

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**SECCIÓN DE POSGRADO Y SEGUNDA ESPECIALIZACIÓN**



**“DEGRADACIÓN DEL FENOL PRESENTE EN AGUAS RESIDUALES DE  
AERONAVES MEDIANTE *Pseudomonas aeruginosa*”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN TRATAMIENTO DE AGUAS Y  
REUSO DE DESECHOS**

**PRESENTADO POR: ROSE ADELINE CALLATA CHURA**

**ASESOR: Dr. GUY CARVAJAL CARRANZA**

**LIMA, PERÚ**

**2014**

**Digitalizado por:**

**Consortio Digital del  
Conocimiento MebLatam,  
Hemisferio y Dalse**

## DEDICATORIA

*A Dios por darme un día a la vez y por ser la  
luz de mi camino.*

*A mis queridos padres,  
Bibiano y Hermenegilda, quienes me han  
brindado su amor y comprensión en mi vida.*

*A mis hermanos, Herbert y Jean, por las  
palabras de aliento cuando las fuerzas  
declinaban.*

*A mis amigos de la maestría por su grata  
compañía compartida conmigo.*

*Rose Adeline*

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento a la Universidad Nacional de Ingeniería, por ser el alma mater de todos los profesionales que pasaron por sus distintas aulas universitarias.

A la empresa UNIPETROABC, por las muestras provistas para el aislamiento de los microorganismos.

A la empresa Comercial Corpac S.A., por las muestras provistas para el desarrollo de la presente tesis.

A cada uno de los profesores de la Sección de Posgrado y Segunda Especialización de la Facultad de Ingeniería Ambiental, de quienes he recibido parte de su conocimiento durante las distintas fases de mi preparación.

A todo el personal administrativo de la Sección de Posgrado y Segunda Especialización de la Facultad de Ingeniería Ambiental.

Al Dr. Guy Carvajal Carraza, profesor asesor de la presente tesis, por su paciencia, constante orientación, apoyo incondicional de este trabajo y sobre todo por haberme transmitido sus conocimientos con su valiosa experiencia en el mundo de la biorremediación.

A la Blga. Pilar Amalia García, por su paciencia, apoyo en la organización del presente trabajo, disponibilidad de su tiempo, consejos durante el desarrollo de la tesis y por compartir sus conocimientos conmigo sobre el mundo de la microbiología, sobre todo por presentarme a las *Pseudomonas aeruginosa*.

A los técnicos de laboratorio de la Facultad de Ingeniería Ambiental, al Sr. Ricardo Jara Temple, Sra. Margarita Andreu Rivera y a la Srta. Secretaria Luz Marina Reinoso Alvarado, por su paciencia y disponibilidad de tiempo.

## Resumen

El presente estudio de investigación trata sobre la degradación del fenol por medio del microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*, el cual se ha efectuado en el laboratorio de Microbiología en las instalaciones de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Para el desarrollo experimental de este estudio se siguió una metodología de tres pasos, el primero consistió en el aislamiento de las cepas microbianas a partir de muestras de agua provenientes de UNIPETROABC-Talara (Lote 9, pozo 7344), y otras provenientes de Pirín D-Puno (las muestras de agua y suelo fueron tomadas de alrededores del pozo sellado, y otras muestras de hidrocarburo que se recogieron antes del sellado del pozo); de todas ellas se hicieron cultivos para la obtención de la mayor cantidad posible de cepas y ser identificadas mediante pruebas bioquímicas. El segundo paso consistió en un periodo de adaptación de la cepa seleccionada para ser utilizada en los ensayos experimentales. El tercer paso fue la utilización de la cepa, identificada como *Pseudomonas aeruginosa*, en el proceso de la biodegradación del fenol contenido en soluciones acuosas y en las muestras de aguas residuales provenientes de los retretes de las aeronaves.

El estudio de la influencia de los factores ambientales ha sido posible, mediante un diseño experimental de degradación del fenol en soluciones acuosas con rangos de concentración (30 - 70 mg/L de fenol), temperatura (16 – 28 °C) y matriz (37 - 55 unidades de perlas de alginato de calcio). En el diagrama de Pareto obtenido del estudio factorial  $2^k$ , nos indicó que la temperatura es una variable de gran influencia, seguida de la matriz y finalmente la concentración inicial de fenol, con los siguientes valores de 22.316, 11.776 y 5.507, respectivamente, con el modelamiento de la siguiente ecuación:  $Y_{est} = 43.150 + 8.425 * Matriz + 15.965 * Temperatura - 3.940 * [ ]_oFenol + 2.970 * Matriz * Temperatura - 2.025 * Matriz * [ ]_oFenol + 4.255 * Temperatura * [ ]_oFenol$ . La optimización del diseño estadístico experimental, se desarrolló mediante la metodología de superficie respuesta y diseño central compuesto de 20 ensayos experimentales. Se obtuvieron como parámetros más óptimos: temperatura 33 °C, matriz: 62 unidades de perlas de alginato de calcio, concentración inicial 49 mg/L de fenol, eficiencia de remoción del fenol 73.78 %, en un volumen de 300 mL, aireación constante de 0.046 vvm,

modelada con la siguiente ecuación:  $Y = 51.628 + 8.785 * \text{Matriz} + 16.202 * \text{Temperatura} - 3.869 * [\text{]o Fenol} - 4.051 * \text{Matriz} * \text{Matriz} - 5.964 * \text{Temperatura} * \text{Temperatura} + 1.439 * [\text{]o Fenol} * [\text{]o Fenol} + 2.970 * \text{Matriz} * \text{Temperatura} - 2.025 * \text{Matriz} * [\text{]o Fenol} + 4.255 * \text{Temperatura} * [\text{]o Fenol}$  . Analizando ambas ecuaciones se confirma que la temperatura es un parámetro fundamental en la degradación de fenol.

El equilibrio de adsorción-biodegradación ha sido estudiada con los modelos de isotermas, donde se obtuvo que el modelo de Freundlich es el que se ajusta mejor en comparación con la isoterma de Langmuir, con los siguientes valores:  $K_F = 0.328 \text{ L/mg}$ ,  $1/n = 0.7158$ ,  $R^2 = 0.991$  y  $K_L = 0.020$ ,  $R^2 = 0.809$ , respectivamente.

El estudio cinético ha sido estudiada en concentraciones de  $C_i = 10.526 \text{ mg/L}$  fenol (concentración original) y  $20 \text{ mg/L}$  fenol (concentración ajustada) presente en aguas residuales provenientes de los retretes de los aviones observándose que el mejor modelo que describe la velocidad de degradación de fenol es la cinética de primer orden con los siguientes valores;  $K_1 = 0.2441$  y  $0.1167 \text{ h}^{-1}$ ;  $R^2 = 0.9694$  y  $0.9588$ , respectivamente. No obstante se obtuvieron los siguiente valores cinéticos: modelo cinético de orden cero:  $K = 3.6025$  y  $3.3574 \text{ h}^{-1}$ ;  $R^2 = 0.9614$  y  $0.9467$ , respectivamente y modelo cinético de segundo orden:  $K_2 = 0.1325$  y  $0.0291 \text{ h}^{-1}$ ;  $R^2 = 0.9588$  y  $0.9513$ , respectivamente. Además, en la cinética de adsorción-biodegradación para concentraciones de  $C_i = 10.526$  y  $20 \text{ mg/L}$  fenol, se obtuvo que el modelo de pseudo segundo orden es el que describe mejor la cinética de adsorción-biodegradación que los modelos cinéticos de pseudo primer orden y modelo de transferencia, con los siguientes parámetros:  $K_2 = 0.245$  y  $0.021 \text{ (g/mg-h)}$ ,  $R^2 = 0.985$  y  $0.924$ ;  $K_1 = 1.8353$  y  $0.8405 \text{ h}^{-1}$ ,  $R^2 = 0.9624$  y  $0.9178$ ;  $K_0 = 0.4157$  y  $0.3275$ ,  $R^2 = 0.783$  y  $0.864$ , respectivamente, para condiciones de trabajo de temperatura de  $22 - 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , tiempo de contacto de  $2.75$  y  $4.5$  horas, respectivamente con matriz de  $20.13 \text{ g}$  (238 perlas de alginato de calcio c/u de diámetro de  $0.369 \text{ cm}$ ), volumen  $3 \text{ L}$  con aireación constante de  $0.018 \text{ vvm}$ .

Palabras clave: Batch, cinética de adsorción-biodegradación, degradación de fenol, diseño central compuesto, isotermas de adsorción, inmovilización en alginato, metodología de superficie respuesta, *Pseudomonas aeruginosa*, pruebas bioquímicas, solución acuosa, velocidad de reacción.

## Abstract

The present research treats on the degradation of phenol by means of the microorganism *Pseudomonas aeruginosa*, which has been made in the Microbiology laboratory facilities of the Universidad Nacional de Ingeniería, Lima Perú.

Experiments has been done in three step, the first consisted in the isolation of the microbial strain from water sample from UNIPETROABC-Talara (lot 9, well 7344), soil and water from Pirín-D-Puno, and hydrocarbon sample that was saved (before sealing the well). Cultivation was done in order to obtain the great quantity possible of strains to be studied and characterize them by means of biochemical tests. The second step consisted in a period of adaptation of the selected strain to be used in the experimental assays. The third step was the use of the *Pseudomonas aeruginosa* strain, itself in the process of biodegradation of phenol content in aqueous solutions and samples of wastewater from aircraft toilets.

Study the influence of the environmental factors has been possible, through an experimental design for the degradation of the phenol in aqueous solutions, in a range of concentration (30 – 70 mg/L phenol), temperature (16 – 28 °C) and matrix (37 – 55 units of calcium alginate beads). In the Pareto diagram obtained the factorial study  $2^k$  indicated us that the temperature is a variable of great influence, followed by the matrix and finally the initial concentration of phenol, whit values of 22.316, 11.776 y 5.507, respectively, with the following equation modeling:  $Y_{est} = 43.150 + 8.425 * Matriz + 15.965 * Temperatura - 3.940 * [ ]_o Fenol + 2.970 * Matriz * Temperatura - 2.025 * Matriz * [ ]_o Fenol + 4.255 * Temperatura * [ ]_o Fenol$ .

The optimization of statistical experimental design, was developed through the response surface methodology and central composite design (20 experimental trials), parameters were obtained more optimum: temperature 33 °C, matrix: 62 units of calcium alginate beads, initial concentration of phenol 49 mg/L, removal efficiency of phenol 73.78 %, in a volume of 300 mL, constant aeration of 0.046 vvm, with the following equation:  $Y = 51.628 + 8.785 * Matriz + 16.202 * Temperatura - 3.869 * [ ]_o Fenol - 4.051 * Matriz * Matriz - 5.964 * Temperatura * Temperatura + 1.439 * [ ]_o Fenol * [ ]_o Fenol + 2.970 * Matriz * Temperatura - 2.025 * Matriz * [ ]_o Fenol + 4.255 * Temperatura * [ ]_o Fenol$ . Analyzing both

equation confirms that the temperature is a fundamental parameter in the degradation of phenol.

The equilibrium adsorption-biodegradation has been analyzed by models of isotherms, showing that Freundlich model fits better than Langmuir isotherm, with values:  $K_F = 0.328 \text{ L/mg}$ ,  $1/n = 0.7158$ ,  $R^2 = 0.9916$ ;  $K_L = 0.020$ ,  $R^2 = 0.809$ , respectively.

In kinetic studies for concentrations of  $C_i = 10.526 \text{ mg/L}$  phenol (original concentration) and  $20 \text{ mg/L}$  phenol (adjusted concentration) present in aircraft toilet wastewater, the best model that describes the rate of phenol degradation is the first order kinetics with the following values;  $K_1 = 0.2441$  and  $0.1167 \text{ h}^{-1}$ ;  $R^2 = 0.9694$  and  $0.9588$ , respectively. It has also been obtained the following kinetic values for each model: Kinetic model of zero order:  $K = 3.6025$  and  $3.3574 \text{ h}^{-1}$ ;  $R^2 = 0.9614$  and  $0.9467$ , respectively; kinetic model of second order:  $K_2 = 0.1325$  and  $0.0291 \text{ h}^{-1}$ ;  $R^2 = 0.9588$  and  $0.9513$ , respectively. The adsorption-biodegradation kinetic for concentration of  $C_i = 10.526$  and  $20 \text{ mg/L}$  phenol, also shows that the pseudo second order model is that best describes it than pseudo first order model and mass transfer model, with the following parameters:  $K_2 = 0.245$  and  $0.021 \text{ (g/mg-h)}$ ,  $R^2 = 0.985$  and  $0.924$ ;  $K_1 = 1.8353$  and  $0.8405 \text{ h}^{-1}$ ,  $R^2 = 0.9624$  and  $0.9178$ ;  $K_0 = 0.4157$  and  $0.3275$ ,  $R^2 = 0.783$  and  $0.864$ , respectively, for working conditions: temperature  $22\text{-}28 \text{ }^\circ\text{C}$ , contact time of  $2.75$  and  $4.5$  hours, respectively, matrix  $20.13 \text{ g}$  (238 calcium alginate beads c/u of diameter  $0.369 \text{ cm}$ ), volume  $3\text{L}$  with constant aeration of  $0.018 \text{ vvm}$ .

**Key words:** Batch, adsorption-biodegradation kinetics, degradation of phenol, central composite design, adsorption isotherm, alginate immobilization, response surface methodology, *Pseudomonas aeruginosa*, biochemical tests, aqueous solution, reaction rates.

