicial del sustrato 3%v/v.

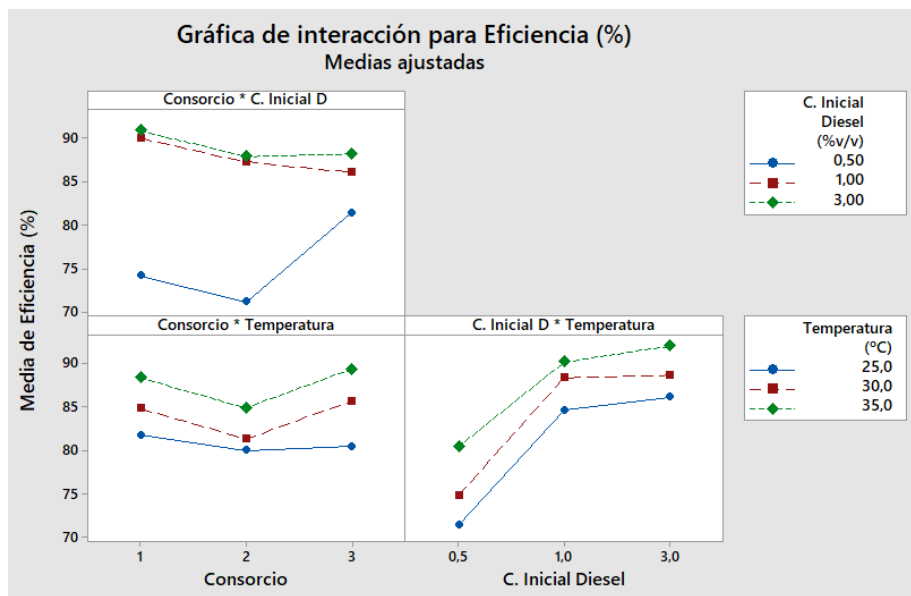


Figura 6.21. Gráfica de interacción para la Eficiencia.

6.2.5. Comprobación de Hipótesis

Los resultados obtenidos en el diseño factorial, mediante el Análisis de Varianza y graficado por el diagrama de Pareto, comprueban que las variables operacionales: tipo de consorcio, concentración inicial de diésel y temperatura gobiernan en el proceso de biodegradación de hidrocarburos, siendo estadísticamente significativas para cada una de las variables respuestas: Concentración de Biomasa, Concentración final de Sustrato y Eficiencia, confirmando así la hipótesis planteada en esta investigación.

6.3. Optimización del proceso de Biodegradación de hidrocarburos mediante la acción de consorcios.

El objetivo final del Método de Superficie Respuesta (RSM) es la optimización de las variables considerando los efectos interactivos de factores independientes. Con el objetivo de aumentar la biodegradación de hidrocarburos con consorcios y ajustándose a las necesidades del análisis, se aplicó un diseño con tres-niveles con un alfa de 1 y un bloque mayor de 27. Cabe mencionar, que este diseño también se escogió, debido que para los otros tipos de diseño como el Box Behnken y DCC, no se ajusta al diseño propuesto, como lo son las corridas deseadas para el análisis y que para un DCC todas las variables deben de ser con valores cuantitativos.

Aplicando el Programa Minitab 18 se generaron los mismos 27 tratamientos que se examinaron en la primera fase en un diseño factorial, los factores analizados fueron: El tipo de consorcio, la concentración inicial de diésel y temperatura, cada uno con 3 niveles y una sola corrida. En la primera fase la interacción de los tres factores (ABC) no tuvo un efecto significativo en los resultaos, por lo que en esta parte se descarta toda interacción entre ellos.

6.3.1. Optimización del proceso para variable respuesta de la Concentración de Biomasa mediante metodología de superficie respuesta.

De la matriz de superficie de respuesta que tiene como variable respuesta Concentración de Biomasa se obtuvo la tabla 6.11 ANOVA, en esta se muestra que todas las interacciones exceptuando la interacción BC son estadísticamente significativas dentro del modelo presentando una relación curva con la respuesta. Los valores mostrados por el coeficiente de determinación cuadrado (R^2) nos señaló que un 97.09% de variabilidad en la variable respuesta puede ser dilucido por el diseño propuesto; por lo tanto, el 2.91% no fue explicado por el diseño.

Tabla 6.11. Análisis de varianza del Diseño Superficie para concentración de biomasa.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Consorcio	2	7.0062	3.5031	44.32	0.000
B: C. Inicial Diésel	1	17.6616	17.6616	223.47	0.000
C: Temperatura	1	12.0089	12.0089	151.95	0.000
BB	1	2.9991	2.9991	37.94	0.000
CC	1	0.4249	0.4249	5.38	0.0035
BC	1	0.0603	0.0603	0.76	0.396
BA	2	2.2890	1.1445	14.48	0.000

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
AC	2	0.7900	0.3950	5	0.022
Error Total	15	1.1855	0.0790		
Total (corr.)	26	40.7576			
Resumen del modelo	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)	Error estándar del est.	R-Cuadrado (Pred)	
	97.09	94.96	0.281131	91.76%	

Dado a que se tiene una variable cualitativa como lo es el tipo de consorcio, se obtuvo una ecuación de regresión para cada consorcio con respecto a la variable concentración de biomasa. En la Tabla 6.12, se observa el modelo final para cada consorcio que simula correctamente la obtención de la concentración de biomasa según el diseño de superficie respuesta.

Tabla 6.12. Modelos de regresión cuadrática del diseño de superficie respuesta del comportamiento de variable C. Biomasa.

Tipo de consorcio	x_1 =Concentración inicial de diésel, x_2 =Temperatura, en unidades codificadas
Consorcio 1	$8.97 + 3.4466x_1 - 0.503x_2 - 0.748x_1^2 + 0.01064x_2^2 + 0.0107x_1x_2$
Consorcio 2	$9.49 + 2.954x_1 - 0.533x_2 - 0.748x_1^2 + 0.01064x_2^2 + 0.0107x_1x_2$
Consorcio 3	$7.24 + 2.849x_1 - 0.433x_2 - 0.748x_1^2 + 0.01064x_2^2 + 0.0107x_1x_2$

En el diagrama de Pareto de la Figura 6.22 se representan los efectos estandarizados con $p=0.05$ y se observa que los factores Concentración (B) y Temperatura (C) son los más significativos sobre la c. biomasa, corroborando los resultados del ANOVA. La longitud de las barras corresponde al valor absoluto de los efectos estandarizados.

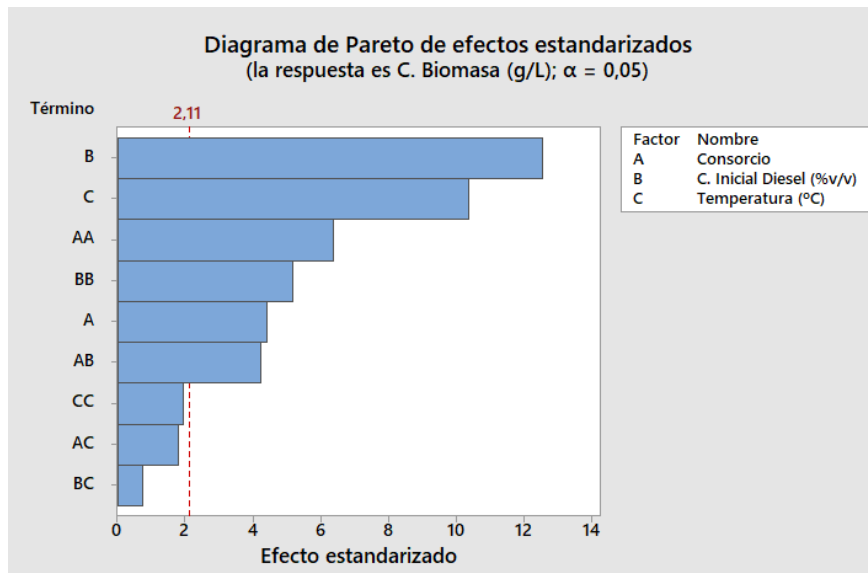


Figura 6.22. Diagrama de Pareto para RSM de Concentración Biomasa.

En la Figura 6.23, las gráficas de probabilidad normal e histograma muestran que los residuos presentan una distribución normal, donde la mitad toma valores positivos (>50%) y la otra mitad toma valores negativos (<50%). Sin embargo, el valor atípico es posible se haya generado debido al poco número de observaciones en el análisis.

La gráfica de Residuos vs Ajustes muestra que los residuos están distribuidos de forma aleatoria, lo cual aporta validez a los datos recolectados en la investigación y la gráfica Residuos vs Orden muestra que los residuos son independientes entre sí.

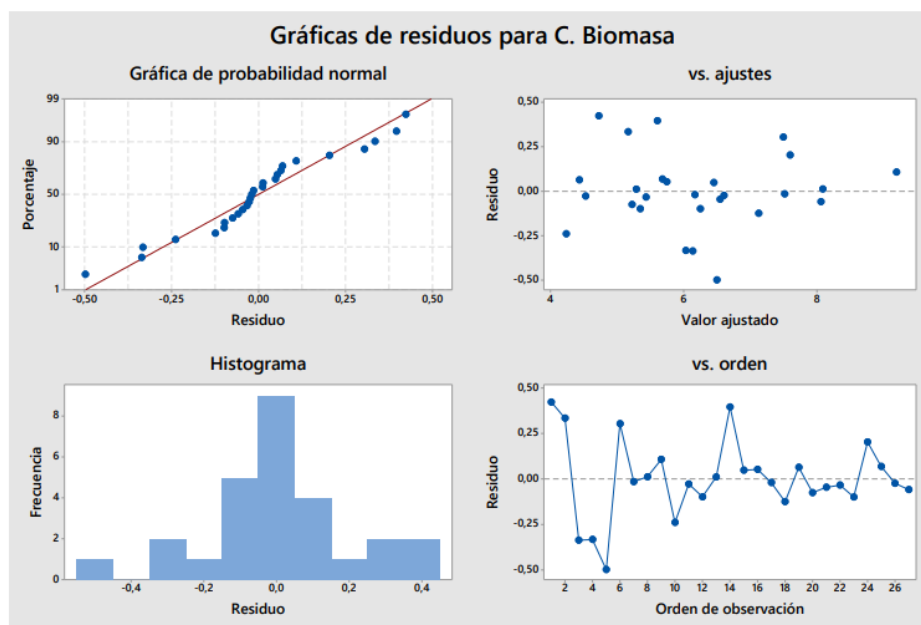


Figura 6.23. Gráficas de Residuos para C. Biomasa.