## CONTENIDO

## CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Marco legal.....	3
1.1.1. Normas nacionales .....	3
1.1.2. Normas internacionales .....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Generalidades sobre fenoles.....	8
2.1.1. Fenol.....	9
2.1.2. Sinónimos .....	9
2.1.3. Descripción .....	9
2.1.4. Propiedades.....	10
2.1.4.1. Propiedades físicas .....	10
2.1.4.2. Propiedades químicas .....	11
2.1.5. Toxicidad del fenol .....	11
2.2. Fuentes de generación y eliminación del fenol en aguas residuales .....	12
2.3. Biodegradación del fenol por microorganismos .....	13
2.3.1. El género <i>Pseudomonas</i> .....	14
2.3.1.1. Ecología .....	16
2.3.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
2.3.1.2.1. Características de la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
2.3.2. Mecanismo de la Biodegradación del fenol .....	19
2.3.2.1. Ruta catabólica aerobia .....	20
2.3.2.2. Escisión orto o ruta del $\beta$ -cetoadipato .....	21
2.3.2.3. Escisión meta .....	23
2.3.3. Inmovilización .....	25
2.3.3.1. Ventajas de la inmovilización de células .....	25
2.3.3.2. Encapsulamiento en geles de alginato de calcio .....	26
2.3.3.2.1. Alginato.....	26
2.3.3.2.2. Estructura química del alginato .....	26

2.3.3.2.3. Formación del gel .....	28
2.4. Modelos teóricos .....	29
2.4.1. Modelos de Isotermas .....	30
2.4.1.1. Isotherma de Freundlich .....	31
2.4.1.2. Isotherma de Langmuir .....	31
2.4.2. Balance de masas para un reactor en lotes (batch) .....	32
2.4.2.1. Modelos cinéticos en un sistema en lotes (batch) .....	33
2.4.2.2. Modelos cinéticos de adsorción - biodegradación .....	33
2.4.2.2.1. Modelo de pseudo primer orden .....	34
2.4.2.2.2. Modelo de pseudo segundo orden .....	34
2.4.2.2.3. Modelo de transferencia de masa .....	35
2.5. Diseño experimental: Metodología de superficie respuesta .....	36
2.5.1. Modelos polinomiales aproximados a la respuesta real .....	36
2.5.1.1. Polinomio de primer orden .....	36
2.5.1.2. Polinomio de segundo orden .....	38
2.5.2. Diseño central compuesto (DCC) .....	40
 CAPÍTULO II	
OBJETIVOS .....	42
 CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
3. Obtención de bacterias .....	43
3.1. Aislamiento de microorganismos .....	43
3.1.1. Siembra .....	44
3.1.2. Aislamiento de bacterias en agar nutritivo .....	46
3.1.3. Trasplante de microorganismos en tubos de ensayo .....	46
3.2. Pruebas Bioquímicas .....	47
3.3. Aclimatación de bacterias selectas .....	48
3.3.1. Medio Mineral .....	48
3.3.2. Adaptación de las bacterias en altas concentraciones de fenol .....	48
3.4. Encapsulamiento en geles de alginato de calcio .....	50

3.5. Determinación de fenol por el método de 4 amino antipirina .....	51
3.5.1. Determinación de la curva de calibración.....	51
3.5.2. Análisis de la muestra .....	53
3.6. Metodología superficie respuesta aplicado en el proceso de la degradación del fenol .....	55
3.7. Ámbito de estudio: Aguas residuales proveniente de los retretes de aeronaves .....	60
3.7.1. Caracterización de la muestra.....	60
3.7.2. Degradación de fenol en un reactor en lote (batch).....	60

#### CAPÍTULO IV

RESULTADOS .....	61
4.1. Siembra, aislamiento, reconocimiento de la cepa y aclimatación .....	61
4.1.1. Siembra y aislamiento.....	61
4.1.2. Pruebas de reconocimiento de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61
4.1.3. Resultados de las adaptaciones de las bacterias en altas concentraciones de fenol.....	62
4.2. Curva de calibración por el método 4 aminoantipirina .....	64
4.3. Metodología de superficie respuesta aplicado en el proceso de degradación del fenol .....	65
4.3.1. Etapa de selección de variables (screening).....	66
4.3.2. Etapa de optimización final: diseño central compuesto .....	72
4.4. Modelo de isotermas .....	89
4.4.1. Isoterma de Freundlich .....	90
4.4.2. Isoterma de Langmuir .....	91
4.5. Degradación del fenol presente en aguas residuales provenientes de los retretes de las aeronaves.....	95
4.5.1. Caracterización de la muestra de aguas residuales .....	95
4.5.1.1. Variación del pH y la conductividad eléctrica con el tiempo .....	96
4.5.2. Modelos cinéticos .....	99
4.5.2.1. Modelos cinéticos en un sistemas en lotes (batch) .....	99
4.5.2.1.1. Modelo de orden cero.....	102
4.5.2.1.2. Modelo de primer orden .....	103
4.5.2.1.3. Modelo de segundo orden.....	104

4.5.2.2. Modelos cinéticos de adsorción - biodegradación .....	106
4.5.2.2.1. Modelo de pseudo primer orden.....	106
4.5.2.2.2. Modelo de pseudo segundo orden .....	108
4.5.2.2.3. Modelo de transferencia de masa.....	109
4.6. Evaluación económica del método desarrollado en la degradación del fenol .....	111

## CAPÍTULO V

DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	112
5.1. Reconocimiento de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	112
5.2. Discusión de resultados de la metodología superficie respuesta aplicado al proceso de la degradación del fenol .....	113
5.2.1. Etapa de selección de variables (screening).....	113
5.2.1.1. Efecto de la matriz, temperatura y concentración inicial en la degradación del fenol.....	114
5.2.1.2. Análisis sobre el diagrama de Pareto .....	115
5.2.2. Optimización final mediante el diseño central compuesto .....	115
5.3. Discusión de resultados de modelos matemáticos en Isotermas.....	117
5.4. Discusión de resultados de modelos cinéticos .....	118
5.4.1. Modelos cinéticos en un sistema en lotes (batch) .....	119
5.4.2. Modelos cinéticos de adsorción – biodegradación .....	119
5.5. Evaluación económica del método desarrollado en la degradación del fenol .....	120
CONCLUSIONES.....	122
RECOMENDACIONES .....	124
LITERATURA CITADA.....	125
ANEXOS .....	136

**Lista de tablas**

Tabla 1: Propiedades físicas del fenol.....	10
Tabla 2: Compuestos fenólicos clasificados por la EPA .....	12
Tabla 3: Ventajas del uso de microorganismos en tratamientos biológicos .....	14
Tabla 4: Especies de <i>Pseudomonas</i> agrupadas según el grado de identidad de sus ARNr. Los grupos II, III, IV y V, actualmente están ubicados en nuevos géneros de <i>alpha proteobacteria</i> . .....	15
Tabla 5: Métodos de integración y diferencial empleados para determinar el coeficiente cinético de reacción. Para las reacciones de orden cero, primer orden y segundo orden con ecuaciones [2.10], [2.11], y [2.12], respectivamente. ....	33
Tabla 6: Valores de diseños centrales compuestos, en diferentes números de variables.....	41
Tabla 7: Diseño factorial $2^k$ aplicado al proceso de la degradación de fenol.....	58
Tabla 8: Niveles para el diseño factorial $2^k$ .....	58
Tabla 9: Diseño central compuesto aplicado al proceso de la degradación de fenol. ....	59
Tabla 10: Niveles para un diseño central compuesto .....	59
Tabla 11: Resultados de pruebas bioquímicas para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	61
Tabla 12: Variación del pH a diferentes concentraciones de fenol, en el proceso de aclimatación. ....	63
Tabla 13: Crecimiento de colonias a 1400 mg/L de fenol .....	63
Tabla 14: Técnica de 4-aminoantipirina.....	64
Tabla 15: Curva de calibración para el fenol a una longitud de onda de 560 nm....	64
Tabla 16: Resultado del análisis en la degradación del fenol para soluciones acuosas.....	65
Tabla 17: Matriz del diseño factorial $2^k$ con su respectiva respuesta.....	66
Tabla 18: Efectos del diseño factorial $2^k$ .....	66
Tabla 19: Análisis de varianza para el diseño factorial $2^k$ .....	67
Tabla 20: Datos de estudio para el modelo matemático a escala natural. ....	69
Tabla 21: Valores del diseño central compuesto. ....	72
Tabla 22: Variables del DCC con su respectiva respuesta. ....	73
Tabla 23: Análisis de varianza para el diseño central compuesto.....	74
Tabla 24: Análisis de significancia.....	77

Tabla 25: Cálculo de residuales. ....	78
Tabla 26: Cálculos involucrados en el DCC.....	81
Tabla 27: Valores de concentración inicial y concentración en equilibrio de la solución acuosa de fenol con tiempo de contacto de 2 horas.....	89
Tabla 28: Resultados de las constantes de la isoterma de Freundlich y valores teóricos calculados de la cantidad de adsorbato adsorbido-biodegradado por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inmovilizada en matrices de alginato de calcio.....	91
Tabla 29: Resultados de las constantes de la isoterma de Langmuir y valores teóricos calculados de la cantidad de adsorbato adsorbido-biodegradado por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inmovilizada en matrices de alginato de calcio.....	93
Tabla 30: Resumen comparativo de isotermas de adsorción-biodegradación del fenol por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inmovilizada en matrices de alginato de calcio.....	94
Tabla 31: Resultados de sólidos totales de aguas residuales.....	95
Tabla 32: Resultados de parámetros físico químico de aguas residuales.....	95
Tabla 33: Variación del pH y la conductividad eléctrica para la concentración de 10.526 µg/mL de fenol con tiempo de contacto de 2.75 h.....	96
Tabla 34: Variación del pH y la conductividad eléctrica para la concentración de 20 µg/mL de fenol con tiempo de contacto de 4.5 h. ....	97
Tabla 35: Degradación del fenol presente en aguas residuales de concentración inicial de 10.526 mg/L por medio de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inmovilizadas en matrices de geles de alginato de calcio....	100
Tabla 36: Degradación del fenol presente en aguas residuales de concentración inicial de 20 mg/L por medio de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inmovilizadas en matrices de geles de alginato de calcio....	100
Tabla 37: Resumen comparativo de modelos cinéticos en un sistema de lotes (batch).....	106
Tabla 38: Resumen comparativo de modelos cinéticos de adsorción-biodegradación del fenol por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> inmovilizados en matrices de alginato de calcio.....	110
Tabla 39: Costo total del aislamiento, reconocimiento, adaptación e inmovilización de la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	111

Tabla 40: Costo total del tratamiento del agua residual proveniente de las aeronaves. ....	111
Tabla 41: Costo total del análisis de una muestra. ....	111
Tabla 42: Del anexo I: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua: Categoría 1: Poblacional y Recreacional. ....	141
Tabla 43: Del anexo I: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua: Categoría 3: Riego de vegetales y bebidas de animales. ....	143
Tabla 44: Del anexo I: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua: Categoría 3: Riego de vegetales y bebidas de animales. ....	144
Tabla 45: Costo energético de aislamiento, identificación, adaptación y encapsulamiento del microorganismo.....	145
Tabla 46: Costo de los reactivos utilizados en aislamiento, reconocimiento e inmovilización de los microorganismos.....	146
Tabla 47: Resumen de costos de reactivos utilizados en aislamiento, reconocimiento, adaptación e inmovilización del microorganismo. ....	147
Tabla 48: Costo energético del análisis de una muestra y costo de consumo de agua potable para condensar una muestra.....	147
Tabla 49: Costo de reactivos en el análisis de una muestra. ....	148
Tabla 50: Recopilación de temperaturas en la biodegradación del fenol con distintas cepas.....	149
Tabla 51: Recopilación de las constantes de isotermas. ....	150

## Lista de figuras

Figura 1: Estructura química del fenol .....	11
Figura 2: Espectro de infrarrojo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
Figura 3: Escisión del orto catecol. ....	22
Figura 4: Escisión meta catecol. ....	24
Figura 5: Composición monomérica del ácido alginico.....	27
Figura 6: Bloques poliméricos de ácido manurónico (M) y ácido glucurónico (G). ..	27
Figura 7: Estructura conformacional: Diagrama representativo de la interacción del ion calcio con los segmentos poliglucurónicos para la formación del gel alginato de calcio. ....	28
Figura 8: Estructura del alginato de calcio.....	29
Figura 9: Diseño central compuesto de tres factores.....	41
Figura 10: Pirín en el departamento de Puno. ....	43
Figura 11: Siembra de muestras de 3 (agua, suelo e hidrocarburo) y 2 (agua y suelo) componentes provenientes de Pirín.....	44
Figura 12: Muestra de agua de producción de hidrocarburo proveniente de Talara.....	44
Figura 13: Siembra de muestras en medios de King A y King B.....	45
Figura 14: Aislamiento de bacterias en placas de agar nutritivo .....	46
Figura 15: Trasplante de microorganismos en tubos de ensayo.....	46
Figura 16: Fijación de cepas para la tinción Gram.....	47
Figura 17: Proceso de siembra en la aclimatación .....	49
Figura 18: Proceso de aclimatación de cepas .....	49
Figura 19: Inmovilización de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en matrices de alginato. ....	50
Figura 20: Curva de calibración del fenol.....	52
Figura 21: Equipo de espectrofotómetro UV.....	53
Figura 22: Ajuste de la muestra a pH 4, con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %), NaOH (2.5 N).....	54
Figura 23: Limpieza de la muestra por medio de la destilación.....	54
Figura 24: Ajuste de la muestra a pH 7.9, con NH <sub>4</sub> OH (0.5 N) y solución buffer de fosfato. ....	55
Figura 25: Diagrama de flujo diseño factorial.....	56
Figura 26: Diagrama de flujo del diseño central compuesto.....	57

Figura 27: Tinción gram, pruebas bioquímicas (Citrato de Simmons, LIA, TSI y UREA), producción de pioverdina en medio King B, presencia de fluorescencia bajo longitud de onda corta de 254 nm. ....	62
Figura 28: Curva de calibración para el fenol a una longitud de onda de 560 nm. ...	65
Figura 29: Diagrama de Pareto. ....	68
Figura 30: Representación gráfica de la escala natural para $X_3=0$ . ....	70
Figura 31: Representación gráfica de la escala natural para $X_2=0$ . ....	71
Figura 32: Representación gráfica de la escala natural para $X_1=0$ . ....	72
Figura 33: Porcentaje de degradación calculado Vs. porcentaje de degradación experimental. ....	79
Figura 34: Valores de los residuales en la degradación del fenol calculado. ....	79
Figura 35: Residuo Vs. orden temporal. ....	80
Figura 36: Interacción de la matriz con la temperatura con respecto al porcentaje de degradación del fenol por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> basado en la MSR. ....	84
Figura 37: Mapa de contornos de MSR de interacción de la matriz con la temperatura en la degradación del fenol. ....	85
Figura 38: Interacción de la matriz con la concentración inicial con respecto al porcentaje de degradación del fenol por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> basado en la MSR. ....	86
Figura 39: Mapa de contornos de MSR de interacción de la matriz con la concentración inicial en la degradación del fenol. ....	87
Figura 40: Interacción de la temperatura con la concentración inicial con respecto al porcentaje de degradación del fenol por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> basado en la MSR. ....	88
Figura 41: Mapa de contornos de MSR de interacción de la temperatura con la concentración inicial en la degradación del fenol. ....	89
Figura 42: Isoterma de Freundlich para la adsorción-biodegradación del fenol utilizando 2.63 g de matriz, en disoluciones de concentración inicial de 16, 50, y 84 mg/L de volumen 300 mL en aireación constante de 0.046 vvm a temperatura de 22°C con tiempo de contacto de 2 horas. ...	90
Figura 43: Isoterma de Langmuir para la adsorción-biodegradación del fenol utilizando 2.63 g de matriz, en disoluciones de concentración inicial	

de 16, 50, y 84 mg/L de volumen 300 mL en aireación constante de 0.046 vvm a temperatura de 22°C con tiempo de contacto de 2 horas. ...	92
Figura 44: Variación del pH con el tiempo para la concentración de 10.526 µg/mL de fenol.....	97
Figura 45: Variación del pH con el tiempo para la concentración de 20 µg/mL de fenol. ....	98
Figura 46: Variación de la conductividad eléctrica con el tiempo para la concentración de 10.526 µg/mL de fenol.....	98
Figura 47: Variación de la conductividad eléctrica con el tiempo para la concentración de 20 µg/mL de fenol.....	99
Figura 48: Porcentaje de remoción del fenol con el tiempo para una concentración de 10.526 mg/L. ....	101
Figura 49: Porcentaje de remoción del fenol con el tiempo para una concentración de 20 mg/L. ....	101
Figura 50: Modelo cinéticos de orden cero, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente. ....	103
Figura 51: Modelo cinético de primer orden, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente. ....	104
Figura 52: Modelo cinético de segundo orden, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente. ....	105
Figura 53: Modelo cinético de pseudo primer orden, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.....	107
Figura 54: Modelo cinético de pseudo segundo orden, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.....	108
Figura 55: Modelo cinético de transferencia de masa, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.....	109

## Lista de anexos

Anexo 1: Preparación de medios.....	137
Anexo 1a: Medios de King A y King B.....	137
Anexo 1b: Agua peptonada.....	137
Anexo 1c: Agar nutritivo en plano inclinado.....	138
Anexo 2: Pruebas de reconocimiento.....	138
Anexo 2a: Tinción Gram.....	138
Anexo 2b: Prueba de oxidasa.....	139
Anexo 2c: Prueba de catalasa.....	139
Anexo 2d: Pruebas de Citrato de Simmons, TSI, LIA, UREA.....	139
Anexo 2e: Crecimiento en agar cetrimide. Medio específico para <i>Pseudomonas</i> ...	139
Anexo 3: Tablas del Decreto supremo 002-2008 MINAM (30/07/2008). Aprobación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua.....	141
Anexo 4: Evaluación económica a nivel laboratorio de tratamiento del agua residual proveniente de los retretes de las aeronaves. ....	145
Anexo 5: Tablas de recopilación de autores en la degradación de fenol. ....	149
Anexo 6: Tablas estadísticas para el diseño experimental.....	150

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, la remoción del fenol ha sido realizada mediante procesos físicos y químicos con derivados secundarios, sin embargo las técnicas biológicas tienen una gran ventaja como la remoción total por medio de la mineralización completa en  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_3$  <sup>(88)</sup> con costos de operación bajos <sup>(63)</sup>, donde la degradación completa puede ser realizadas por bacterias, hongos y levaduras que utilizan el fenol como fuente de carbono y energía <sup>(6,103)</sup>.

Sin embargo los compuestos xenobióticos como el fenol pueden contribuir con la inestabilidad de los sistemas de tratamientos biológicos de aguas residuales <sup>(34)</sup> que inhiben a los microorganismos actuadores en la degradación de materia orgánica y otros compuestos, por lo tanto, estos compuestos disminuyen la eficiencia de las plantas de tratamiento de aguas residuales, así como el fenol que es de efecto bactericida que se basa en la interrupción de las funciones de las membranas citoplasmáticas de los microorganismos causando así la muerte de ellos. Por tanto, para minimizar este problema se han aislado bacterias extremófilas que degraden el fenol como la *Pseudomonas aeruginosa* que han sido adaptadas a diferentes concentraciones de fenol (7 a 1400 mg/L) y enriquecida con medios suplementarios de crecimiento.

Así pues, la degradación del fenol está influenciada por varios efectos, como: la temperatura, concentración inicial de fenol, pH, suplementos de medios minerales, oxigenación y velocidad de agitación, en la máxima eficiencia de degradación de fenol.

Por otra parte los efluentes líquidos provenientes de los retretes de las aeronaves con contenido de fenol a altas concentraciones hacen imposible descargar directamente a la red pública y/o sistema de tratamiento biológico convencional por lo que el presente estudio pretende optimizar el porcentaje de remoción del fenol en un sistema biológico en simulación en sistema por lotes (batch). Es por ello que se plantea la siguiente interrogante: ¿Puede un microorganismo como la *Pseudomonas aeruginosa* degradar el fenol presente en aguas residuales de aeronaves?

Se establece como hipótesis principal entonces que *Pseudomonas aeruginosa*, un microorganismo que se caracteriza por poseer una extrema versatilidad metabólica que en condiciones ambientales adecuadas de temperatura podría degradar al fenol presente en aguas residuales de aeronaves, en un 70%.

Para ello hemos propuesto como propósito principal de este estudio la evaluación de la capacidad degradativa del fenol presente en aguas residuales de aeronaves mediante *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de alginato de calcio teniendo como objetivos específicos el aislamiento de microorganismo con capacidad degradativa de fenol; determinación de los valores óptimos de matriz, temperatura y concentración inicial de fenol para una máxima degradación; evaluación de la capacidad de adsorción-biodegradación de la matriz de alginato de calcio; y determinación de la cinética representativa en los procesos de degradación del fenol presentes en aguas residuales de aeronaves por medio de modelos matemáticos.

## **1.1. Marco legal**

El presente trabajo se encuentra inmerso en un conjunto de leyes y normas vigentes:

### **1.1.1. Normas nacionales**

- 1.1.1.1. Decreto Supremo N° 008-2005-PCM: Reglamento de la Ley Marco del Sistema Nacional de Gestión Ambiental (15/10/2005).

#### **TÍTULO II**

#### **DE LOS SUJETOS DE LA GESTIÓN AMBIENTAL**

#### **CAPÍTULO 4**

#### **EMPRESA Y AMBIENTE**

##### **Artículo 73.- Del ámbito**

73.1 Las disposiciones del presente Capítulo son exigibles a los proyectos de inversión, de investigación y a toda actividad susceptible de generar impactos negativos en el ambiente, en tanto sean aplicables, de acuerdo a las disposiciones que determine la respectiva autoridad competente.

73.2 El término "titular de operaciones" empleado en los artículos siguientes de este Capítulo incluye a todas las personas naturales y jurídicas.

##### **Artículo 74.- De la responsabilidad general**

Todo titular de operaciones es responsable por las emisiones, efluentes, descargas y demás impactos negativos que se generen sobre el ambiente, la salud y los recursos naturales, como consecuencia de sus actividades. Esta responsabilidad incluye los riesgos y daños ambientales que se generen por acción u omisión.

##### **Artículo 75.- Del manejo integral y prevención en la fuente**

75.1 El titular de operaciones debe adoptar prioritariamente medidas de prevención del riesgo y daño ambiental en la fuente generadora de los mismos, así como las demás medidas de conservación y protección ambiental que corresponda en cada una de las etapas de sus operaciones, bajo el concepto de ciclo de vida de los bienes que produzca o los servicios que provea, de conformidad con los principios establecidos en el Título Preliminar de la presente Ley y las demás normas legales vigentes.

75.2 Los estudios para proyectos de inversión a nivel de prefactibilidad, factibilidad y definitivo, a cargo de entidades públicas o privadas, cuya ejecución pueda tener impacto en el ambiente deben considerar los costos necesarios para preservar el ambiente de la localidad en donde se ejecutará el proyecto y de aquellas que pudieran ser afectadas por éste.

Artículo 83.- Del control de materiales y sustancias peligrosas

83.1 De conformidad con los principios establecidos en el Título Preliminar y las demás disposiciones contenidas en la presente Ley, las empresas adoptan medidas para el efectivo control de los materiales y sustancias peligrosas intrínsecas a sus actividades, debiendo prevenir, controlar, mitigar eventualmente, los impactos ambientales negativos que aquellos generen.

83.2 El Estado adopta medidas normativas, de control, incentivo y sanción, para asegurar el uso, manipulación y manejo adecuado de los materiales y sustancias peligrosas, cualquiera sea su origen, estado o destino, a fin de prevenir riesgos y daños sobre la salud de las personas y el ambiente.

### TÍTULO III

## INTEGRACIÓN DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL

### CAPÍTULO 3

#### CALIDAD AMBIENTAL

Artículo 121.- Del vertimiento de aguas residuales

El Estado emite en base a la capacidad de carga de los cuerpos receptores, una autorización previa para el vertimiento de aguas residuales domésticas, industriales o de cualquier otra actividad desarrollada por personas naturales o jurídicas, siempre que dicho vertimiento no cause deterioro de la calidad de las aguas como cuerpo receptor, ni se afecte su reutilización para otros fines, de acuerdo a lo establecido en los ECA correspondientes y las normas legales vigentes.

Artículo 122.- Del tratamiento de residuos líquidos

122.1 Corresponde a las entidades responsables de los servicios de saneamiento la responsabilidad por el tratamiento de los residuos líquidos domésticos y las aguas pluviales.

122.2 El sector Vivienda, Construcción y Saneamiento es responsable de la vigilancia y sanción por el incumplimiento de LMP en los residuos líquidos domésticos, en coordinación con las autoridades sectoriales que ejercen funciones relacionadas con la descarga de efluentes en el sistema de alcantarillado público.

122.3 Las empresas o entidades que desarrollan actividades extractivas, productivas, de comercialización u otras que generen aguas residuales o servidas, son responsables de su tratamiento, a fin de reducir sus niveles de contaminación hasta niveles compatibles con los LMP, los ECA y otros estándares establecidos en instrumentos de gestión ambiental, de conformidad con lo establecido en las normas legales vigentes. El manejo de las aguas residuales o servidas de origen industrial puede ser efectuado directamente por el generador, a través de terceros debidamente autorizados o a través de las entidades responsables de los servicios de saneamiento, con sujeción al marco legal vigente sobre la materia.

1.1.1.2. Decreto supremo 002-2008 MINAM (30/07/2008)

Aprobación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua.

Artículo 1. Aprobar los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para agua, contenidos en el Anexo I del presente Decreto Supremo, con el objetivo de establecer el nivel de concentración o el grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos presentes en el agua, en su condición de cuerpo receptor y componente básico de los sistemas acuáticos, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni para el ambiente. Los Estándares aprobados son aplicables a los cuerpos de agua del territorio nacional en su estado natural y son obligatorios en el diseño de las normas legales y las políticas públicas siendo un referente obligatorio en el diseño y aplicación de todos los instrumentos de gestión ambiental.

1.1.1.3. Decreto supremo N° 003-2011-Vivienda, aprueba el Reglamento del Decreto Supremo N° 021-2009-VIVIENDA, que aprueba los Valores

Máximos Admisibles de las descargas de aguas residuales no domésticas en el Sistema de Alcantarillado Sanitario (22/05/2011).

**Artículo 1.-Del objeto**

El presente Reglamento tiene por objeto regular los procedimientos para controlar las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario, de acuerdo a lo establecido en el Decreto Supremo N° 021-2009-Vivienda.

**Artículo 2.- Del ámbito de aplicación**

El presente Reglamento es de obligatorio cumplimiento para los usuarios no domésticos que efectúan descargas de aguas residuales no domésticas al sistema de alcantarillado sanitario bajo el ámbito de las Entidades Prestadoras de Servicios de Saneamiento o las entidades que hagan sus veces en el ámbito nacional.

- 1.1.1.4. Decreto Supremo N° 010-2012-VIVIENDA - Modifican el Reglamento del D.S. N° 021-2009-VIVIENDA con la finalidad de establecer procedimientos para controlar descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario (04/03/2012).

**Artículo 5.- De las obligaciones**

Los usuarios no domésticos que descargan aguas residuales no domésticas al sistema de alcantarillado sanitario, están obligados a:

- i) Los usuarios no domésticos cuyas actividades estén clasificadas según el CIU, deberán declarar, reportar y cumplir con las obligaciones que se establecen en el presente Reglamento, en función de los parámetros que para dichas actividades establezca el ente rector. Para aquellas actividades que no se han establecido parámetros, los usuarios no domésticos deberán cumplir con todos los parámetros señalados en los anexos N° 1 y N°2 del Decreto Supremo N° 021-2009-VIVIENDA.

- 1.1.1.5. Resolución Ministerial N° 116-2012-VIVIENDA - Aprueban los parámetros para las actividades que según la Clasificación Industrial Internacional Uniforme (CIU), serán de cumplimiento obligatorio por parte de los Usuarios No Domésticos, en aplicación del D.S. N° 021-2009-VIVIENDA,

referido a los valores máximos admisibles de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario (19/06/2012).

Artículo 1.- Aprobar los parámetros para las actividades que según la Clasificación Industrial Uniforme (CIIU) será de cumplimiento obligatorio por parte de los Usuarios No Domésticos, en aplicación del Decreto Supremo N°021-2009-VIVIENDA y su Reglamento, aprobado con Decreto Supremo N° 003-2011-VIVIENDA; el cual en Anexo forma parte integrante de la Resolución.

### **1.1.2. Normas internacionales**

#### **1.1.2.1. Norma oficial Mexicana NOM-CCA-003-ECOL/1993**

Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria de refinación de petróleo y petroquímica, con respecto al fenol que el LMP es de 0.5 a 0.75 mg/L.

#### **1.1.2.2. Norma oficial Mexicana NOM-CCA-031-ECOL/1993 (10-18-93)**

Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la industria, actividades agroindustriales, de servicios y el tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenajes y alcantarillado urbano o municipal, con respecto al fenol que el LMP es de 5mg/L (promedio diario) a 10 mg/L (instantáneo).