En la Figura 6.24 Se muestran las gráficas de superficie de respuesta para la variable respuesta Concentración Biomasa, para cada uno de los consorcios. Se puede observar que las superficies respuestas tienen forma de montaña, esto se debe a que la cima de esta representa el punto de la respuesta máxima de la variable C. Biomasa. En estas gráficas se muestra que la variable concentración inicial del sustrato tiene influencia menor sobre la concentración de biomasa con respecto a la notable influencia de la variable temperatura, obtenido para cada tipo de consorcio los valores más altos de concentración de biomasa entre un rango de 1.75 y 3 %v/v de concentración inicial del sustrato y una temperatura de 35°C.

Dicho lo anterior, los tres tipos de consorcio obtienen su máximo valor con las mismas condiciones, sin embargo, el consorcio 1, genera mayor concentración de biomasa, siendo este del 9.3%v/v.

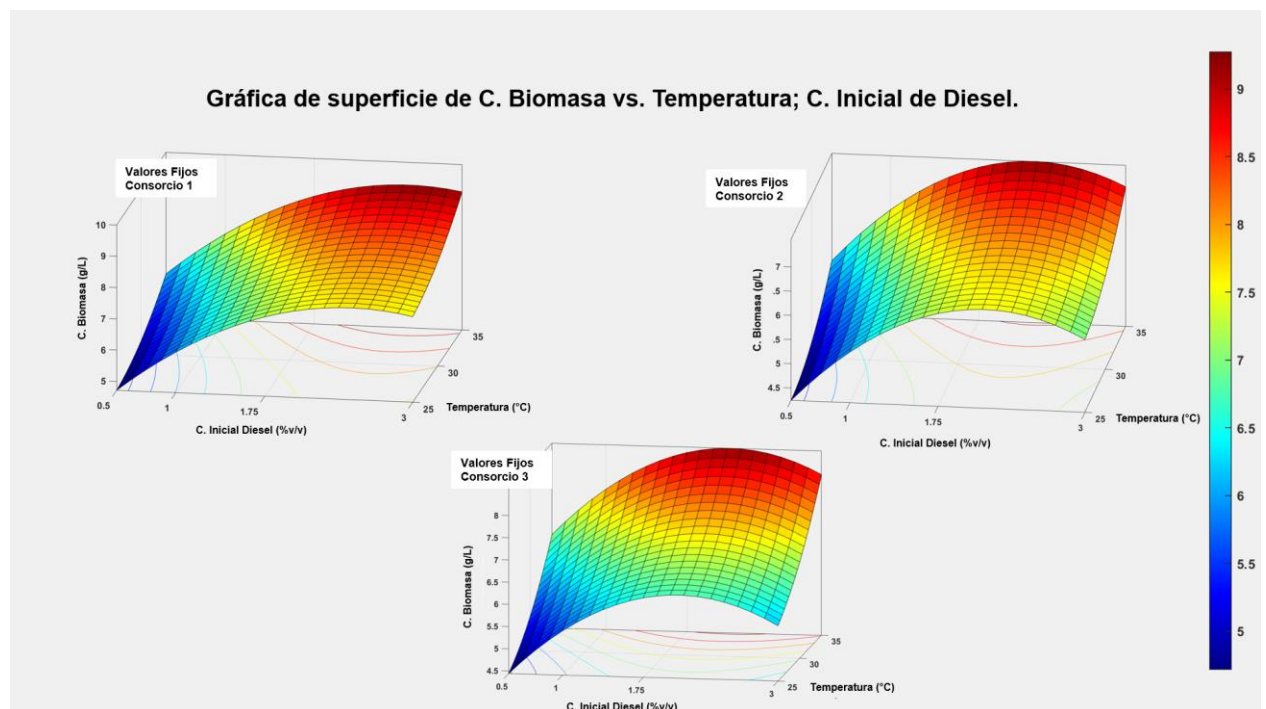


Figura 6.24. Gráfica de Superficie Respuesta para Concentración de Biomasa.

6.3.2. Optimización del proceso para variable respuesta de la Concentración final del sustrato (TPH) mediante metodología de superficie respuesta.

Los resultados del diseño de superficie respuesta el cual tiene como variable respuesta la concentración de biomasa se muestra en la tabla resumen 6.13, En este análisis de varianza se muestra que los tres factores principales y el cuadrático de concentración inicial de diésel(BB), son estadísticamente significativas sobre la C. final del sustrato, además el valor mostrado por el coeficiente de determinación cuadrado (R^2) nos señaló que un 90.93% de variabilidad en la variable respuesta puede ser dilucido por el diseño propuesto; por lo tanto, el 9.07% no fue explicado por el diseño.

Tabla 6.13. Análisis de varianza del Diseño Superficie Respuesta para la obtención de la concentración final del sustrato.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Consorcio	2	2.6167	1.3084	2.40	0.000
B: C. Inicial Diésel	1	50.3673	50.3673	92.43	0.000
C: Temperatura	1	11.5858	11.5858	21.26	0.000
BB	1	30.1696	30.1696	55.37	0.000
CC	1	0.0134	0.0134	0.02	0.878
BC	1	0.2263	0.2263	0.42	0.529
BA	2	2.9992	1.4996	2.75	0.096
AC	2	0.7554	0.3777	0.69	0.515
Error Total	15	8.1738	0.5449		
Total (corr.)	26	90.1659			
Resumen del modelo	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)	Error estándar del est.	R-Cuadrado (Pred)	
	90.93	84.29	0.738188	76.96	

En la Tabla 6.14, se observan las ecuaciones de segundo orden que al igual que con la variable C. Biomasa, se trabajó con cada consorcio (Tipo 1,2 y 3), esta simula correctamente la obtención de la concentración final del sustrato según el diseño de superficie respuesta.

Tabla 6.14. Modelos de regresión cuadrática del diseño de superficie respuesta del comportamiento de variable C. final de sustrato.

Tipo de consorcio	x_1 =Concentración inicial de diésel, x_2 =Temperatura, en unidades codificadas
Consorcio 1	$14.7 - 10.49x_1 - 0.083x_2 + 2.373x_1^2 - 0.0019x_2^2 + 0.0208x_1x_2$
Consorcio 2	$14.1 - 10.48x_1 - 0.040x_2 + 2.373x_1^2 - 0.0019x_2^2 + 0.0208x_1x_2$
Consorcio 3	$15.1 - 9.83x_1 - 0.040x_2 + 2.373x_1^2 - 0.0019x_2^2 + 0.0208x_1x_2$

En el diagrama de Pareto de la Figura 6.25, se representan los efectos estandarizados con $p=0.05$ y se observa que los factores Concentración inicial de diésel (B) y relación cuadrática de la misma (BB) son los más significativos en el proceso de minimización del sustrato final. La longitud de las barras corresponde al valor absoluto de los efectos estandarizados.

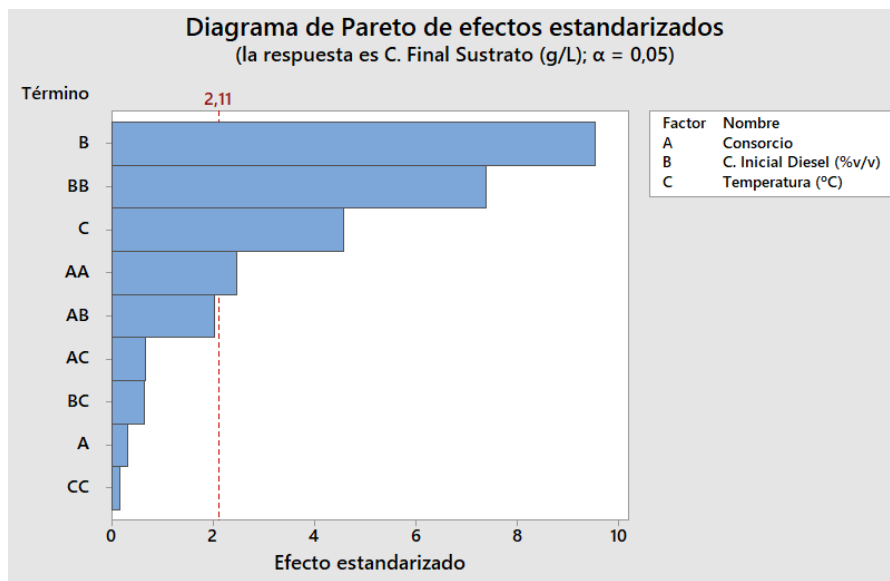


Figura 6.25. Diagrama de Pareto de Superficie Respuesta para C. final de sustrato.

En la Figura 6.26, las gráficas de probabilidad normal e histograma al igual que en el análisis de superficie de respuesta con la variable de concentración de biomasa, en este estudio se muestran que los residuos presentan una distribución normal. Así mismo, la gráfica de Residuos vs Ajustes muestra que los residuos están distribuidos de forma aleatoria, lo cual aporta validez a los datos recolectados en la investigación y la gráfica Residuos vs Orden muestra que los residuos son independientes entre las demás variables independientes.

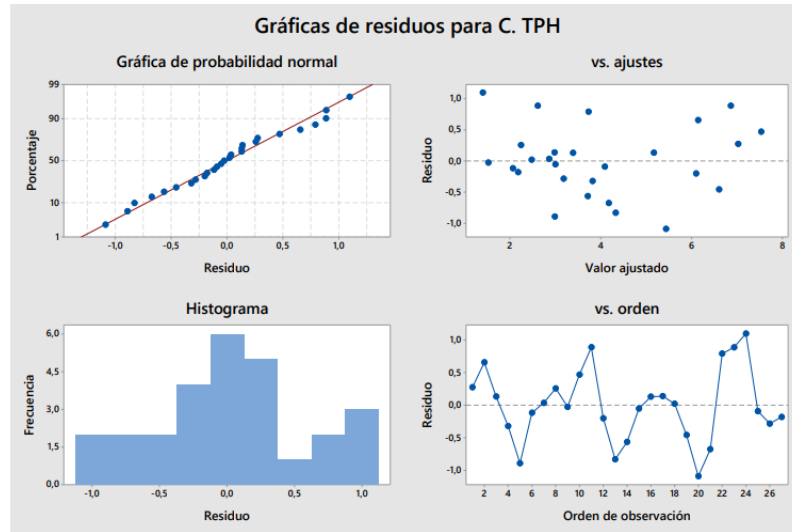


Figura 6.26. Gráfica de residuos para C. final sustrato.