#### **1.1.2.3. Norma Cubana NC-521-2007. Vertimiento de aguas residuales a la zona costera y aguas marinas-especificaciones, menciona que en el vertimiento de aguas residuales a la zona costera y los cuerpos receptores marinos, que el límite de carga contaminante diaria para clasificar como fuente contaminante, para compuestos fenólicos es de 70 g/d.**

#### **1.1.2.4. Costa Rica: Reglamento de vertido y reuso de aguas Residuales-Poder Ejecutivo Decreto N° 33601-MINAE-S (19-03-2007)**

- Límites máximos permisibles, para los parámetros complementarios de análisis obligatorio, de aguas residuales vertidas en alcantarillados sanitarios: Fenoles y cresoles: 5 mg/L
- Límites máximos permisibles para los parámetros obligatorios complementarios de aguas residuales vertidas en un cuerpo receptor: Fenol: 1 mg/L.

1.1.2.4. MERCOSUR/GMC/RES. N° 34/01. Criterios para la administración sanitaria de desechos líquidos y aguas servidas en puertos, aeropuertos, terminales y puntos de frontera, en el Mercosur. Tratado de Asunción, el Protocolo de Ouro Preto, las Resoluciones N° 91/93, N° 4/98 del Grupo Mercado Común y la Recomendación N° 08/00 del SGT N° 11 "Salud".

1. ALCANCE: Estos Criterios deberán ser aplicados en los Sistemas de Administración Sanitaria de Desechos Líquidos y Aguas Servidas, o en los mecanismos institucionales u organismos competentes de cada país, en Puertos, Aeropuertos, Terminales y Puntos de Frontera ya existentes y en los sistemas a ser instalados.
2. PLAN DE GERENCIAMIENTO DE DESECHOS LÍQUIDOS Y AGUAS SERVIDAS DE LAS INSTALACIONES DE PUERTOS, AEROPUERTOS, TERMINALES Y PUNTOS DE FRONTERA. La Administración Sanitaria de Desechos Líquidos y Aguas Servidas, o en los mecanismos institucionales u organismos competentes de cada país, generadas en vehículos en Tránsito Transfronterizo y en las Terminales Terrestres, Portuarias, Aeroportuarias y Puntos de Frontera de los Estados Partes deberá hacerse en base a un Plan Nacional de Gerenciamiento de Desechos Líquidos y Aguas Servidas, que contemple.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Generalidades sobre fenoles**

Los fenoles son compuestos orgánicos de fórmula general  $ArOH$ , donde  $Ar$  corresponde a un compuesto aromático que puede tener sustituyentes. Los fenoles difieren de los alcoholes, porque tienen el grupo  $-OH$  directamente unido al anillo aromático. Los fenoles son mucho más ácidos que los

alcoholes y la consecuencia práctica de esta acidez es que los fenoles son solubles en hidróxido de sodio acuoso diluido, y son insolubles en disoluciones de carbonato sódico<sup>(57)</sup>. De este modo, con frecuencia es posible separar un componente fenólico de una mezcla de compuestos por medio de una simple extracción con disolvente acuoso básico y posterior reacidificación<sup>(90)</sup>. En general, los fenoles se nombran como derivados del miembro más sencillo de la familia, el fenol, aunque ocasionalmente se les denomina como hidroxicompuestos.

### 2.1.1. Fenol

El fenol es un compuesto orgánico tóxico, que se caracteriza por la presencia de un grupo hidroxilo (OH) en su anillo bencénico<sup>(88)</sup> esta estructura básica forma una variedad de compuestos orgánicos sintéticos<sup>(10)</sup>.

### 2.1.2. Sinónimos

Ácido carbólico, ácido fénico, ácido fenílico, ácido fenólico, alcohol fenílico, alcohol fenilo, bencenol, benzafenol, fenil hidrato, hidroxibenceno, hidróxido fenilo, izal, monofenol, monohidroxibenceno, oxibenceno, phenol (Inglés), venzénol (Francés), steinkohlenkreosot (Alemania)<sup>(70,29)</sup>.

### 2.1.3. Descripción

En 1834, el químico alemán Ruge, aisló el fenol del alquitrán de hulla, y lo llamó karbolsaure (ácido carbólico o ácido de keroseno), aunque su composición no fuera conocida hasta 1841<sup>(20)</sup>.

Cuando el fenol se encuentra puro, se trata de un sólido cristalino entre incoloro y blanco, que posee un olor característico dulce y alquitranado; a temperatura ambiente se encuentra también como un polvo blanco; en contacto con el aire, sus cristales son altamente higroscópicos y toman una coloración entre rosada y rojiza. El producto comercial es una solución de fenol en agua, densa y almibarada. El contenido mínimo de fenol detectable por el olfato humano en el aire es de  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , y en el agua es de  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Estos niveles son inferiores al contenido de peligro para la salud, lo que ayuda a prevenir el riesgo de exposición severa. El fenol es un reactivo inflamable, altamente corrosivo. El fenol es moderadamente volátil a

temperatura ambiente (se evapora con mayor lentitud que el agua). Es soluble en alcohol, glicerol, petróleo y una cantidad moderada del mismo puede solubilizarse con agua; a temperaturas por encima de 68°C, el fenol es completamente soluble en agua y en otros solventes polares <sup>(70,89)</sup>. La solubilidad del fenol en agua es de 6.6%, probablemente por la formación de puentes de hidrógeno <sup>(90)</sup> entre el agua y el grupo –OH del fenol.

#### 2.1.4. Propiedades

##### 2.1.4.1. Propiedades físicas

Tabla 1: Propiedades físicas del fenol

Propiedad	Valor
Peso molecular (g/mol)	94.11
Estado físico	Sólido
Punto de ebullición (°C)	181.75
Punto de fusión (°C)	43 40.91 (material ultra puro)
Presión de vapor (mm Hg)	0.357 a 20 °C 2.48 a 50 °C 41.3 a 100 °C
Gravedad específica (Agua=1)	1.0545 a 45 °C
Densidad del vapor (Aire=1)	3.24
Solubilidad en agua (g/mL)	0.067 a 16 °C
Límite de inflamabilidad (% vol.)	1.7 – 8.6
Temperatura de auto ignición (°C)	715
pH	4.8 – 6.0 al 5% en agua
Coefficiente de reparto octanol/agua como log Pow	1.46

Fuente: Consejería de Sanidad, 2007

#### 2.1.4.2. Propiedades químicas

El fenol posee en su estructura un anillo bencénico y tiene un grupo hidroxilo en lugar de un hidrógeno propio del benceno ( $C_6H_6$ ). El fenol tiene la siguiente fórmula  $C_6H_5OH$  <sup>(69,70)</sup>.

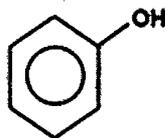


Figura 1: Estructura química del fenol <sup>(70)</sup>.

Gracias a la presencia del anillo bencénico dentro de su estructura, el fenol posee la capacidad de estabilizarse. Esta posibilidad de estabilización del fenol hace que pueda perder con relativa facilidad el hidrógeno de su grupo hidroxilo, haciendo que se comporte como un ácido débil. En presencia de grupos electrofílicos (orientadores-meta) se enfatizan las propiedades ácidas del fenol.

El fenol es sensible a agentes oxidantes. La escisión del átomo de hidrógeno perteneciente al grupo hidroxilo del fenol, es sucedida por la estabilización por resonancia del radical fenoxilo resultante. El radical así formado puede continuar oxidándose con facilidad; el manejo de las condiciones de oxidación y del tipo de agente oxidante empleado, puede conllevar a la formación de productos tales como dihidroxibenceno, trioxibenceno y/o quinonas. Las propiedades químicas mencionadas, hacen del fenol un buen antioxidante, que actúa como un agente de captura de radicales.

El fenol es un material combustible en sí mismo, que se quema en presencia de oxígeno, y puede producir monóxido de carbono (CO) como producto de combustión incompleta, el cual es un gas tóxico <sup>(67)</sup>.

#### 2.1.5. Toxicidad del fenol

El fenol es un compuesto tóxico que tiene impactos negativos en la flora y fauna. Además el fenol es un compuesto tóxico para el ser humano ya que

estas afectan las funciones vitales. También es la causa de problemas de sabor y olor en agua potable en concentraciones bajas <sup>(70,13)</sup>.

En aguas muy contaminadas el fenol puede encontrarse desde concentraciones de 1.5 mg/L a 4.5 mg/L. El fenol es muy tóxico para peces y letal a concentraciones de 5 <sup>(69)</sup> a 20 mg/L, sin embargo a concentraciones bajas de 0.1 mg/L el agua que rodea afecta el sabor del pescado <sup>(45,60)</sup>. Por otro lado, la Agencia de Protección Medio Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) considera a nueve los fenoles contaminantes prioritarios y los califica como químicos persistentes y bioacumulativos <sup>(70)</sup>.

Tabla 2: Compuestos fenólicos clasificados por la EPA

Puesto	Nombre del compuesto	Puntaje total
31	Pentaclorofenol	1028
85	Fenol	804
94	2,4,6-triclorofenol	780
115	2,4,5-triclorofenol	754
121	2,4-dinitrofenol	735
130	2,4-dimetilfenol	708
143	Tetraclorofenol	662
243	2,4-diclorofenol	507
245	2-clorofenol	493

Fuente: Hernandez Flores, 2008

## 2.2. Fuentes de generación y eliminación del fenol en aguas residuales

El fenol y derivados están presentes en los efluentes de numerosas industrias, entre las que destacan las siguientes: química (detergentes, colorantes, pesticidas, explosivos, producción de resinas, nylon, plastificantes, desinfectantes, biocidas, drogas, aditivos para aceites), petroquímica (refinado del petróleo), farmacéutica, galvánica, textil, agroalimentaria (vinícola, oleica), forestal (papel, pulpa), siderúrgica y fotográfica (reveladores), entre otras <sup>(2,21,23,24,45,64)</sup>.

El tratamiento de efluentes para la eliminación del fenol y derivados, son mediante procesos químicos, físicos y biológicos <sup>(2,23,24)</sup>.

#### Procesos químicos.

- Oxidación húmeda.
- Oxidación electroquímica.
- Degradación sonoquímica.

#### Procesos físicos.

- Adsorción: Adsorción sobre carbón activo, adsorción sobre resinas por intercambio iónico.
- Extracción.
- Tecnología de membranas.

#### Tratamientos biológicos

- Degradación por enzimas.
- Degradación por cultivo de algas.
- Degradación por plantas.
- Degradación por microorganismos.

### 2.3. Biodegradación del fenol por microorganismos

La degradación del fenol ocurre como resultado del aislamiento, adaptación y enriquecimiento de un gran número de microorganismos que son capaces de crecer a expensas de este compuesto aromático como fuente de carbono y energía, en el que se encuentran bacterias aerobias y anaerobias facultativas aisladas del suelo, como algunas levaduras y ciertos hongos <sup>(6)</sup>. A continuación se tienen algunas especies bacterianas que han sido utilizadas en la degradación del fenol, como: *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Achromobacter sp*, *Fusarium sp*, *Phanerocheate chrysosporium*, *Coriouis versicolor*, *Ralstonia sp*, *Streptomyces sp*,<sup>(70)</sup> *Acinetobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas cepacia G4* también conocido como *Burkholderia cepacia G4*, *Pseudomonas picketti*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas resinovorans*, *Pseudomonas pictorum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter sp*, *Ralstonia eutropha*, *Nocardioidees*, *Arthrobacter* como *Desulfobacterium phenolicum sp*. Así mismo, también se han utilizado las siguientes levaduras en la degradación del fenol como la *Candida tropicalis*, *Fusarium flocciferium* y *Trichosporon cutaneum* <sup>(1)</sup>.

Entre todos los microorganismos enumerados, como buenos degradadores de fenol, destacan el género *Pseudomonas*<sup>(10)</sup> por su capacidad degradativa de compuestos aromáticos, por lo que estas bacterias tienen una aplicación ambiental en la biorremediación y control biológico, donde el proceso de biodegradación del fenol ocurre por mecanismos enzimáticos. Así pues, se obtienen mayor eficiencia de degradación cuando los microorganismos son inmovilizados<sup>(3)</sup>. A continuación se tienen algunas ventajas del uso de los microorganismos en la biodegradación del fenol.

Tabla 3: Ventajas del uso de microorganismos en tratamientos biológicos

Ventajas del empleo de microorganismos en procesos de biodegradación
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altos rendimientos para pequeñas concentraciones de contaminantes.</li> <li>- Permite la completa mineralización.</li> <li>- No son perjudiciales para el medio ambiente.</li> <li>- No presentan costos elevados.</li> </ul>

Fuente: Bódalo y otros, 2006.

### 2.3.1. El género *Pseudomonas*

*Pseudomonas* literalmente significa “falsa unidad”, derivado del griego pseudo =“falso” y monas =“una sola unidad”.

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se encuentra dentro del orden *Pseudomonadales*.

Las *Pseudomonas* son “células en forma de bastón, curvadas o derechas, pero no helicoidales, de 0.5 - 1 µm de diámetro por 1.5 - 5 µm de longitud”. El desarrollo de técnicas como la hibridación ADN/ADN o ARNr/ADN han permitido una clara visión de las especies de *Pseudomonas*<sup>(76)</sup>. Siguiendo esta última clasificación, Palleroni propuso cinco grupos taxonómicos (ARN-I a ARN-V). Más tarde, la secuenciación del ARNr 16S reflejó la diversidad de estos grupos, siendo finalmente ARN-I, dentro de la subclase-γ de *Proteobacterias*, el que a día de hoy se reconoce como el que engloba a las verdaderas *Pseudomonas*<sup>(76)</sup>.

Tabla 4: Especies de *Pseudomonas* agrupadas según el grado de identidad de sus ARNr. Los grupos II, III, IV y V, actualmente están ubicados en nuevos géneros de *alpha proteobacteria*.