En la Figura 6.27 Se muestran las gráficas de superficie de respuesta para la variable Concentración final de sustrato y para cada uno de los consorcios. En este caso, la forma de las superficies respuesta se representa como un valle, es decir, requiere de un valor mínimo para el verdadero óptimo de la variable respuesta, según las gráficas de superficie se observa que para cada tipo de consorcio se dan bajo las mismas condiciones entre un rango entre 1.75 y 3 %v/v de concentración inicial del diésel y una temperatura de 30 a 35°C. Sin embargo, entre los tres tipos de consorcio el que mejor arroja resultados para la disminución del sustrato final es el consorcio 1.

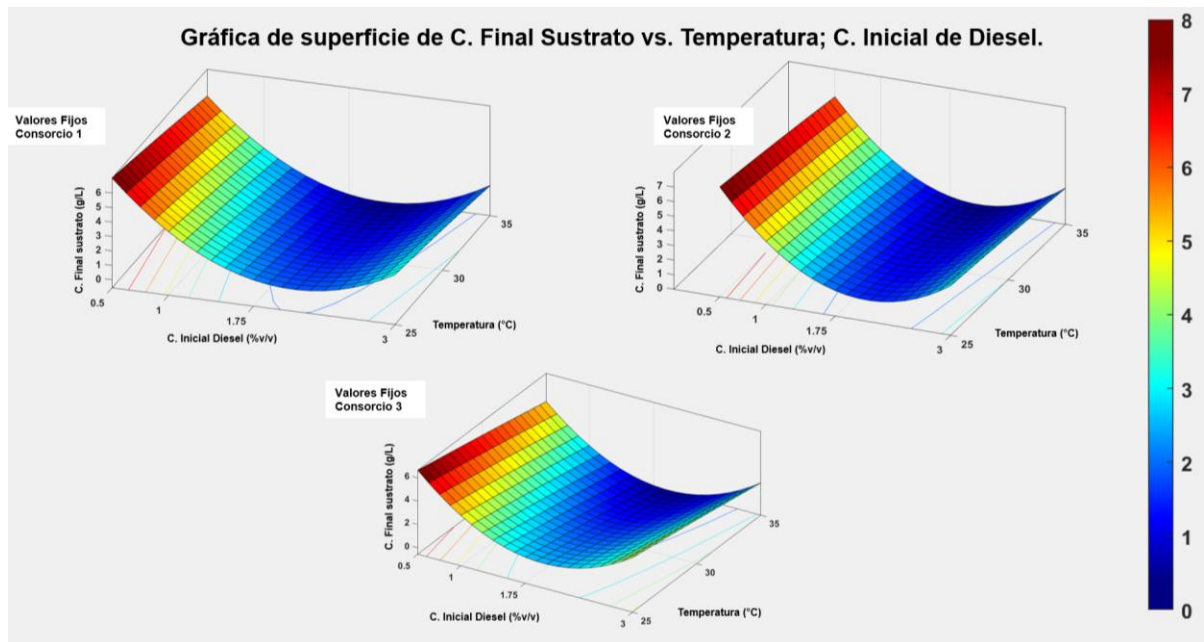


Figura 6.27. Gráfica de Superficie Respuesta para Concentración Final de Sustrato.

6.3.3. Optimización del proceso para variable respuesta de la Eficiencia mediante metodología de superficie respuesta.

La optimización de la Eficiencia en el proceso de biorremediación es donde se alcanza el máximo posible del rendimiento en función de las variables independientes (Consortio, concentración del sustrato inicial (Diésel) y temperatura) obteniendo el efecto que se desea, es decir, el máximo rendimiento del proceso de biodegradación de hidrocarburos, por tanto es de mucho interés el conocimiento de la influencia de los factores que lo conforman para esta variable respuesta Eficiencia, utilizando la metodología de superficie respuesta, el análisis de varianza se muestra en la tabla resumen 6.15.

En el análisis mostrado se observa que los factores Concentración inicial de diésel, temperatura y el cuadrático de Concentración de diésel son significativas para la concentración final del sustrato, y el coeficiente de determinación cuadrado (R^2) nos señaló que un 90.93% de variabilidad en la variable respuesta puede ser dilucido por el diseño propuesto; por lo tanto, el 9.07% no fue explicado.

Tabla 6.15. Análisis de varianza del Diseño Superficie Respuesta para la obtención de la Eficiencia.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Consortio	2	41.87	20.934	2.40	0.125
B: C. Inicial Diésel	1	805.88	805.88	92.43	0.000
C: Temperatura	1	185.37	185.37	21.26	0.000
BB	1	482.71	482.271	55.37	0.000
CC	1	0.21	0.21	0.02	0.878
BC	1	3.62	3.62	0.42	0.529
BA	2	47.99	23.993	23.993	0.096
AC	2	12.09	6.043	6.043	0.515
Error Total	15	130.78	8.719		
Total (corr.)	26	1442.65			
Resumen del modelo	R-cuadrado	R-cuadrado (ajustado)	Error estándar del est.	R-Cuadrado (Pred)	
	90.93	84.29	2.95275	76.96	

En la Tabla 6.16, se observan los modelos de regresión, los cuales son ecuaciones de segundo orden, mostrando curvatura en el diseño y que simula correctamente la eficiencia del proceso según el diseño de superficie respuesta.

Tabla 6.16. Modelos de regresión cuadrática del diseño de superficie respuesta del comportamiento de la Eficiencia.

Tipo de consorcio	x_1 =Concentración inicial de diésel, x_2 =Temperatura, en unidades codificadas
Consorcio 1	$41.3 + 41.96x_1 + 0.33x_2 - 9.49x_1^2 + 0.0076x_2^2 - 0.083x_1x_2$
Consorcio 2	$43.6 + 41.92x_1 + 0.16x_2 - 9.49x_1^2 + 0.0076x_2^2 - 0.083x_1x_2$
Consorcio 3	$38.6 + 39.32x_1 + 0.56x_2 - 9.49x_1^2 + 0.0076x_2^2 - 0.083x_1x_2$

En la Figura 6.28, el diagrama de Pareto, se representan los efectos estandarizados con $p=0.05$ y se observa que los factores Concentración inicial de diésel (B) y el cuadrático de este (BB) son los más significativos, es decir, existe una asociación entre estos efectos y la variable respuesta, como es en el caso para el análisis de C. final de sustrato, donde ambas tienen los mismos efectos significativos lo cual significa que las variables respuestas (Concentración Final del sustrato y Eficiencia) se relacionan entre sí. La longitud de las barras corresponde al valor absoluto de los efectos estandarizados, y guarda congruencia con los resultados del ANOVA.

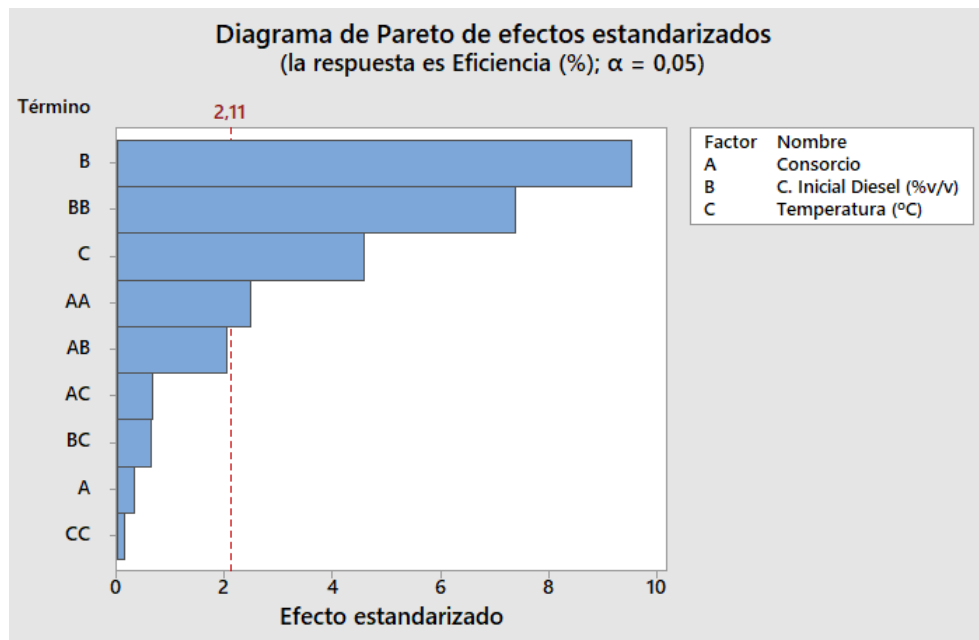


Figura 6.28. Diagrama de Pareto del Diseño de Superficie Respuesta para Eficiencia.

En las gráficas de probabilidad normal e histograma muestran que los residuos presentan una distribución normal, así como los resultados de las variables dependientes antes estudiadas. De igual forma, en la gráfica de Residuos vs Ajustes muestra que los residuos están distribuidos de forma aleatoria, lo cual aporta validez a los datos recolectados en la investigación y la gráfica Residuos vs Orden muestra que los residuos son independientes entre sí.

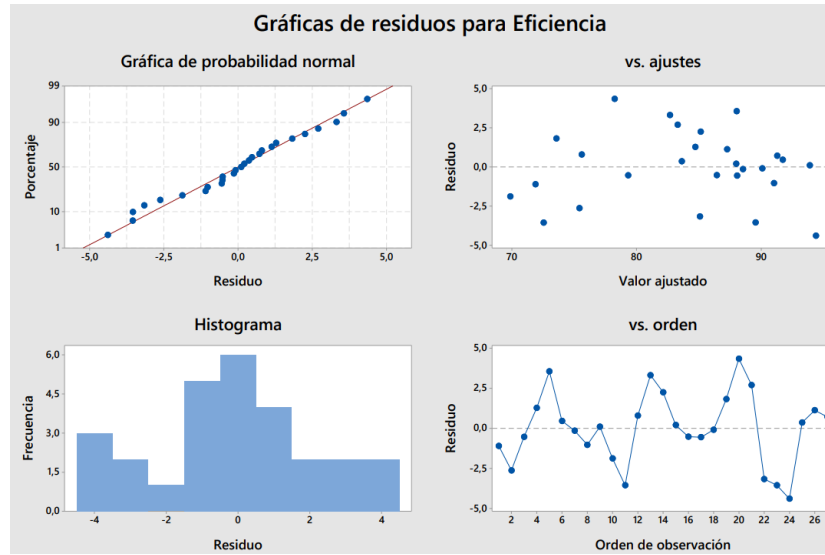


Figura 6.29. Gráfica de Residuos para Eficiencia.

En la figura 6.30 se muestran las gráficas de superficie de respuesta para la eficiencia para cada uno de los consorcios. Se puede observar que la variable concentración inicial del sustrato tiene influencia menor sobre la Eficiencia con respecto a la notable influencia de la variable temperatura, obtenido para cada tipo de consorcio los valores más altos de Eficiencia entre un rango entre 1.75 y 3 %v/v de concentración inicial del sustrato y una temperatura de 35°C.

Dicho lo anterior, los tres tipos de consorcio obtienen su máximo valor bajo las mismas condiciones, sin embargo, el consorcio 1, genera mayor eficiencia en el proceso, siendo este del 93.8%.

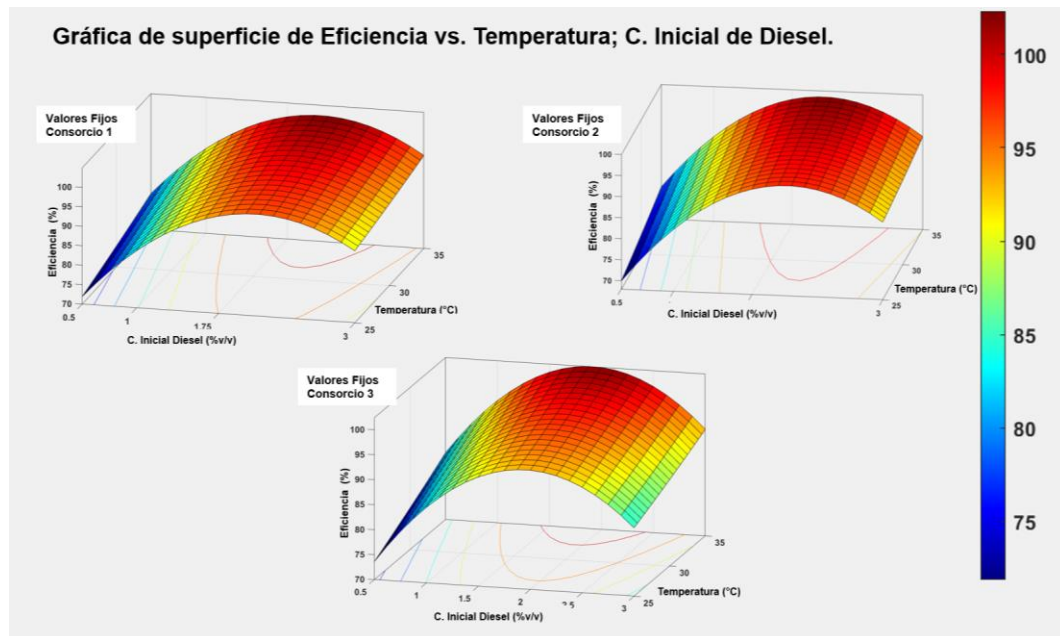


Figura 6.30. Gráfica de superficie De Eficiencia.

6.3.4. Resultados de la optimización del Procesos de biodegradación de hidrocarburos mediante la acción de consorcios.

Los resultados de la optimización del proceso de biodegradación sobre las Variables Respuestas (Concentración Biomasa, Concentración final de sustrato y Eficiencia), los cuales maximizan y minimizan el porcentaje de aceptabilidad general del proceso, se presentan en la Figura 6.31.

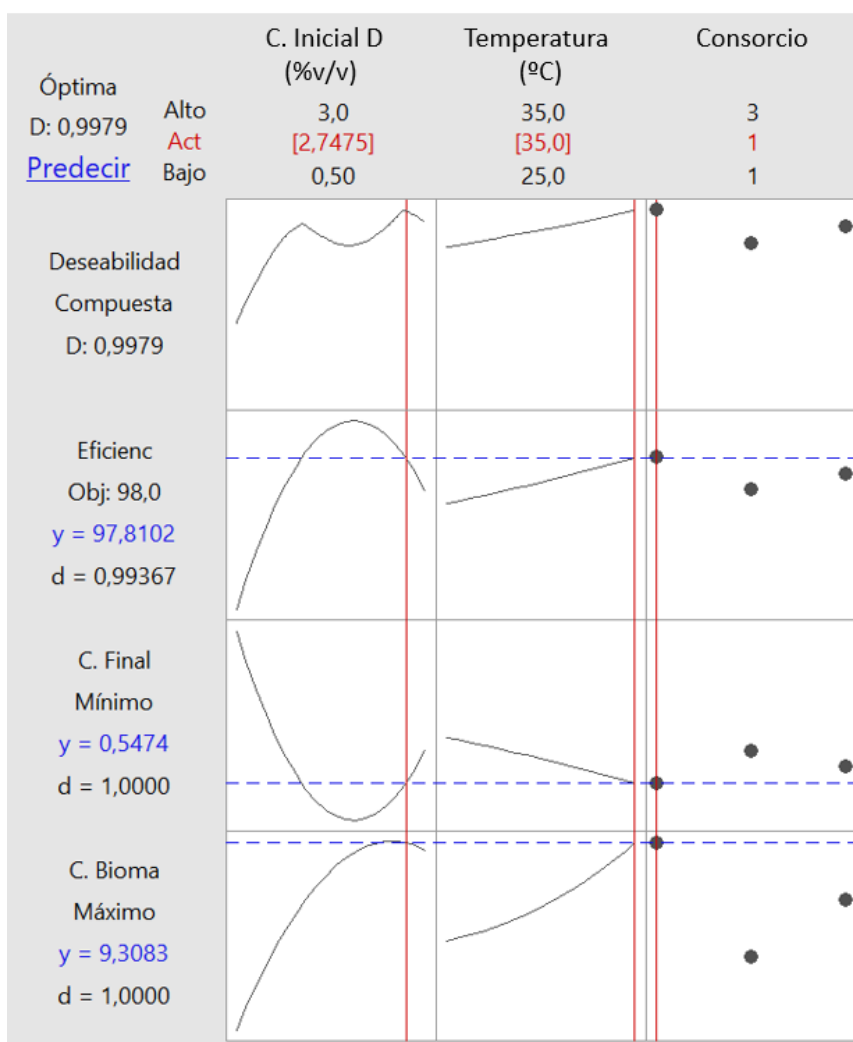


Figura 6.31. Gráfica de optimización del proceso de biodegradación.

Para los datos sobre el proceso, la deseabilidad compuesta para determinar la configuración óptima de las variables es de 0,9979. Las columnas de la gráfica muestran los valores de respuesta en cada nivel de los factores, concentración final del sustrato y temperatura siendo estos valores cuantitativos y la última siendo el tipo de consorcio de forma categórica o cualitativa. La configuración actual para la optimización del proceso es, Concentración inicial de Diésel = 2.75%v/v, Temperatura =35°C y Consortio = 1. La meta en este diseño era

maximizar la eficiencia del proceso aumentando la concentración de la biomasa y disminuyendo la Concentración final del sustrato (hidrocarburos). El valor pronóstico para cada una es, para Concentración de Biomasa es de 9.3083 y su deseabilidad de 1, Concentración final de sustrato es de 0.5474 con un valor de = 1y para la eficiencia un pronóstico del 97.81% del rendimiento con una deseabilidad del 0.9937.

Para el tipo de consorcio óptimo para aumentar la eficiencia del proceso de biodegradación se da en el consorcio tipo 1, dado que este consorcio tiene mayor presencia microbiana de *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. Estas características explican la preeminencia en el proceso de biodegradación del diésel in vitro del Consorcio 1 con relación al Consorcio 2 y 3.

Pérez, 2018. Evaluación de la Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Pseudomonas Fluorescens*. Realizó estudios que confirman que los consorcios que contienen *Pseudomonas Fluorecens* y crecen en presencia de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs), producen sustancias tenso activas (exudados producidos en el proceso metabólico entre la bacteria y el hidrocarburo), que son capaces de solubilizar compuestos no polares como los TPHs, además estas sustancias tienen la propiedad de acelerar el crecimiento bacteriano mejorando la actividad enzimática tanto de peroxidasas y oxigenasas que permitirán la oxidación de fracciones tóxicas del hidrocarburo, logrando así una mayor eficacia en el proceso de biorremediación.

Así mismo, el proceso es más eficiente a una Concentración Inicial de diésel de 2.75%v/v, como lo muestran estudios realizados por (Cambarieri, Pucci, & Acuña, 2021) que utilizan suelos contaminados en valores cercanos a 3%v/v de hidrocarburos para la biorremediación de este. Además, a una temperatura de 35°C, los consorcios conformados por *Pseudomonas Fluorecens* y *Sphingomonas* aumentan su velocidad de degradación a temperaturas entre 20°C y 40°C. Para climas tropicales como Nicaragua, la temperatura óptima para la actividad microbiana, disminuye a un rango de 30°C a 35°C (Gómez S. , et al., 2008).

VII. CONCLUSIONES

1.- Para predecir el crecimiento microbiano de cada consorcio, los modelos cinéticos propuestos por Teissier, Monod y Haldane. Se seleccionó, el modelo cinético propuesto por Teissier, dado que este presenta el mejor ajuste del valor error cuadrático medio (RMSE) para cada tipo de consorcio bacteriano en estudio (Consortio 1, Consortio 2 y Consortio 3), obteniéndose los siguientes resultados correspondientemente para la concentración de biomasa bacteriana ($RMSC_x$): 0.040, 0.081 y 0.017. En tanto para la concentración del sustrato compuesto por Diésel, los resultados para ($RMSC_s$) fueron: 0.104, 0.212 y 0.456.

2.- Se aplicó un diseño factorial completo 3^3 , el cual permitió identificar los factores de influencia significativa en el proceso de biodegradación de hidrocarburos usando consorcios nativos, haciendo uso del Análisis de Varianza (ANOVA) en combinación con el Diagrama de Pareto, estableciéndose que las variables tipo consorcio y concentración inicial de hidrocarburos son estadísticamente significativas para las variable respuestas estudiadas : Concentración de biomasa, concentración de hidrocarburos y eficiencia de remoción de hidrocarburos en solución acuosa. Sin embargo, la variable que ejerce mayor influencia en el proceso de biodegradación es la concentración inicial de hidrocarburos (TPH).

3.- Durante la aplicación del Método de Optimización con superficie de respuesta, se descartó la interacción triple de las variables independientes (ABC), dado que estadísticamente son no-significativas. Por otra parte, este mismo método mostró que la mayor parte de las variables y sus interacciones, son significativas, destacando siempre la variable Concentración inicial de diésel, seguida de la variable temperatura, sobre cada variable respuesta estudiada: Concentración de biomasa, concentración de hidrocarburos y eficiencia de remoción de hidrocarburos.