Grupos	Especies Integrantes
I	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. chlororaphis</i> , <i>P. syringae</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. agarici</i> , <i>P. angulata</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. synxantha</i> , <i>P. taetrolens</i> , <i>P. mucidolens</i> , <i>P. oleovorans</i> , <i>P. resinovorans</i> .
II	<i>P. (Burkholderia) cepacia</i> , <i>P. gladioli</i> , <i>P. caryophylli</i> , <i>P. (Alcaligenes) pseudomallei</i> , <i>P. mallei</i> , <i>P. (Ralstonia) solanacearum</i> , <i>P. (Ralstonia) pickettii</i> , <i>P. pyrrocinia</i> , <i>P. andropogonis</i> .
III	<i>P. (Comamonas) acidovorans</i> , <i>P. (Comamonas) testosteroni</i> , <i>P. saccharophila</i> , <i>P. facilis</i> , <i>P. delafieldii</i> , <i>P. alboprecipitans</i> , <i>P. palleronii</i> .
IV	<i>P. diminuta</i> , <i>P. vesicularis</i>
V	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>X. (Xanthomonas) maltophilia</i> , <i>P. geniculata</i> , <i>P. gardneri</i> .

Fuente: Lacal, 2008

Las *Pseudomonas* son Gram – negativas, generalmente móviles y presentan uno o varios flagelos polares, aunque también se han descrito flagelos laterales más cortos. Son de metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, aunque pueden producir ligeras cantidades de ácido a partir de la glucosa en aerobiosis, utilizan compuestos orgánicos de bajo peso molecular pero no polímeros; algunos son quimiolitótrofos, utilizan H<sub>2</sub> ó CO<sub>2</sub> como único donador de electrones, algunos utilizan nitrato como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia. Todas las *Pseudomonas* tienen un ciclo de los ácidos tricarbónicos funcional y pueden oxidar sustratos completamente a CO<sub>2</sub>. Las *Pseudomonas* tienen requerimientos nutritivos muy simples. En el laboratorio se pueden cultivar en medio mínimo con alguna materia orgánica en solución como fuente de carbono, a pH neutro, temperaturas del intervalo mesófilo (28 - 40°C) y en general, sin añadir factores de crecimiento <sup>(62,78)</sup>. La especie *Pseudomonas* tiene un hábitat de crecimiento en un rango de temperatura de 4 – 42 °C, un pH comprendido entre 4-8 <sup>(84)</sup>.

En el grupo ARN-I, se encuentran el sub grupo fluorescente, estas *Pseudomonas* no acumula PHB (poli  $\beta$  – hidroxibutirato) y produce un pigmento pioverdina (verde amarillento), difusivo e hidrosoluble, que da fluorescencia verde azulada bajo luz ultra violeta de longitud de onda larga (254 nm). La producción de pigmentos fluorescentes aumenta sobre todo en los medios con alta concentración de fosfato <sup>(53,78)</sup>. A este grupo pertenecen *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, y *P. alcaligenes*. Sólo los tres primeros miembros de este grupo producen pioverdina, aunque sólo la especie de *P. aeruginosa*, produce el pigmento hidrosoluble azul definido piocianina, y los tres restantes no producen pigmentación (la producción de pigmentos puede demostrarse cuando se cultiva en medio de King A; denominado agar P: producción de piocianina y King B; denominado agar F: producción de pioverdina) <sup>(78)</sup>.

Otros pigmentos producidos por otras especies del género son la pio rubina (*P. aeruginosa*, color rojo similar al óxido), oxiclolorafina (*P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, color naranja), y la clorafina (*P. chlororaphis*, color verde), entre otros. Muchos de estos pigmentos actúan como sideróforos en los sistemas bacterianos de captación de hierro. La producción de pigmentos puede demostrarse cultivando los microorganismos en medio de King B donde no contiene hierro. Las cepas no pigmentadas presentan un color gris pálido. Cuando crecen en agar sangre, normalmente presentan hemólisis <sup>(84)</sup>.

#### **2.3.1.1. Ecología**

El genoma de cinco especies diferentes de *Pseudomonas* se ha secuenciado recientemente y han revelado que todas ellas comparten un conjunto de 2000 genes de un total de 5000 a 6000 genes presentes en sus correspondientes genomas <sup>(32)</sup>. Además se han descrito que alrededor de 60 especies que poseen una extraordinaria versatilidad metabólica, y se caracterizan por su amplia distribución en el medio ambiente, habiéndose aislado de plantas, suelos limpios y contaminados, de aguas continentales y marinas. La ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes, refleja un sistema de adaptación al medio ambiente que no se encuentra en otras bacterias. Por ello se considera a las bacterias del

género *Pseudomonas*, un paradigma de versatilidad metabólica <sup>(85)</sup>, como microorganismos clave, en el reciclado de materia orgánica en los compartimientos aerobios de los ecosistemas, jugando un papel esencial en la mejora y el mantenimiento de la calidad medioambiental.

Las *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar frente a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente, donde muestran una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas. Así pues, se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, los cuales les permiten explorar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizadores cambiantes y nichos que difícilmente son colonizables, donde obtienen una degradación parcial o total de estos contaminantes hasta conseguir su destrucción o conversión en productos menos dañinos. Este procedimiento es conocido como biorremediación. Entre los compuestos orgánicos que son capaces de metabolizar se encuentran hidratos de carbono, hidrocarburos lineales y aromáticos, ácidos alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, compuestos aromáticos (con diferentes grupos funcionales, como: -OH, -Cl, -NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub> y -SO<sub>3</sub>) y alcoholes <sup>(32,40,56)</sup>. La capacidad de utilizar los compuestos aromáticos es particularmente interesante, dadas las distintas rutas por las cuales las *Pseudomonas* son capaces de metabolizar, por lo tanto, estas hacen su posible utilización en los procesos de descontaminación y biocatálisis <sup>(40)</sup>.

#### 2.3.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

En 1872 fue aislada por primera vez por Schroeter, a partir de muestras ambientales. La denominación de aeruginosa deriva de la palabra aeruginoso (aeruginous) que significa "el color del cobre oxidado" <sup>(75)</sup>. Es un aerobio estricto, algunas cepas pueden crecer anaeróbicamente mediante desnitrificación o mediante la fermentación de compuestos como la arginina o el piruvato <sup>(84)</sup>. Crece con facilidad en los medios de cultivo y produce en ocasiones un olor dulzón a uvas. Se desarrolla a temperaturas de 10-2 °C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37 °C. Algunas cepas producen hemólisis. Las mismas emiten

pigmentos de fenazina en agar nutritivo, después de 24 horas de incubación a 37 °C y posteriormente a temperatura ambiente; los mismos pueden ser azul (piocianina), amarillo verdoso (pioverdina), rojo (piorubina) y negro (piomelanina). Existe aproximadamente, un 10 % de *Pseudomonas aeruginosa* que son apigmentadas <sup>(53)</sup>.

Los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* pueden mostrar varios tipos de colonias: lisas, rugosas, mucoides, redondas, alargadas, con pigmento verde metálico y olor dulzón, que presentan características bioquímicas enzimáticas particulares con susceptibilidades antimicrobiana diferentes.

Las *Pseudomonas aeruginosa* generan numerosos exoproductos, incluyendo proteasas, hemolisinas, ramnolípidos y derivados de fenazina, factores potencialmente citotóxicos que aumentan su competitividad y supervivencia. Por ejemplo, el metabolito secundario soluble en agua piocianina (1-hidroxi-5-metil-fenazina) ha mostrado actividad antimicrobiana contra una gran variedad de microorganismos. El estrés por nutrientes induce en *Pseudomonas* algunos cambios morfológicos y bioquímicos, que en condiciones limitantes de crecimiento, la bacteria expresa mecanismos de protección, permitiendo a las células sobrevivir a desafíos ambientales <sup>(65)</sup>.

#### **2.3.1.2.1. Características de la *Pseudomonas aeruginosa***

En la figura 2 se observa la intensidad del ancho de los grupos funcionales presentes en *Pseudomonas aeruginosa*, para una banda de absorción de 3550 a 3200  $\text{cm}^{-1}$ , se encuentran los grupos funcionales de: -OH, -NH y  $-\text{NH}_3^+$ . En la banda de 3150 a 3080  $\text{cm}^{-1}$ , se encuentran los grupos funcionales de -CH y -OH. En los picos altos de 1690 a 1620  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al grupo C=O, donde la banda de ensanchamiento terminal corresponde al grupo  $\text{COO}^-$  y a los diferentes grupos CONH. Los picos correspondientes de 1100 - 1020  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a enlaces de C-O y -OH de la banda. La *Pseudomonas aeruginosa* contiene a los elementos: 41.6% C, 18.5% S, 8.09% N, 4.72% H y 0.47% P. Además contiene 14 aminoácidos, que son: histidina, ácido aspártico, alanina, glicina, ácido glutámico, isoleucina,

metionina, arginina, licina, fenilalanina, treonina, cistina, serina y valina con 44.39, 31.28, 27.61, 16.66, 12.35, 5.62, 5.02, 4.76, 4.22, 2.2, 1.96, 0.63, 0.43 y 0.024 mg/L respectivamente. La superficie celular de la *Pseudomonas aeruginosa* contiene COOH, NH<sub>2</sub> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (101).

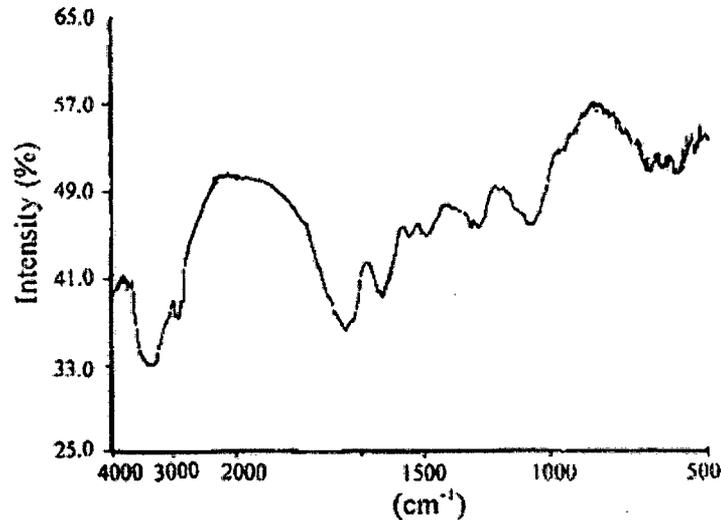


Figura 2: Espectro de infrarrojo de *Pseudomonas aeruginosa*

Fuente: Zanaty et al., 2006.

### 2.3.2. Mecanismo de la Biodegradación del fenol

En el estudio del mecanismo de la biodegradación de compuestos aromáticos por bacterias es necesario conocer los distintos procesos o etapas, mediante los cuales el compuesto se incorpora al metabolismo celular y se transforma en intermediarios de las rutas centrales. Ello implica un conocimiento profundo a) del sistema de transporte a través de la membrana plasmática b) del sistema de hidroxilación y escisión del anillo aromático c) de la ruta seguida en su transformación y su relación con otras rutas metabólicas y d) de los mecanismos de control de los procesos anteriores. La degradación del compuesto aromático puede darse con presencia o ausencia de oxígeno, siendo el catabolismo aerobio el más estudiado (24).

### 2.3.2.1. Ruta catabólica aerobia

Los microorganismos asimilan los compuestos aromáticos mediante vías catabólicas, que convergen en las rutas centrales del metabolismo. En el que existen dos tipos de procesos al inicio de las rutas degradativas en condiciones aerobias que son comunes a todos los compuestos aromáticos:

- Hidroxilación del anillo aromático: Se basa en la desestabilización de la molécula mediante rutas periféricas que incorporan grupos hidroxilo en el anillo. La adición de estos grupos provoca una desestabilización electrónica en el anillo, que ve alterado el número de sus pares de electrones libres y por tanto se vuelve más inestable a la par que reactivo.
- Escisión del anillo bencénico: El compuesto aromático es sustrato de oxigenasas que catalizan la apertura del anillo mediante la adición de oxígeno.

En general ambos tipos de reacciones están catalizadas por enzimas oxigenasas que introducen al oxígeno molecular al sustrato orgánico, estas enzimas se clasifican en monooxigenasa o hidroxilasa y dioxigenasas en función de que incorporen uno o dos grupo hidroxilo, respectivamente. La acción conjunta de las dos enzimas originan la pérdida de aromaticidad del compuesto y hace posible la posterior utilización del carbono contenido en su estructura cíclica saturada mediante la intervención de otras enzimas. Generalmente, los productos de rotura son metabolizados hasta compuestos intermediarios del ciclo de Krebs, con la formación del CO<sub>2</sub>, metabolitos y energía. Con la siguiente reacción.



Una característica esencial para que un compuesto aromático sea escindido por las dioxigenasas es la presencia de, al menos, dos grupos hidroxilo en posición *orto* ó *para*. Los organismos procariotas pueden

metabolizar el fenol a través de la ruta del catecol (escisión *orto* y escisión *meta*)<sup>(64,93)</sup>.

En la mayoría de las especies de *Pseudomonas* se presenta la ruta de escisión del meta-catecol, para metabolizar el fenol. Sin embargo en algunas bacterias de la especie *Pseudomonas putida* se presenta las dos rutas para la degradación del catecol, en condiciones aerobias<sup>(77)</sup>.

### **2.3.2.2. Escisión orto ó ruta del $\beta$ -cetoadipato**

El primer mecanismo de la escisión orto, en condiciones aerobias de la degradación microbiana del fenol se inicia con la oxigenación del anillo aromático, que inicialmente es un monohidroxil que se hidroxila por una monooxigenasa en la posición orto del fenol para formar el catecol<sup>(6)</sup> en las posiciones 1 - 2, en el que se forman los grupos OH (intradiol)<sup>(8,43,70)</sup>. La hidroxilasa de fenol es estrictamente dependiente de la presencia del NAPH<sup>(22)</sup>.

Además se producen diferentes reacciones oxigenolíticas, para el catecol como el cis, cis-muconato, mucolactona (mediante la enzima lactonizante del muconato),  $\gamma$ -cetoadipato enol-lactona (mediante la mucolactona isomerasa), el cual es transformado a  $\beta$ -cetoadipato (mediante el  $\gamma$ -cetoadipato enol-lactona hidrolasa). Finalmente, este genera como productos succinato y acetil CoA (figura 3), que entra en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos<sup>(1,6,8,93)</sup>.