4.- Se determinó con el Método de Superficie de Respuesta usando un diseño de 3^3 , con 27 muestras y un nivel de deseabilidad de 0.9979, que los valores óptimos del proceso de biodegradación son : Concentración inicial de sustrato de 2.75%v/v, Temperatura de 35°C y Consortio Tipo 1, maximizando la eficiencia del proceso, manifestado en cada una de las variables respuestas obteniéndose los siguiente : Concentración de Biomasa = 9.31 gcélulas/L, Concentración final del hidrocarburo = 0.5474 g/L y Eficiencia de remoción del hidrocarburo = 97.81 %.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar los estudios en un intervalo de duración no mayor a las 60 horas de estudio, dado que en este intervalo de tiempo ocurre con mayor velocidad la remoción del hidrocarburo observándose un 81%. Este límite del intervalo de tiempo, coincide con la finalización del periodo de crecimiento exponencial y el inicio de la etapa estacionaria, la cual tiene una duración aproximada del 66% del tiempo de duración de este estudio y en la cual se remueve solo un 16% del contaminante hidrocarbonado.
2. Se recomienda, en el caso que se pretenda continuar el proceso de biodegradación in vitro, reinocular entonces cada 60 horas con la solución conteniendo el consorcio en estudio para obtener una eficiencia mayor en menor tiempo de tratamiento.
3. Dado que las determinaciones de las concentraciones de hidrocarburos no se realizan en el país y tienen un precio considerablemente elevado debido al uso de tecnología de punta, se recomienda estudiar la posibilidad de la aplicación de métodos gravimétricos para la determinación de hidrocarburos en solución acuosa evaluando su precisión y los umbrales mínimos de concentración inicial de hidrocarburos para su validación y adopción como tecnología.
4. Se recomienda realizar ensayos en microcosmos con la presencia de suelos contaminados por hidrocarburos procedentes de los emplazamientos afectados por los derrames y vertidos de hidrocarburos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abasolo, F., & Morante, L. (2019). *Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos*. Quevedo: Colloquium.
- Abdulrasheed, M., Zulkharnain, A., Zakaria, N., Roslee, A., Abdul Khalil, K., Napis, S., . . . Ahmad, S. (2020). Response Surface Methodology Optimization and Kinetics of Diésel Degradation by a Cold-Adapted Antarctic Bacterium, *Arthrobacter* sp. Strain AQ5-05. *Sustainability*(12, 6966). doi:<https://doi.org/10.3390/su12176966>
- Acuña, A., Tonín, N., Díaz, V., Pucci, G., & Pucci, O. (2012). Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 3(1).
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and biorremediation*. San Diego: Academic Press.
- Alvarez, S. (2020). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos empleando consorcios de microorganismos nativos*. Managua, Nicaragua.
- Amellal, N., Portal, J., & Berthelin, J. (2001). Effect of soil on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of contaminated soil. *Applied Geochemistry*, 16, 1611-1619.
- Armijo, J. (2004). Análisis de Regresión no lineal: Técnicas para determinar parámetros. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.*, 7(1), 63-68.
- Atkinson, B. (1974). Biochemical reactors. *Pion Limited*, 267.
- Atlas, R. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1), 180-209.
- Atlas, R. (1995). Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine pollution bulletin*, 31, 178-182.
- Banco Central de Nicaragua. (2020). *Anuario de estadísticas macroeconómicas*. Managua, Nicaragua.
- Barkay, T., Hines, M., Bonzongo, J., Scott, K., Kringelum, P., Lyons, W., . . . Faganelli, J. (1999). Molecular analysis of mercury contaminated aquatic ecosystem. *Annual meeting American society for microbiology*.
- Bronick, C., & Lal, R. (2005). Soil structure and mangment. *Geoderma*, 124, 3-22.
- Cambarieri, L., Pucci, G., & Acuña, A. (2021). Optimización de un proceso de bioestimulación en un suelo de Río Gallegos, Argentina, para su utilización en biorremediación de hidrocarburos. *ecosistema.*, 30(1). doi:<https://doi.org/10.7818/ECOS.2084>
- Carrasco, C. (2005). Optimización de una formulación con tres diluentes aglutinantes para (ROSOLV HD90. EMEDEX Y COMPRESS) para compresión directa aplicando un diseño simplex centroide.
- Chapra, S., & Canale, R. (2007). *Métodos numéricos para ingenieros*. México: McGraw-Hill.
- Cooney, J., Silver, S., & Beck, E. (1985). Factor sin-fluencing hydrocarbons degradation in three freshwa-terlakes. *Microbial Ecology*, 127-237.
- Delille, D., Pelletier, E., & Coulon, F. (2007). The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a Diésel fuel contaminated asuAntartic soil. *Cold regions Science and Thecnology*, 48, 74-83.

- Demeter, M., Lemire, J., Mercer, S., & Turner, R. (2017). Screening selectively harnessed environmental microbial communities for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in moving bed biofilm reactors. *Bioresour. Technol*(228), 116-124.
- Dibble, J., & Bartha, R. (1979). Effect of environmental parameter on the biodegradation of oil sludges. *Applied and Environmental microbiology*, 37, 729-739.
- Duarte, A. (1995). Introducción a la ingeniería bioquímica. 355.
- Edwards, S., & Kjellerup, B. (2013). Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Biotechnol*, 9909-9921.
- Esener, A., Roels, J., & Kossen, N. (1983). *Theory and applications of unstructured growth models: Kinetic and energetic aspects*. (Vol. 25). Biotechnology and Bioengineering.
- Eweis, J. (1999). *Principios de biorrecuperación : tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos*. Madrid : McGrawHill, D.L.
- Fredrickson, A., Megee, R., & Tsuchiya, H. (1970). *Mathematical Models for Fermentation Processes* (Vol. 13). Anonymous Advances in Applied Microbiology.
- Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., & Mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA*(9), 76-104.
- Gómez, G., & Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 17-24.
- Gómez, S., Gutiérrez, D., Hernández, A., Hernández, C., Losada, M., & Mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS* -, 6(9), 76-84.
- Gómez, W., Gaviria, J., & Cardona, S. (2009). Evaluación de la biostimulación frente a la atenuación natural y la biotaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-Diésel. *Dyna*(160), 83-93.
- Greenpeace. (s.f.). *Efectos del petróleo sobre la salud*. Madrid: San Bernardo.
- Guerrero, A., Mendoza, J., Guerrero, J., Vásquez, C., & Rodríguez, R. (2021). Simulación de la cinética de fermentación etanólica tipo lote alimentado utilizando el método Runge Kutta. *Revista de investigación científica y tecnológica*., 3. doi:<https://doi.org/10.47422/ac.v2i3.40>
- Gupta, G., Kumar, V., & Pal, A. (2017). Microbial Degradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Emphasis on Pyrene. *Polycycl. Aromat.*, 1-13.
- Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México: McGraw-Hill.

- Hussain, K., Ismail, F., & Senu, N. (2016). Solving directly special fourth-order ordinary differential equations using Runge-Kutta type method. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 306, 179–199. <https://doi.org/10.1016/j.cam.2016.04.002>.
- Infante, C. (1998). Biorremediación de derrames de hidrocarburos en ambientes naturales. Memorias del IV Congreso Interamericano sobre el Medio Ambiente. (R. Castellano, Ed.) *Colección Simposio, II*, 325-328.
- Kamukai-Nakamura, S., Sugiura, K., Yamauchi-Inomata, Y., Toki, H., Venkateswaran, K., Yamamoto, S., . . . Harayama, S. (1996). Construction of bacterial that degrade arabian light crude oil. *Journal of fermentation and bioengineering*, 82.
- Leahy, J., & Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hidrocarbouns in the environment. *Microbiological Reviews*, 54, 305-315.
- Leys, N. M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E., & Springael, D. (2004). Ocurrance and phylogenetic diversity of sphingomonas strains in soils contaminated with polycuclic aromatic hidrocarbouns. *Applied and enviromental microbiology*(70), 1944-1955.
- Lozano, N. (2005). Biorremediación de ambientes contaminados con petróleo. *Tecnogestión*, 11(1). Obtenido de <https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/tecges/article/view/4326/6317>
- Madiga, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Biología de los microorganismos*. Madrid, España: Pearson Educación S.A.
- Madigan , M., Martinko, J., & Parker, J. (1999). Brock biología de los microorganismos. (P. H. Ed., Ed.) 149-177.
- McGill, W., Rowell, M., & Westlake, B. (1981). Biochemestry ecology and microbiology of petroleum components soil. *En Soil Biochemestry*, 5, 229-296.
- Ministerio de Energía y Minas. (2020). *Anuario estadístico de hidrocarburos*. Managua, Nicaragua. Obtenido de <http://www.mem.gob.ni/wp-content/uploads/2021/03/Anuario-Estadistico-2019-sin-USGC.pdf>
- Minitab18. (2018). *Diseño de un experimento*. Obtenido de Soporte de Minitab: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/getting-started/designing-an-experiment/>
- Momo, F., & Capurro, A. (2006). *Ecología matemática: Principios y aplicaciones*. Ediciones cooperativas.
- Montgomery, D. (2005). *Diseño y Análisis de experimentos*. México: LIMUSA Wiley.
- Novales, A. (2013). Estimación de modelos no lineales.
- Ortega, J., & Jiménez, C. (1998). Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a Pseudomonas fluorescens strain isolated from soil. *Appl Environ Microbiol.*, 64:3123–3126.
- Ortiz, E., Núñez., R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., . . . Borges, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *a Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente*(6), 51-160. doi:<http://hdl.handle.net/1834/3650>.

- Oviedo, J. M. (2014). Sistemas de Ecuaciones Diferenciales-Resolución por medio de Maple, Matemática, Gauss, Matlab y Macros en Excel.
- Pastor, A., & Gonzales, M. (2004). *Guía sobre suelos contaminados*. España: Departamento de economía, hacienda y empleos de España.
- Patel, V., Patel, J., & Madamwar, D. (2012). Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *Bioresour. Technol.*, *107*, 122-130.
- Patel, V., Patel, J., & Madamwar, D. (2013). Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard. *Mar. Pollut. Bull.*, *74*(1), 199-207.
- Pérez, M. (2018). *Evaluación de la Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando Pseudomonas Fluorescens*. [Tesis de Pregrado]. Quito: Universidad Politécnica Salesiana .
- Pisfil, Y. (2019). *Remediación de suelos contaminados en operaciones de perforación en nor-oeste y selva*. [Tesis de Pregrado]. Piura, Perú: Universidad Nacional de Piura.
- Prescott, L., Harley, J., & Klein D. (1999). *Microbiología*. (Interamericana, Ed.) McGraw-Hill.
- Prince, R., Varadaraj, R., Fiocco, R., & Lessard, R. (1999). Bioremediation as an oil spill response tool. *Environmental Technology* . , 20:891-896. .
- Ravanipour, M., Rezaei, R., Mohseni-Bandpi, A., Esrafil, A., Farzadkia, M., & Hashemi-Najafabadi, S. (2015). Experimental design approach to the optimization of PAHs bioremediation from artificially contaminated soil: application of variables screening development. *Environmental Health Science and Engineering*, *13*:22. doi:DOI 10.1186/s40201-015-0178-y
- Riffaldi, R. (2005). Soil biological activities in monitoring the bioremediation of Diésel oil contaminated soil. *Water, air and soil pollution*, *170*, 3-15.
- Rivera, M., Sandoval, C., Guzmán, J., & Avila, M. y. (2003). *Utilización de hongos resistentes a cromato para la eliminacion de cromo hexavalente en tierra de desechos industriales*. . Instituto de Investigaciones Científicas Universidad de Guanajuato, México.
- Rodríguez, J., & Sánchez, J. (2004). *Biorremediacion. Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del PRestige*. Universidad de Oviedo.
- Ron, E., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current opinion in Biotechnology*, *13*, 249-252.
- Santos, V. (1993). *Producción de Xantano* [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid.
- Sepúlveda, T., & Velasco, J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México: INE-SEMARNAT.
- Singh, H. (2006). *Mycoremediation: Fungal bioremediation*. (ISBN- 13: 978-0-471-75501-2).
- Sundar, S., & Mohan, H. (2018). Process optimization of butachlor bioremediation by *Enterobacter cloacae* using Plackett Burman design and response surface methodology. *Process Safety and Environment Protection*, India. doi:<https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.08.009>

- Thomsen, I. (1999). Turnover of organic matter differently textured soils II. Microbial activity as influenced by soil water regimes. *Geoderma*.
- Torrez, C. (2017). Derrame de hidrocarburos, un riesgo siempre latente en Nicaragua. *La Prensa*. Obtenido de <https://www.laprensa.com.ni/2017/10/14/nacionales/2314115-derrames-hidrocarburos-riesgo-siempre-latente-nicaragua#:~:text=Los%20derrames%20de%20hidrocarburos%20es,ese%20riesgo%20es%20de%20166%2C803>.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. *Ed. Médica Paramericana*.
- Van Deuren, J., Wang, Z., & Ledbetter, J. (1997). Remediation technologies screening matrix and reference guide. *III*. Obtenido de <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Yuste, L., Corbellá, M., Turiégano, M., Karlson, U., Puyet, A., & Rojo, F. (2000). Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS microbiology*(32), 69-75.
- Zubizarreta, A., Martínez, J., Rivas, P., Gómez, S., & Sanz, A. (2018). Revisión de la literatura sobre efectos nocivos de la exposición laboral a hidrocarburos en trabajadores en ambiente externo. *Medicina y Seguridad del trabajo*, 64(252).

ANEXOS

ANEXO I: Datos experimentales de Concentración de Biomasa y Concentración de Hidrocarburos.

Tabla A.1. Datos Experimentales de Concentración de Biomasa e hidrocarburos para el Consorcio 1.

Tiempo Horas	Concentración de Biomasa X_{expi} , (g/L)	Concentración Hidrocarburos C_{expi} , (g/L)	Vel. (Cx/t)	Vel. (Cs/t)	% Remoción
0	0.10	25.00	0.00	0.00	0
10	0.25	24.38	0.02	-0.06	2.48
20	0.83	22.15	0.06	-0.22	11.4
30	0.83	20.83	0.00	-0.13	16.68
40	1.67	14.58	0.08	-0.63	41.68
50	3.13	7.29	0.15	-0.73	70.84
60	6.25	5.00	0.31	-0.23	80
70	7.71	5.00	0.15	0.00	80
80	7.71	3.00	0.00	-0.20	88
90	8.13	2.50	0.04	-0.05	90
100	8.96	1.88	0.08	-0.06	92.48
110	9.38	1.67	0.04	-0.02	93.32
120	9.38	0.83	0.00	-0.08	96.68
130	9.58	0.63	0.02	-0.02	97.48
140	9.58	0.63	0.00	0.00	97.48
150	9.58	0.63	0.00	0.00	97.48

Tabla A.2. Datos Experimentales de Concentración de Biomasa e hidrocarburos para el Consorcio 2.

Tiempo Horas	Concentración de Biomasa X_{expi} , (g/L)	Concentración Hidrocarburos C_{expi} , (g/L)	Vel. (Cx/t)	Vel. (Cs/t)	% Remoción
0	0.10	25.00	0.000	0.000	0
10	0.83	24.40	0.073	-0.060	2.4
20	1.67	22.00	0.084	-0.240	12
30	3.13	15.45	0.146	-0.655	38.2
40	7.15	7.15	0.402	-0.830	71.4
50	8.50	4.75	0.135	-0.240	81
60	9.00	4.50	0.050	-0.025	82
70	9.60	4.25	0.060	-0.025	83
80	9.61	3.75	0.001	-0.050	85
90	9.62	3.00	0.001	-0.075	88
100	9.63	2.95	0.001	-0.005	88.2
110	9.63	2.50	0.000	-0.045	90
120	9.64	2.25	0.001	-0.025	91
130	9.65	2.00	0.001	-0.025	92
140	9.67	1.83	0.002	-0.017	92.68
150	9.70	1.00	0.003	-0.083	96
160	9.71	0.85	0.001	-0.015	96.6
170	9.72	0.65	0.001	-0.020	97.4
180	9.73	0.65	0.001	0.000	97.4

Tabla A.3. Datos Experimentales de Concentración de Biomasa e hidrocarburos para el Consorcio 3.

Tiempo Horas	Concentración de Biomasa X_{expi} , (g/L)	Concentración Hidrocarburos C_{expi} , (g/L)	Vel. (Cx/t)	Vel. (Cs/t)	% Remoción
0	0.10	25.00	0.000	0.000	0
10	0.75	23.50	0.065	-0.150	6
20	2.25	22.85	0.150	-0.065	8.6
30	4.50	17.50	0.225	-0.535	30
40	8.15	8.27	0.365	-0.923	66.92
50	9.00	5.25	0.085	-0.302	79
60	9.00	4.75	0.000	-0.050	81
70	9.50	4.55	0.050	-0.020	81.8
80	9.55	4.25	0.005	-0.030	83
90	9.60	3.50	0.005	-0.075	86
100	9.65	3.15	0.005	-0.035	87.4
110	9.66	2.75	0.001	-0.040	89
120	9.67	2.50	0.001	-0.025	90
130	9.67	2.25	0.000	-0.025	91
140	9.70	2.10	0.003	-0.015	91.6
150	9.70	1.55	0.000	-0.055	93.8
160	9.71	1.25	0.001	-0.030	95
170	9.72	0.75	0.001	-0.050	97
180	9.73	0.68	0.001	-0.007	97.28

Tabla A.4. Tabla de resultados con los parámetros cinéticos para el Consorcio 1.

Consorcio 1								
	Experimental		Teisseir		Monod		Haldane	
T	Cx	Cs	Cx	Cs	Cx	Cs	Cx	Cs
0	0.1000	25.000	0.1000	25.0000	0.1000	25.0000	0.1000	25.0000
3	0.1450	24.814	0.1245	24.9370	0.1263	24.9286	0.1269	24.9297
6	0.1900	24.628	0.1550	24.8587	0.1594	24.8384	0.1610	24.8405
9	0.2350	24.442	0.1929	24.7611	0.2013	24.7245	0.2043	24.7274
12	0.3660	23.934	0.2402	24.6396	0.2541	24.5809	0.2592	24.5841
15	0.5400	23.265	0.2990	24.4884	0.3207	24.3997	0.3286	24.4026
18	0.7140	22.596	0.3722	24.3001	0.4048	24.1711	0.4166	24.1728
21	0.8300	22.018	0.4634	24.0657	0.5107	23.8830	0.5278	23.8822
24	0.8300	21.622	0.5769	23.7740	0.6442	23.5199	0.6683	23.5151
27	0.8300	21.226	0.7181	23.4108	0.8123	23.0628	0.8455	23.0519
30	0.8300	20.830	0.8940	22.9586	1.0238	22.4877	1.0687	22.4687
33	1.0820	18.955	1.1130	22.3957	1.2895	21.7650	1.3492	21.7359
36	1.3340	17.0800	1.3855	21.6950	1.6229	20.8585	1.7005	20.8179
39	1.5860	15.2050	1.7248	20.8227	2.0401	19.7240	2.1388	19.6725
42	1.9620	13.1220	2.1472	19.7368	2.5605	18.3088	2.6829	18.2508
45	2.4000	10.9350	2.6729	18.3851	3.2065	16.5520	3.3534	16.4987
48	2.8380	8.7480	3.3273	16.7028	4.0022	14.3881	4.1715	14.3612
51	3.4420	7.0610	4.1414	14.6096	4.9693	11.7580	5.1544	11.7930
54	4.3780	6.3740	5.1530	12.0088	6.1150	8.6423	6.3050	8.7863
57	5.3140	5.6870	6.4023	8.7971	7.3940	5.1640	7.5827	5.4477
60	6.2500	5.0000	7.8871	4.9795	8.5856	1.9234	8.8095	2.2420
63	6.6880	5.0000	9.2482	1.4803	9.1211	0.4670	9.4822	0.4844
66	7.1260	5.0000	9.6074	0.5568	9.1238	0.4598	9.4713	0.5128
69	7.5640	5.0000	9.6826	0.3634	9.1255	0.4550	9.4653	0.5286
72	7.7100	4.6000	9.7255	0.2531	9.1267	0.4519	9.4623	0.5364
75	7.7100	4.0000	9.7541	0.1795	9.1275	0.4498	9.4609	0.5400
78	7.7100	3.4000	9.7743	0.1277	9.1280	0.4483	9.4603	0.5416
81	7.7520	2.9500	9.7888	0.0904	9.1284	0.4474	9.4600	0.5424
84	7.8780	2.8000	9.7992	0.0636	9.1286	0.4467	9.4599	0.5427
87	8.0040	2.6500	9.8066	0.0445	9.1288	0.4462	9.4598	0.5428
90	8.1300	2.5000	9.8119	0.0310	9.1289	0.4459	9.4598	0.5429
93	8.3790	2.3140	9.8156	0.0215	9.1290	0.4457	9.4598	0.5429
96	8.6280	2.1280	9.8182	0.0148	9.1290	0.4455	9.4598	0.5429

Tabla A.5. Tabla de resultados con los parámetros cinéticos para el Consorcio 2.