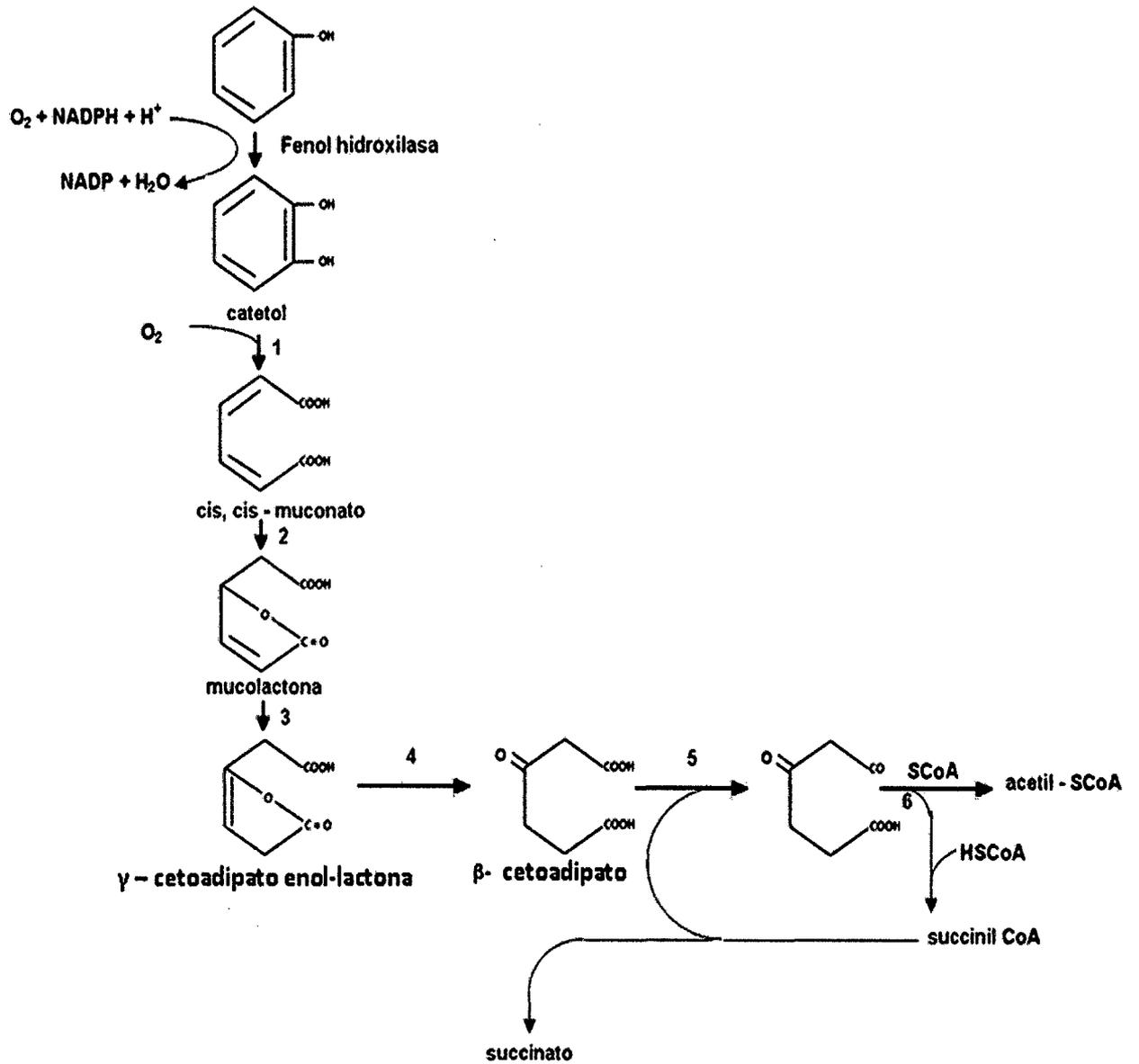


Figura 3: Escisión del orto catecol. 1: Catecol 1,2 – dioxigenasa, 2: Enzima lactonizante del muconato, 3: Mucolactona isomerasa, 4:  $\gamma$  – cetoadipato enol – lactona hidrolasa, 5:  $\beta$  – cetoadipato succinil – CoA transferasa, 6:  $\beta$  – cetoadipato – CoA tiolasa.

Reacción: fenol +  $O_2$  +  $NADPH + H^+$   $\longrightarrow$   $NADP^+ + H_2O +$  catecol.

Fuente: Suárez, 1993; y Indu et al., 2008.

### 2.3.2.3. Escisión meta

El segundo mecanismo es la escisión meta que se encuentra en varias especies de *Pseudomonas*, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, su metabolismo lo desarrolla por la ruta del meta catecol<sup>(37)</sup>. En el catecol se produce una ruptura en el carbono portador del OH y el carbono adyacente (extradiol). La escisión se realiza en los carbonos 2 y 3 para la formación del semialdehído 2- hidroximucónico, este puede seguir dos rutas que llegan a la formación de un mismo compuesto del 2-oxo-penta-4-enoato, el que se hidroliza para formar el 4-hidroxi-2-oxo-valerato, este a su vez forma el acetaldehído y el piruvato (mediante la presencia de una aldosa)<sup>(8,93)</sup>, obsérvese en la figura 4, donde este último compuesto es un precursor clave en la incorporación del ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) o ciclo de Krebs<sup>(22)</sup>.

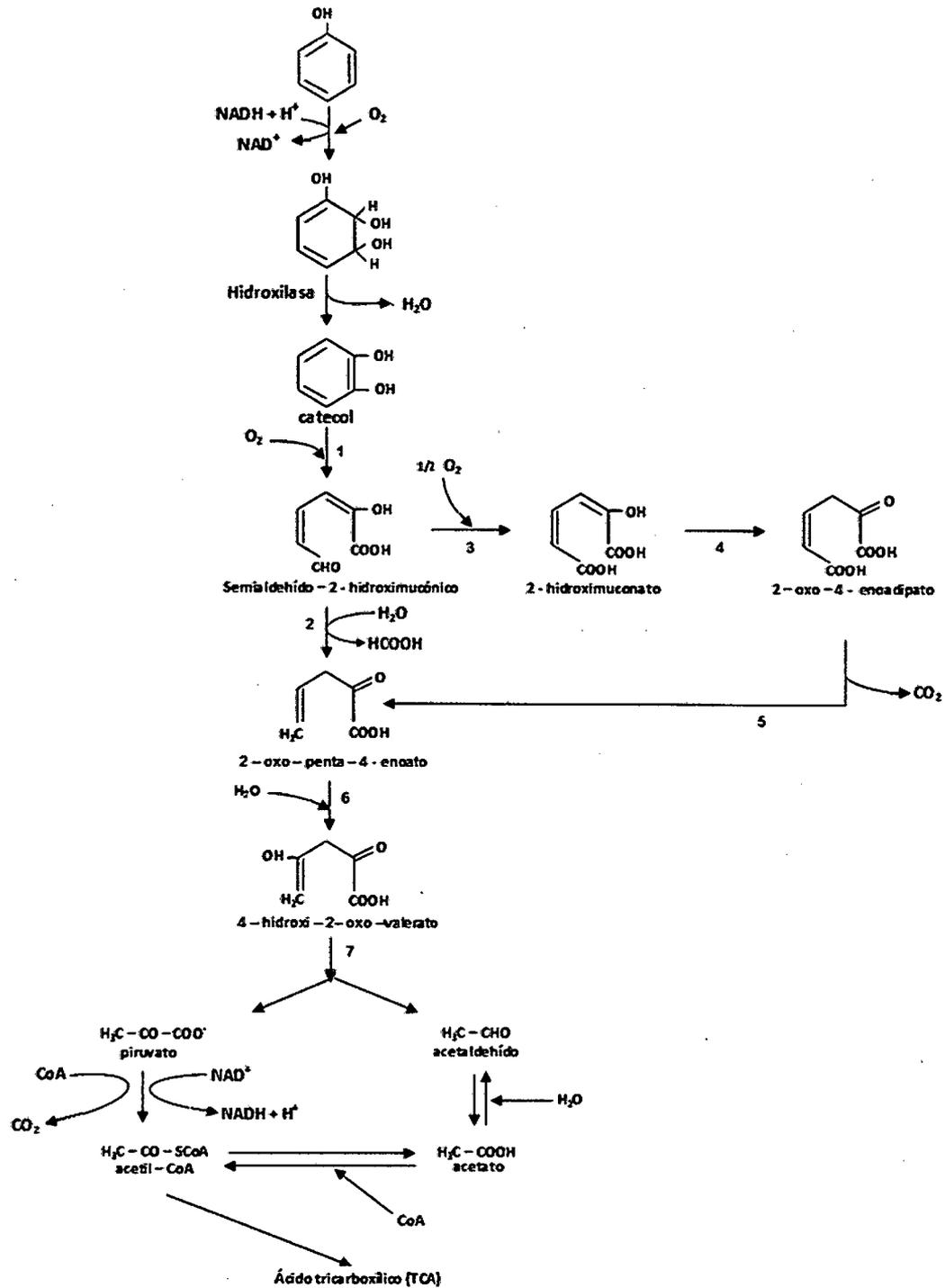


Figura 4: Escisión meta catecol. 1: Catecol 1,2 - dioxigenasa, 2: Hidrolasa, 3: Deshidrogenasa, 4: Isomerasa, 5: Decarboxilasa, 6: Hidratasa, 7: Aldosa. Fuente: Agarry & Solomon, 2008; Suárez, 1993; y El-Sayed et al., 2003

### **2.3.3. Inmovilización**

La inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada.

Es un evento que se da naturalmente gracias a procesos de adherencia a superficies o a otros microorganismos, debido a estructuras celulares ó a sustancias que estos mismos segregan. De forma artificial o inducida, puede darse por atrapamiento en los espacios o poros de fibras y geles, entre muchos.

El uso de células inmovilizadas permite la operación de biorreactores a velocidades de flujo que son independientes de la velocidad de crecimiento empleadas. La estabilidad catalítica puede ser mayor para células inmovilizadas que para células libres y algunos microorganismos inmovilizados toleran concentraciones más altas de compuestos tóxicos que su contraparte no inmovilizada <sup>(41,59)</sup>.

La inmovilización permite crear un microclima que aumenta la estabilidad térmica, resistencia a la variación del pH, e influencia de algunos reactivos químicos <sup>(54)</sup>.

#### **2.3.3.1. Ventajas de la inmovilización de células**

La inmovilización de diferentes microorganismos en diversos soportes que van desde los biodegradables como residuos orgánicos o agroindustriales, hasta aquellos de difícil o nula degradación como plásticos y fibras de vidrio han permitido el interés y el desarrollo de nuevas tecnologías debido a algunas ventajas que presentan como son:

- Concentración de biomasa
- Actividad metabólica
- Resistencia a la toxicidad.

### 2.3.3.2. Encapsulamiento en geles de alginato de calcio

#### 2.3.3.2.1. Alginato

Alginato término genérico que se utilizá para denominar a las sales y derivados del ácido algínico. Este polisacárido se presenta como una mezcla de sales insolubles de calcio, sodio, potasio y magnesio en las algas marrones (*Phaeophyta*)<sup>(5,95)</sup>.

El alginato, en forma de sal sódica, potásica o magnésica, es soluble en soluciones acuosas a pH mayores de 3.5<sup>(97)</sup>. También es soluble en mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles con ella, como el alcohol, pero es insoluble en leche, por la presencia de calcio. La viscosidad de las soluciones de alginato depende de la concentración (elevándose mucho a partir del 2%) y temperatura (disminuye al aumentar ésta). Las soluciones de alginato tienen un comportamiento no newtoniano, con una viscosidad que disminuye mucho al aumentar la velocidad de corte. En ausencia de calcio, la molécula de alginato se pliega formando hélices mantenidas por puentes de hidrógeno<sup>(30)</sup>.

#### 2.3.3.2.2. Estructura química del alginato

Los alginatos son polímeros cuyas unidades monoméricas son los ácidos urónicos (azúcares donde el grupo CH<sub>2</sub>OH del C6 ha sido reemplazado por un grupo COOH), de unidades: ácido β-D-Manurónico (M) y ácido α-L-Glucurónico (G)<sup>(50,81,86,95)</sup>, obsérvese en la figura 5, estructurado en secuencias de bloques MM, MG unidos por enlaces β-(1-4), y bloques GG, GM unidos por enlaces α-(1-4)<sup>(82)</sup>, obsérvese en la figura 6.

Una macromolécula de ácido algínico tiene un peso molecular de 20000 a 250000; heterosacárido no nitrogenado; copolímero de cadena lineal, de fórmula química (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>)<sub>n</sub>.

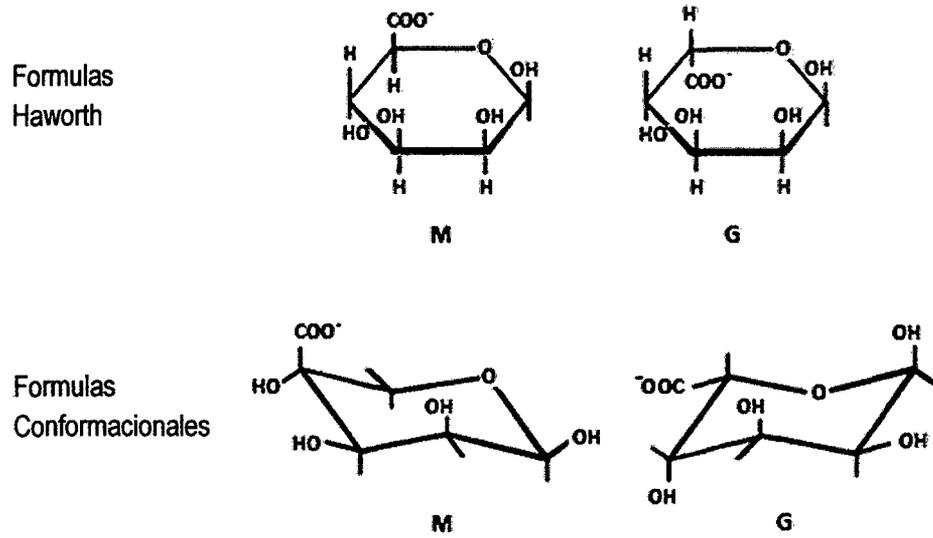


Figura 5: Composición monomérica del ácido alginico. M:  $\beta$ -D-Manurónico, G:  $\alpha$ -L-Glucurónico.

Fuente: Thu et al., 1996.