Consorcio 2								
	Experimental		Teisseir		Monod		Haldane	
T	Cx	Cs	Cx	Cs	Cx	Cs	Cx	Cs
0	0.100	25.000	0.1000	25.0000	0.1000	25	0.1	25
3	0.319	24.820	0.1387	24.8985	0.1393	24.9021	0.134882	24.9127
6	0.538	24.640	0.1925	24.7577	0.1940	24.7659	0.181984	24.7949
9	0.757	24.460	0.2670	24.5624	0.2701	24.5764	0.245628	24.6357
12	0.998	23.920	0.3705	24.2914	0.3759	24.3129	0.331703	24.4203
15	1.250	23.200	0.5139	23.9155	0.5229	23.9468	0.448254	24.1287
18	1.502	22.480	0.7130	23.3940	0.7268	23.4388	0.60633	23.7332
21	1.816	21.345	0.9891	22.6706	1.0092	22.7355	0.821191	23.1957
24	2.254	19.380	1.3720	21.6674	1.3992	21.7643	1.11408	22.4629
27	2.692	17.415	1.9029	20.2763	1.9352	20.4292	1.51487	21.4602
30	3.130	15.450	2.6386	18.3489	2.6671	18.6063	2.06595	20.0815
33	4.336	12.960	3.6561	15.6832	3.6548	16.1463	2.82806	18.1749
36	5.542	10.470	5.0531	12.0230	4.9594	12.8973	3.88744	15.5245
39	6.748	7.980	6.8995	7.1855	6.6047	8.79939	5.35652	11.8491
42	7.420	6.670	8.7937	2.2227	8.4375	4.23472	7.30541	6.97331
45	7.825	5.950	9.3048	0.8837	9.7500	0.965686	9.27256	2.05184
48	8.230	5.230	9.3760	0.6972	9.8074	0.822652	9.61277	1.2007
51	8.550	4.725	9.4188	0.5851	9.8244	0.780455	9.55142	1.35417
54	8.700	4.650	9.4493	0.5050	9.8317	0.762134	9.54423	1.37217
57	8.850	4.575	9.4732	0.4425	9.8353	0.753284	9.54418	1.3723
60	9.000	4.500	9.4928	0.3910	9.8371	0.748811	9.54418	1.3723
63	9.180	4.425	9.5096	0.3470	9.8380	0.746501	9.54418	1.3723
66	9.360	4.350	9.5243	0.3086	9.8385	0.745294	9.54418	1.3723
69	9.540	4.275	9.5373	0.2745	9.8388	0.744661	9.54418	1.3723
72	9.602	4.150	9.5490	0.2439	9.8389	0.744328	9.54418	1.3723
75	9.605	4.000	9.5596	0.2162	9.8390	0.744152	9.54418	1.3723
78	9.608	3.850	9.5691	0.1911	9.8390	0.744059	9.54418	1.3723
81	9.611	3.675	9.5778	0.1684	9.8390	0.74401	9.54418	1.3723
84	9.614	3.450	9.5857	0.1478	9.8390	0.743984	9.54418	1.3723
87	9.617	3.225	9.5928	0.1292	9.8390	0.74397	9.54418	1.3723
90	9.620	3.000	9.5992	0.1125	9.8390	0.743963	9.54418	1.3723
93	9.623	2.985	9.6049	0.0975	9.8390	0.743959	9.54418	1.3723
96	9.626	2.970	9.6099	0.0842	9.8390	0.743957	9.54418	1.3723

Tabla A.6. Tabla de resultados con los parámetros cinéticos para el Consorcio 3.

Consorcio 3								
	Experimental		Teisseir		Monod		Haldane	
T	Cx	Cs	Cx	Cs	Cx	Cs	Cx	Cs
1	0.100	25.000	0.1000	25.0000	0.1	25	0.1	25
3	0.295	24.550	0.1386	24.8990	0.139344	24.9042	0.141589	24.896
6	0.490	24.100	0.1921	24.7590	0.194134	24.7707	0.200166	24.7496
9	0.685	23.650	0.2663	24.5650	0.270398	24.5849	0.282371	24.5441
12	1.050	23.370	0.3690	24.2962	0.376489	24.3265	0.397155	24.2571
15	1.500	23.175	0.5113	23.9239	0.523944	23.9673	0.556339	23.8592
18	1.950	22.980	0.7083	23.4084	0.728628	23.4687	0.775073	23.3123
21	2.475	22.315	0.9809	22.6952	1.01223	22.7778	1.07202	22.5699
24	3.150	20.710	1.3577	21.7092	1.40411	21.8232	1.46893	21.5777
27	3.825	19.105	1.8776	20.3488	1.94335	20.5097	1.98929	20.2768
30	4.500	17.500	2.5924	18.4786	2.68045	18.7141	2.65576	18.6106
33	5.595	14.731	3.5672	15.9280	3.67686	16.2869	3.4865	16.5338
36	6.690	11.962	4.8697	12.5199	4.9964	13.0725	4.49038	14.024
39	7.785	9.193	6.5061	8.2382	6.66911	8.99787	5.66098	11.0975
42	8.320	7.666	8.1900	3.8324	8.55434	4.4055	6.96614	7.83464
45	8.575	6.760	9.2231	1.1293	9.94693	1.0132	8.32012	4.44969
48	8.830	5.854	9.5387	0.3034	9.9796	0.933624	9.48753	1.53116
51	9.000	5.200	9.6227	0.0836	9.98553	0.919175	9.91786	0.455345
54	9.000	5.050	9.6458	0.0231	9.98704	0.915491	9.8386	0.653504
57	9.000	4.900	9.6522	0.0064	9.98745	0.914497	9.80998	0.725039
60	9.000	4.750	9.6540	0.0018	9.98756	0.914225	9.8126	0.718507
63	9.150	4.690	9.6545	0.0005	9.98759	0.91415	9.81216	0.719611
66	9.300	4.630	9.6546	0.0001	9.9876	0.914129	9.81223	0.719431
69	9.450	4.570	9.6547	0.0000	9.9876	0.914124	9.81222	0.719461
72	9.510	4.490	9.6547	0.0000	9.9876	0.914122	9.81222	0.719456
75	9.525	4.400	9.6547	0.0000	9.9876	0.914122	9.81222	0.719457
78	9.540	4.310	9.6547	0.0000	9.9876	0.914122	9.81222	0.719457
81	9.555	4.175	9.6547	0.0000	9.9876	0.914122	9.81222	0.719457
84	9.570	3.950	9.6547	0.0000	9.9876	0.914122	9.81222	0.719457
87	9.585	3.725	9.6547	0.0000	9.9876	0.914122	9.81222	0.719457
90	9.600	3.500	9.6547	0.0000	9.9876	0.914122	9.81222	0.719457
93	9.615	3.395	9.6547	0.0000	9.9876	0.914122	9.81222	0.719457
96	9.630	3.290	9.6547	0.0000	9.9876	0.914122	9.81222	0.719457

ANEXO II: Matriz de diseño para Análisis DOE.

Tabla A.7. Diseño del experimento para establecer la influencia para de los parámetros operacionales: tipos de consorcio, concentración del sustrato y temperatura en el proceso de biodegradación de hidrocarburos in vitro.

Item	Variables Independientes			Variables Respuestas		
	Consorcio	C. Inicial de Sustrato TPH	Temperatura	Con. Biomasa	C. final de sustrato TPH	Eficiencia
1	1	0.50	25	5.15	7.30	70.80
2	1	0.50	30	5.50	6.80	72.80
3	1	0.50	35	5.80	5.30	78.80
4	1	1.00	25	5.70	3.50	86.00
5	1	1.00	30	6.00	2.10	91.60
6	1	1.00	35	7.80	1.95	92.20
7	1	3.00	25	7.50	2.90	88.40
8	1	3.00	30	8.10	2.50	90.00
9	1	3.00	35	9.30	1.50	94.00
10	2	0.50	25	4.00	8.00	68.00
11	2	0.50	30	4.50	7.75	69.00
12	2	0.50	35	5.25	5.90	76.40
13	2	1.00	25	5.30	3.50	86.00
14	2	1.00	30	6.00	3.15	87.40
15	2	1.00	35	6.50	2.95	88.20
16	2	3.00	25	5.80	3.52	85.92
17	2	3.00	30	6.15	3.12	87.52
18	2	3.00	35	7.00	2.50	90.00
19	3	0.50	25	4.50	6.15	75.40
20	3	0.50	30	5.15	4.35	82.60
21	3	0.50	35	6.50	3.50	86.00
22	3	1.00	25	5.40	4.52	81.92
23	3	1.00	30	6.15	3.50	86.00
24	3	1.00	35	7.80	2.50	90.00
25	3	3.00	25	5.75	4.00	84.00
26	3	3.00	30	6.58	2.90	88.40
27	3	3.00	35	8.00	2.00	92.00

ANEXO III: Scripts en Berkeley Madonna para ajustar cada modelo Cinético.

```
Run
METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME=180
DT = 3

d/dt(X)=u*X
init X=0.10

d/dt(S)=-((u*X)/Yxs)
init S=25
|

u=(umax*(1-exp(-S/ks)))
ks= 3.5
umax=0.15
Yxs=0.30
```

Figura A.1. Scripts para el modelo de Teissier.

```
Run
METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME=180
DT = 3

d/dt(X)=u*X
init X=0.10

d/dt(S)=-((u*X)/Yxs)
init S=25

u=(umax*S)/(ks+S)
ks= 3.5
umax=0.15
Yxs=0.30
```

Figura A.2. Scripts para el modelo de Monod.

```
Run
METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME=150
DT = 3

d/dt(X)=(u*X)
init X=0.10

d/dt(S)=-((u*X)*(1/Yxs))
init S=25

u=umax*(S/(ks+S+(Ki*(S*S))))
ks= 3.5
umax=0.15
Yxs=0.30
Ki=0.2

|
```

Figura A.3. Scripts para el modelo de Haldane.

ANEXO IV: Uso del Berkeley Madonna por el método Runge Kutta.

Berkeley Madonna es un paquete de software de modelado matemático, desarrollado en la Universidad de California en Berkeley por Robert Macey y George Oster. Resuelve numéricamente ecuaciones diferenciales ordinarias y ecuaciones diferenciales, desarrolladas originalmente para ejecutar STELLA.

Como normalmente no se utiliza Berkeley Madonna como simulador gráfico, para utilizarlo hay que escribir directamente las ecuaciones en su Ventana de Ecuaciones (Figura A.4), siguiendo su sintaxis específica, que es muy similar al método normal de escribir las ecuaciones, como se describe en el epígrafe anterior. En la pantalla de **Madonna** aparece de inicio el Método Numérico de Resolución de Ecuaciones Diferenciales que se utiliza, que por defecto es el Runge Kutta 4, señalado como METHOD RK4; el Tiempo de Inicio de la simulación, por defecto 0 (INIT=0); el Tiempo de Terminación de la Simulación, por defecto 10 (STOPTIME=0) y del paso de integración, por defecto 0.02 (DT=0.02).

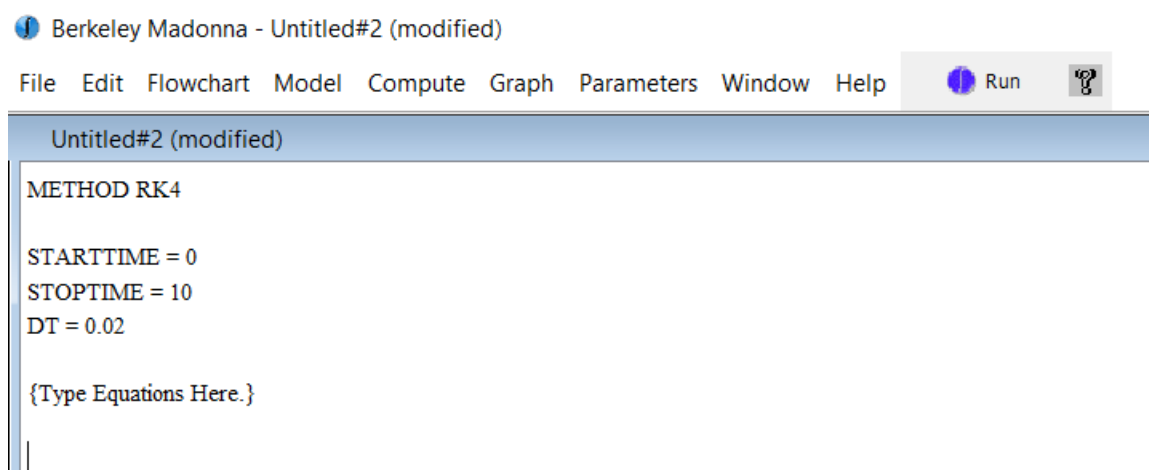


Figura A.4. Ventana inicial de ecuaciones Berkeley Madonna.

A partir de esa base, se escribirán las Ecuaciones Diferenciales de los modelos cinéticos propuestos para el crecimiento bacteriano en el proceso de biorremediación, así mismo, se introducirán las constantes y conversiones. Si no se dispone de Modelos Matemáticos, que no es el caso, lo más conveniente es utilizar un Simulador Numérico de Ambiente Gráfico como el de STELLA ya que las ecuaciones desarrolladas por este son compatibles con Berkeley Madonna, por lo cual sólo hay que importarlas. STELLA exporta las ecuaciones en un fichero texto y el contenido del mismo debe ser copiado y pegado directamente en Ventana Inicial de Ecuaciones (Figura A.4) de Madonna.

Una vez, escrito las ecuaciones diferenciales, para poder ajustar los modelos cinéticos propuestos a los resultados experimentales obtenidos, se agregaran las cinéticas de crecimiento, para ello, en la barra de tareas se seleccionará la pestaña “Parameters” y luego “Curve fit” (Figura A.5 lado superior izquierdo) la cual abrirá una ventana (Figura A.5 lado superior derecho) donde se seleccionará la opción “import Dataset” para luego importar un archivo tipo “texto” que contenga las cinéticas de crecimiento (Figura A.5 lado inferior central).

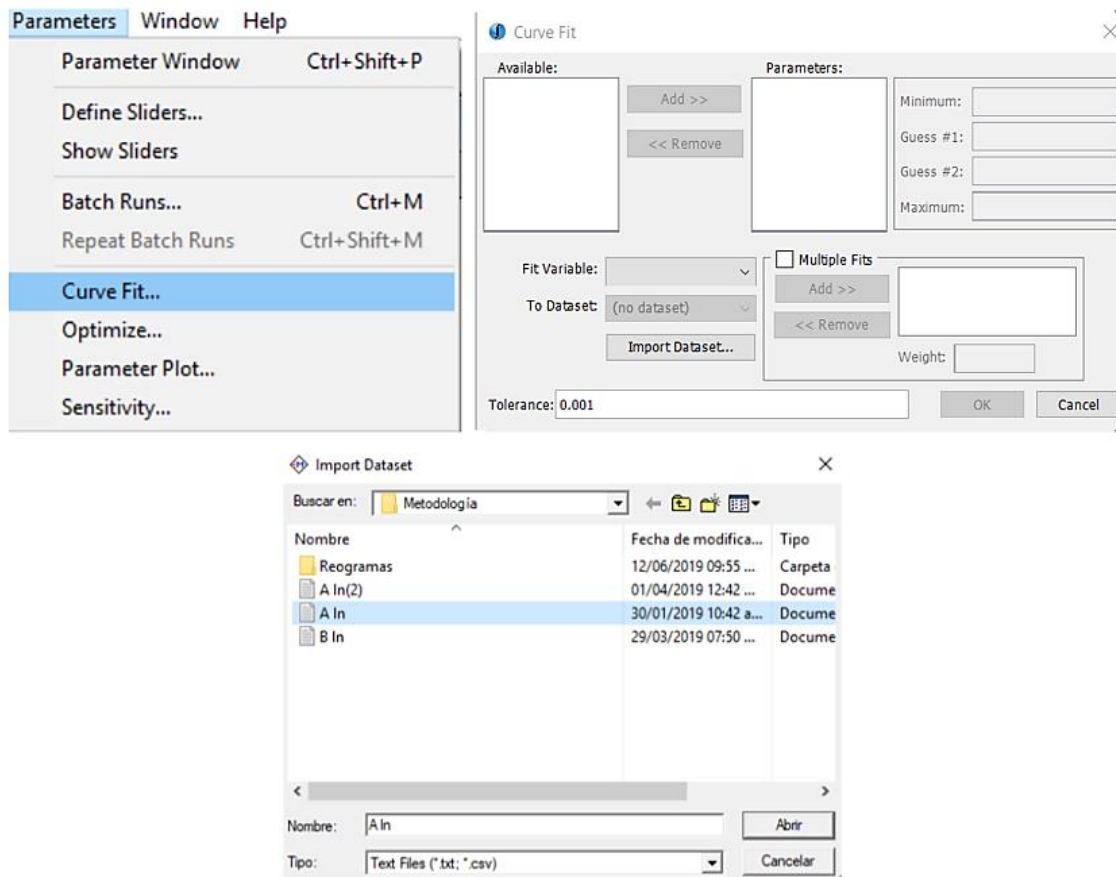


Figura A.5. Ajuste de curva de modelo cinético a los datos experimentales.

Una vez importada la cinética de crecimiento, en “Parameters” se seleccionarán las constantes de los modelos cinéticos (μ_{max} , K_s y $Y_{X/S}$), en “Fit Variable” se seleccionará la variable de ajuste establecida; con el programa del modelo propuesto abierto se seleccionará “OK” en la parte inferior de la ventana (Figura A.2 lado superior derecho) que procede a simular y ajustar los valores que aparecerán en una ventana color crema dentro de la simulación de la cinética de crecimiento.

Cada uno de los parámetros se puede seleccionar individualmente para definir valores mínimos o máximos en donde se espera encontrar los valores de ajuste,

ubicada en la pestaña de "Parameters", que abrirá la ventana de la Figura A.5 y en "Sliders" se seleccionan los parámetros μ_{max} , K_s y $Y_{X/S}$.



Figura A.6. Ventana de selección de Sliders.

ANEXO V: Uso de Minitab 18 para Diseño Experimental.

Minitab es un paquete estadístico que abarca todos los aspectos necesarios para el aprendizaje y aplicación de la Estadística en general. Incluye análisis descriptivo, contrastes de hipótesis, regresión lineal y no lineal, series temporales, análisis de tiempos de fallo, control de calidad, análisis factorial, ANOVA, análisis cluster, etc.

Minitab para diseños experimentales, ofrece cinco tipos de diseños: diseños de cribado, diseños factoriales, diseños de superficie de respuesta, diseños de mezcla y diseños de Taguchi. Una vez realizado el experimento e ingresados los resultados, Minitab proporciona varias herramientas analíticas y gráficas para ayudarle a entender los resultados (Minitab18, 2018).

Los comandos de DOE de Minitab incluyen las siguientes características:

- Catálogos de experimentos diseñados para ayudarle a crear un diseño
- Creación automática y almacenamiento de su diseño después de que usted especifica sus propiedades
- Presentación y almacenamiento de estadísticas de diagnóstico para ayudarle a interpretar los resultados
- Gráficas para ayudarle a interpretar y presentar los resultados

Para crear un diseño experimental en Minitab, los pasos a seguir son similares para todos los tipos (Minitab18, 2018). Para crear el diseño solo es de seleccionar el tipo de diseño, si es factorial o de superficie respuesta, para el caso de estudio se seleccionará el diseño factorial y el diseño de superficie respuesta, en este caso se definirá el diseño personalizado, que genera un diseño de 3 niveles.

Para el caso del diseño factorial se tienen los siguientes pasos:

- Elija Estadísticas > DOE > Factorial > Crear diseño factorial.
- En Tipo de diseño, seleccione Diseño factorial.
- En Número de factores, seleccione 3 (factores establecidos).
- Hacer clic en Diseños.
- Nombre cada Factor A, Factor B y Factor C, escriba Estilo del mensaje.
- En Número de niveles, ingrese 3 para cada factor. Haga clic en Aceptar.
- Haga clic en Factores.
- En Tipo, seleccione Texto para cada factor.
- En Valores de nivel, para cada factor, coloque los valores que corresponde para, bajo, medio y alto.

- Haga clic en Resultados.
- Seleccione Tabla de resumen y tabla de diseño.
- Haga clic en Aceptar en cada cuadro de diálogo.
- Interpretar los resultados
- La primera tabla provee un resumen del diseño: el número total de factores, corridas, bloques y réplicas.
- La tabla de diseño muestra las condiciones experimentales o valores de configuración para cada uno de los factores de los puntos de diseño utilizando nombres y niveles de factores codificados.