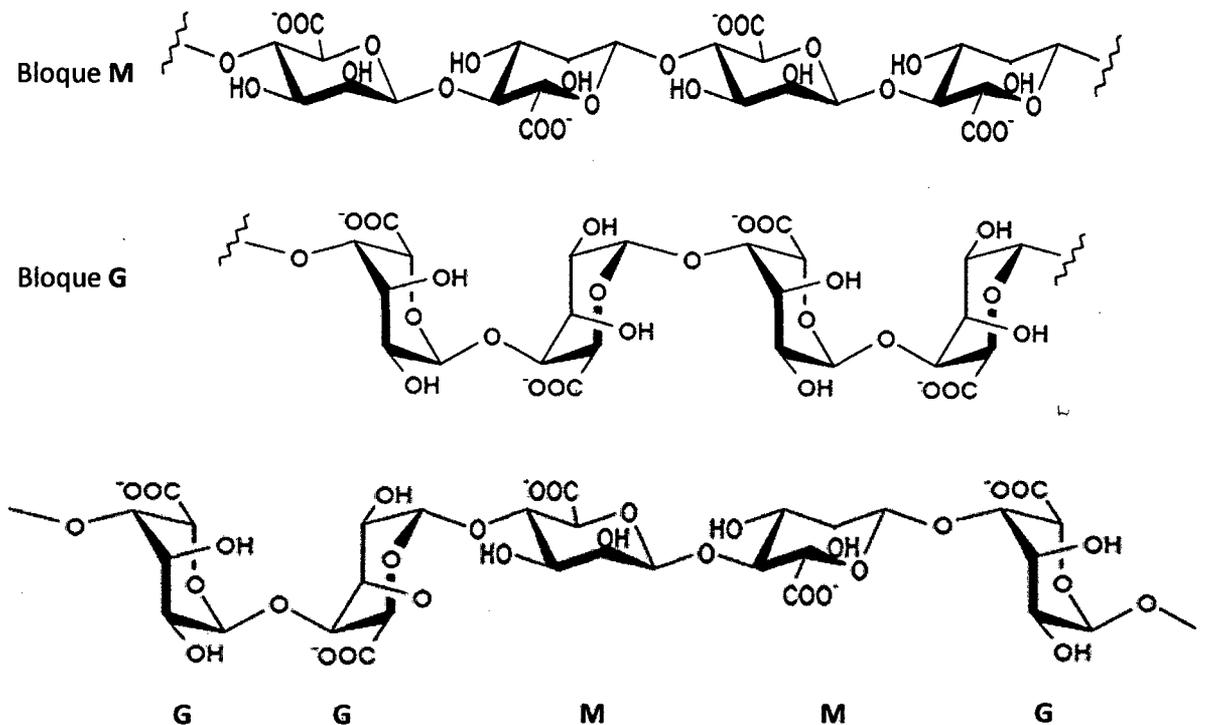


Figura 6: Bloques poliméricos de ácido manurónico (M) y ácido glucurónico (G).

Fuente: Cellesi, 2003; Thu et al., 1996, y Seira, 2008.

### 2.3.3.2.3. Formación del gel

Una propiedad interesante de los alginatos es su capacidad para dar geles de texturas muy variadas según el número de zonas de unión entre las macromoléculas.

El fenómeno de gelificación es el resultado de asociaciones intermoleculares, que en el caso de los alginatos no puede llevarse a cabo sin la intervención de reactivos susceptibles de neutralizar las cargas repulsivas de los carboxilatos. La aproximación o apilamiento de cadenas podrá realizarse fácilmente por acidificación del medio o por adición de diversos cationes di o polivalentes de los que el calcio es sin duda el más utilizado.

Para obtener un gel de una textura conveniente es importante que el número de zonas de unión creadas por el reactivo reticulante esté comprendido dentro de ciertos límites, ya que una cantidad insuficiente de reticulante se traducirá en un simple aumento de la pseudo plasticidad de la solución y un exceso conducirá a la precipitación coloide.

En los geles de alginato los segmentos homogéneos constituyen las zonas de unión intermolecular. Los iones calcio intervienen para ligar las cadenas paralelas; mediante la interacción de un ión calcio con dos grupos carboxilo<sup>(68)</sup>, figura 7.

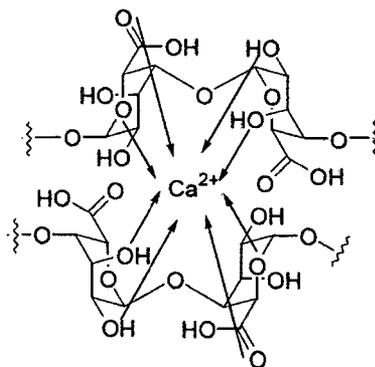


Figura 7: Estructura conformacional: Diagrama representativo de la interacción del ion calcio con los segmentos poliglucurónicos para la formación del gel alginato de calcio.

Fuente: B. Pharm, 2005.

El mecanismo de gelidificación es por apilamiento de cadenas que corresponden a un modelo en caja de huevos (figura 8) que se basa en las diferencias de conformación de los tres tipos de secuencias de bloques: poliglucurónicas, polimánurónicas o mixtas. La conformación de las secuencias glucurónicas es tal, que pueden presentar una sucesión de cavidades electronegativas, cuyo tamaño y geometría permiten la fijación de uniones calcio. Se trata de un fenómeno de cooperación de apilamiento regular de las cadenas, y es capaz de ligar muy fuertemente al calcio, como los huevos en sus cajas <sup>(68)</sup>.

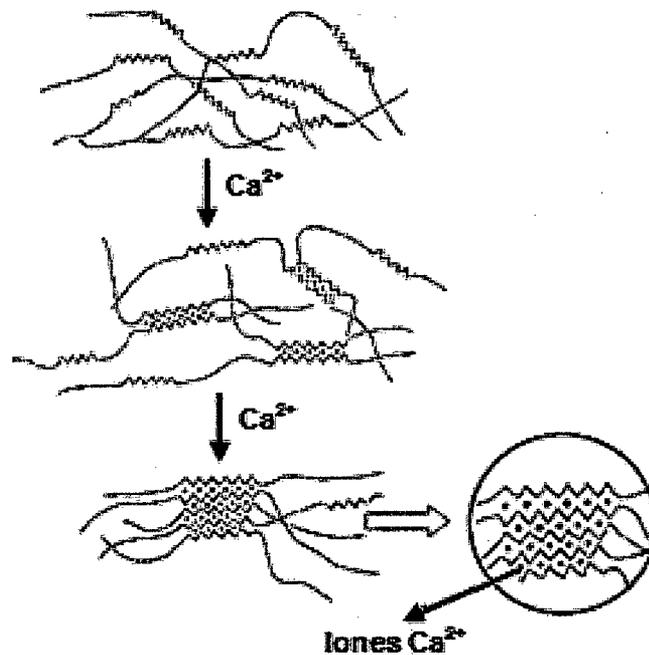


Figura 8: Estructura del alginato de calcio.

Fuente: Valero, 2009.

#### 2.4. Modelos teóricos

La cuantificación de adsorción-biodegradación del fenol en equilibrio, está fundamentada por la siguiente ecuación <sup>(4)</sup>.

$$q_e = \frac{V(C_i - C_f)}{S} \quad [2.1]$$

Donde:

V: Es el volumen de la solución en contacto (batch): [L].

$C_i$  y  $C_f$ : Es la concentración inicial y final (equilibrio), respectivamente: [mg/L].

S: Peso de la biomasa: [g].

$q_e$ : Es la cantidad de fenol adsorbido-biodegradado en el equilibrio: [mg/g].

#### **Determinación de la concentración del fenol.**

La no adsorción y la no degradación del fenol están cuantificadas por el método de espectrofotometría. La cantidad de fenol adsorbido-degradado en un tiempo  $t$ , está calculado por la siguiente ecuación.

$$q_t = \frac{V(C_i - C_f)}{S} \quad [2.2]$$

Donde:

$q_t$ : Es la cantidad de fenol adsorbido-biodegradado en un instante  $t$ : [mg/g].

#### **2.4.1. Modelos de Isotermas**

Las isotermas representan el equilibrio de distribución de la concentración del soluto entre la fase sólida (biomasa inmovilizada) y la fase líquida.

El equilibrio de adsorción en las isotermas es fundamental e importante en el diseño del sistema de adsorción. Los datos de la adsorción y biodegradación en equilibrio pueden convenientemente ser caracterizados por isotermas de adsorción que es una ayuda en la determinación de la capacidad de adsorción de un material adsorbente <sup>(3)</sup> como la matriz inmovilizada de alginato de calcio.

Así se aplicaron las isotermas de Langmuir, Freundlich y Redlich-Peterson para la adsorción y biodegradación del fenol por biomasa de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en cáscaras de piña <sup>(4)</sup>.

### 2.4.1.1. Isoterma de Freundlich

La ecuación de Freundlich se considera para una adsorción ideal en superficie de sorbente heterogénea y que las posiciones de sorción tienen distintas afinidades, en primer lugar se ocupan las posiciones de mayor afinidad y posteriormente se va ocupando el resto<sup>(66)</sup>.

El modelo de Freundlich está representado por la siguiente ecuación empírica<sup>(52)</sup>.

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad [2.3]$$

Donde:

$q_e$ : Cantidad de adsorbato adsorbido por la superficie sólida, (mg/g).

$C_e$ : Concentración de adsorbato en el equilibrio de la solución líquida, (mg/L).

$K_F$ : Constante de la capacidad de cuantificación del adsorbente (L/mg).

$1/n$ : Constante de la intensidad de adsorción ( $n > 1$ )<sup>(47)</sup>.

A continuación se tiene la ecuación linealizada de Freundlich.

$$\log q_e = \log K_F + b_F \log C_e \quad b_F = \frac{1}{n}; n \neq 0 \quad [2.4]$$

El valor de  $K_F$  se obtiene por la intersección de la recta de ajuste con el eje de adsorción ( $q_e$ ) (en escala logarítmica) y  $n$  corresponde a la pendiente de dicha recta<sup>(83)</sup>. El valor de  $n > 1$  representa una adsorción favorable<sup>(4)</sup>.

### 2.4.1.2. Isoterma de Langmuir

Es un modelo teórico, el cual describe los datos experimentales producidos en el equilibrio en las superficies homogéneas, se utiliza para estimar la capacidad máxima de adsorción.

El modelo de Langmuir está representado por la siguiente ecuación<sup>(51)</sup>.

$$q_e = \frac{q_{max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad [2.5]$$

Donde:

$q_e$ : Cantidad de adsorbato adsorbido-biodegradado por la superficie sólida (mg/g).

$q_{max}$ : Es la máxima cantidad de fenol adsorbida por unidad de biomasa en la monocapa (mg/g).

$C_e$ : Concentración de adsorbato en el equilibrio (mg/L).

$K_L$ : Constante de adsorción en el equilibrio, relacionado entre la matriz de alginato y la concentración de fenol.

$q_{max}$  representa la capacidad del límite de adsorción. Los parámetros pueden ser determinados por la siguiente ecuación linealizada <sup>(51)</sup>.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{max}K_L} + \frac{C_e}{q_{max}} \quad [2.6]$$

Los datos se obtienen a partir de la gráfica de  $C_e/q_e$  vs.  $C_e$ , siendo la pendiente  $1/q_{max}$  y el intercepto  $1/q_{max}K_L$ .

#### 2.4.2. Balance de masas para un reactor en lotes (batch)

El principio de conservación de masa en un reactor batch, está definido por un volumen constante donde no existe el flujo de entra y de salida del reactor. Por lo que el balance de masa con reacción, está expresada en la siguiente ecuación.

$$\text{Acumulación} = \text{Entrada} - \text{Salida} + \text{Generación}$$

$$\frac{dC}{dt}V = QCo - QC + r_c V \quad [2.7]$$

En vista que  $Q=0$ , la ecuación linealizada resultante para un reactor batch es:

$$C_f = C_i - r_c * t \quad [2.8]$$

El porcentaje de remoción y la eficiencia de adsorción por el adsorbente (matriz de alginato) están determinados por la siguiente ecuación <sup>(27)</sup>.

$$\%remoción = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} * 100 \quad [2.9]$$

Donde:

$C_i$  y  $C_f$ : concentración inicial y final, respectivamente; mg/L.

$t$  : tiempo; h.

$r_c$  : velocidad de reacción;  $h^{-1}$ .

#### 2.4.2.1. Modelos cinéticos en un sistema en lotes (batch)

Tabla 5: Métodos de integración y diferencial empleados para determinar el coeficiente cinético de reacción. Para las reacciones de orden cero, primer orden y segundo orden con ecuaciones [2.10], [2.11], y [2.12], respectivamente.

Expresión de velocidad	Forma integrada	Método empleado para determinar el coeficiente cinético de reacción
Reacción de orden cero		
$r_c = \frac{d[C]}{dt} = -k$	$[C] = [C_o] - k * t$	Representación gráfica de [C] vs. t
Reacción de primer orden		
$r_c = \frac{d[C]}{dt} = -k[C]$	$\ln \left[ \frac{C}{C_o} \right] = -k * t$	Representación gráfica de $-\log [C/C_o]$ vs. t
Reacción de segundo orden		
$r_c = \frac{d[C]}{dt} = -k[C]^2$	$\frac{1}{[C]} - \frac{1}{[C_o]} = k * t$	Representación gráfica de $1/[C]$ vs. t

Fuente: Crites & Tchobanoglous, 2000.

#### 2.4.2.2. Modelos cinéticos de adsorción - biodegradación

La cinética de adsorción - biodegradación ha sido estudiada por su importancia en el tratamiento de aguas residuales de efluentes industriales con contenido de fenol. A continuación, se tienen los siguientes modelos cinéticos de adsorción - biodegradación<sup>(3)</sup>.

#### 2.4.2.2.1. Modelo de pseudo primer orden

En 1898, Lagergren propuso el modelo cinético de primer orden, expresado por la siguiente ecuación:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad [2.13]$$

La ecuación anterior, al ser integrada se tiene la siguiente ecuación,

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1 * t}{2.303} \quad [2.14]$$

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 * t \quad [2.15]$$

Donde:

$k_1$ : Es la constante de adsorción- biodegradación de Lagergren ( $h^{-1}$ ).

$q_e$ : Es la cantidad de fenol adsorbida-biodegradada en el equilibrio (mg/g).

$q_t$ : Es la cantidad de fenol adsorbida-biodegradada en el tiempo (mg/g).

t: Tiempo.

Para hallar la constante  $k_1$ , se grafica el  $\log(q_e - q_t)$  versus tiempo, el valor se obtiene por el intercepto.

#### 2.4.2.2.2. Modelo de pseudo segundo orden

En 1999 Ho & Mckay propusieron el modelo cinético de segundo orden, el que está expresado por la siguiente ecuación.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 * (q_e - q_t)^2 \quad [2.16]$$

Integrando y reordenando, se tiene la siguiente ecuación:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad [2.17]$$

Donde:

$q_t$ : Es la concentración adsorbida-biodegradada en el tiempo (mg/g).

$t$ : Tiempo (h).

$q_e$ : Capacidad de adsorción-biodegradación en equilibrio (mg/g).

$k_2$ : Constante de la ecuación (g/mg-h).

Si el modelo lineal representa un buen ajuste con un coeficiente de correlación  $R^2$  cercano a uno, el proceso de adsorción puede ser descrito como quimiosorción.

La constante  $k_2$ , se obtiene por datos experimentales de la gráfica del intercepto de  $t/q_t$  versus tiempo <sup>(98)</sup>.

#### 2.4.2.2.3. Modelo de transferencia de masa

La ecuación del modelo de transferencia de masa está expresada por la siguiente ecuación:

$$C_{in} - C_t = D * e^{K_o t} \quad [2.18]$$

Donde:

$C_{in}$ : Es la concentración inicial de fenol (mg/dm<sup>3</sup>).

$C_t$ : Es la concentración del fenol para un tiempo  $t$ .

$t$ : Es el tiempo (min).

$D$ : Es un parámetro de ajuste.

$K_o$ : Es la constante de adsorción que está relacionada con el coeficiente de transferencia de masa.

Linearizando la ecuación:

$$\ln(C_o - C_t) = \ln D + K_o t \quad [2.19]$$

La adsorción-biodegradación por el adsorbente se bosqueja por el modelo de transferencia de masa, en la gráfica de  $\ln(C_o - C_t)$  versus

tiempo, se tiene una relación lineal, siendo  $\ln D$  una constante y  $K_0$  es determinada por el intercepto <sup>(51)</sup>.

## **2.5. Diseño experimental: Metodología de superficie respuesta**

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo<sup>(74)</sup>. El propósito inicial de esta técnica es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta <sup>(39)</sup>.

### **2.5.1. Modelos polinomiales aproximados a la respuesta real**

El diseño de superficie respuesta y la estrategia de análisis que supone que la medida de la variable de respuesta  $\mu_y$  está en función de los niveles de factores cuantitativos representados por las variables  $x_1, x_2, \dots, x_k$ . Los modelos polinomiales se usan como aproximaciones prácticas a la función de respuesta verdadera o real. En general, la función real se desconoce y las funciones polinomiales con frecuencia proporcionan buenas aproximaciones en zonas relativamente pequeñas de los niveles de los factores cuantitativo <sup>(55)</sup>.

Los modelos polinomiales comúnmente empleados para el análisis de superficie de respuesta son el modelo lineal o de primer orden y el modelo cuadrático, o de segundo orden.

#### **2.5.1.1. Polinomio de primer orden**

Generalmente se desconoce la relación entre la respuesta y las variables independientes, por ello requieren un modelo que aproxime la relación funcional entre  $\mu_y$  y las variables independientes. Los tipos de diseño más utilizados en esta etapa son:

- Diseños  $2^k$ : se entiende aquel en el que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada

experiencia, donde  $k$  es el número de factores, para una variable cualitativa con dos niveles (nivel alto y nivel bajo). Siendo el número de experimentos a realizar  $n = 2^k$ .

- Diseños fraccionados  $2^{k-p}$ : se estiman los efectos de  $k$  factores, pero no se probarán todos los  $2^k$  posibles tratamientos, sino que el número de tratamientos se reduce a  $2^{k-p}$ , permitiendo de esta manera estimar más efectos a un menor costo.
- Otros métodos alternativos son los diseños simples y los diseños de Plackett-Burman.

La función de aproximación en el modelo de primer orden está representada por <sup>(55)</sup>.

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad [2.20]$$

A continuación se tiene el modelo de primer orden para tres factores:

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \varepsilon \quad [2.21]$$

Donde:

$\mu_y$  = Valor promedio de la variable de respuesta (rendimiento).

$\beta_0$  = Valor promedio de la respuesta, en ausencia del efecto de los factores  $x_1$ ,  $x_2$ , y  $x_3$ .

$\beta_1$  = Razón de cambio (efecto lineal) del factor 1 sobre la respuesta promedio.

$\beta_2$  = Razón de cambio (efecto lineal) del factor 2 sobre la respuesta promedio.

$\beta_3$  = Razón de cambio (efecto lineal) del factor 3 sobre la respuesta promedio.

$\varepsilon$  = Término de error (efectos no explicados por el modelo).

Las gráficas de las curvas de nivel para los modelos de primer orden tienen una serie de líneas paralelas que representan las coordenadas de los niveles del factor que producen los mismos valores de respuesta.

### 2.5.1.2. Polinomio de segundo orden

El diseño polinomial de segundo orden permite estudiar los efectos de interacción y efectos cuadráticos, aparte de los lineales. Se utiliza por la necesidad de explorar una superficie más compleja o bien cuando se tiene identificada la región de respuesta óptima y se quiere caracterizar esa superficie de respuesta.

La selección de diseños polinomiales de segundo orden depende de las características del problema, así como de la capacidad de realizar estimaciones eficientes de los coeficientes del modelo y la medición del error experimental como la posible presencia de falta de ajuste<sup>(91)</sup>. Los diseños de segundo orden de uso más frecuentes son:

- Diseño central compuesto (DCC): Es el tipo de diseño más utilizado en esta etapa, debido a su flexibilidad.
- Diseño de Box-Behnken: Este diseño se forma al combinar un diseño  $2^k$  con los llamados diseños en bloques incompletos balanceados (DBIB). Estos diseños son esféricos más que cuboidales puesto que los puntos del diseño se encuentran en las orillas de un cubo en lugar de las esquinas como los del diseño de cubo con cara centrada. El diseño de Box-Behnken solo debe usarse si no se tiene interés en predecir las respuestas en las esquinas de la región cuboidal.

El Modelo de segundo orden está representado por la siguiente ecuación<sup>(55)</sup>:

$$\mu_y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad [2.22]$$

A continuación se tiene el modelo de segundo orden para tres factores:

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \varepsilon \quad [2.23]$$

Donde:

$\mu_y$  = Valor promedio de la variable respuesta (rendimiento).

$\beta_0$  = Valor promedio de la respuesta, en ausencia del efecto de los factores  $x_1$ ,  $x_2$ , y  $x_3$ .

$\beta_1$  = Razón de cambio (efecto lineal) del factor 1 sobre la respuesta promedio.

$\beta_2$  = Razón de cambio (efecto lineal) del factor 2 sobre la respuesta promedio.

$\beta_3$  = Razón de cambio (efecto lineal) del factor 3 sobre la respuesta promedio.

$\beta_{11}$  = Razón de cambio (efecto cuadrático) del factor 1 sobre la respuesta promedio.

$\beta_{22}$  = Razón de cambio (efecto cuadrático) del factor 2 sobre la respuesta promedio.

$\beta_{33}$  = Razón de cambio (efecto cuadrático) del factor 3 sobre la respuesta promedio.

$\beta_{12}$  = Razón de cambio del efecto de interacción entre  $x_1$  y  $x_2$  sobre la respuesta promedio.

$\beta_{13}$  = Razón de cambio del efecto de interacción entre  $x_1$  y  $x_3$  sobre la respuesta promedio.

$\beta_{23}$  = Razón de cambio del efecto de interacción entre  $x_2$  y  $x_3$  sobre la respuesta promedio.

$\varepsilon$  = Término de error (efectos no explicados por el modelo).

Para la presente tesis se aplicará el diseño central compuesto, el que se detalla a continuación.

### 2.5.2. Diseño central compuesto (DCC)

Uno de los modelos más importantes de diseños para ajustar modelos de segundo orden consiste en los diseños centrales compuestos (DCC) ó Box Wilson. Los DCC son relativamente eficientes cuando el número de factores es pequeño, entendiendo por eficiencia la obtención de los parámetros del modelo con el menor número de experimentos posibles. En cualquier caso, es conveniente realizar algún experimento adicional de los estrictamente necesarios para establecer los parámetros del modelo. De esta forma se dispone de grados de libertad suficientes para estimar el fallo de ajuste del modelo propuesto<sup>(48)</sup>.

El esquema experimental consiste<sup>(35)</sup>:

1. Un diseño factorial  $2^k$ , donde los niveles de los factores (valores) son valores codificados, usualmente  $-1$  y  $+1$ .
2. Dos puntos axiales en los ejes de cada factor del diseño a una distancia  $\alpha$  del centro del diseño, en total  $2k$  puntos.
3. Un número  $n_0$  de puntos en el centro del diseño ( $n_0 \geq 1$ ).

El total de pruebas experimentales que se realizan en el diseño central compuesto es:  $2^k + 2k + n_0$ .

Consideremos un factorial completo  $2^3$  como la base de un diseño central compuesto con dos factores. Si la distancia desde el centro del diseño a un punto factorial es  $\pm 1$  unidad por cada factor, la distancia del centro del diseño a un punto estrella es  $\pm \alpha$  con  $\alpha > 1$ ; donde el valor de  $\alpha$  depende de algunos aspectos, como se vio anteriormente. En la figura, se ilustra este diseño para el caso de  $\alpha = (2^k)^{1/4} = (2^3)^{1/4} = 1.682$ <sup>(91)</sup>.

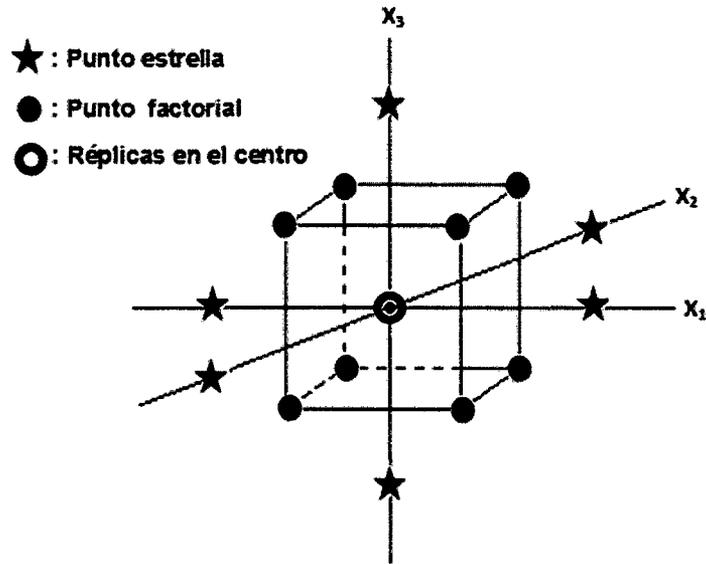


Figura 9: Diseño central compuesto de tres factores.

Fuente: Siqueiros, 2004

Tabla 6: Valores de diseños centrales compuestos, en diferentes números de variables.

Diseños centrales compuestos					
K	2	3	4	5	6
F (Porción factorial) $F=2^K$	4	8	16	32	64
Puntos axiales	4	6	8	10	12
$\alpha$	1.414	1.682	2	2.378	2.828
Puntos centrales (P.U.) = n	5	6	7	10	15
Pruebas totales (P.U.) = N	13	20	31	52	91

Fuente: Siqueiros, 2004.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS

#### **Objetivo general**

En este trabajo se propuso evaluar la capacidad degradativa del fenol presente en aguas residuales de aeronaves mediante *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de alginato de calcio.

#### **Objetivos específicos**

- Aislar microorganismos con capacidad degradativa de fenol.
- Determinar los valores óptimos de matriz, temperatura y concentración inicial de fenol para una máxima degradación.
- Evaluar la capacidad de adsorción-biodegradación de la matriz de alginato de calcio en la degradación del fenol.
- Mediante modelos matemáticos determinar la cinética representativa de los procesos de degradación del fenol presentes en aguas residuales de aeronaves.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3. Obtención de bacterias

##### 3.1. Aislamiento de microorganismos

La obtención de cepas microbianas fue a partir de muestras de aguas de producción de hidrocarburo provenientes de UNIPETROABC-Talara (lote 9, pozo 7344), y otras provenientes de Pirín-Puno (muestras de agua y suelo tomadas de alrededores de pozo sellado y muestras de hidrocarburo que se recogieron antes del sellado del pozo).

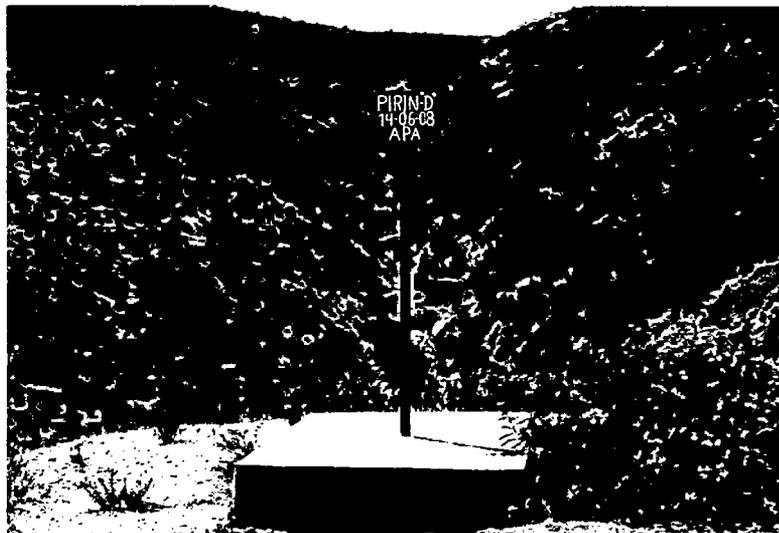


Figura 10: Pirín en el departamento de Puno.

### 3.1.1. Siembra

Se desarrollaron dos clases de siembra y por duplicado c/u para las muestras provenientes de Pirín-Puno, el primero compuesto por; tierra, agua y petróleo del lugar; el segundo compuesto por; agua y suelo; para la muestra de Talara se tomaron alícuotas de agua de producción de petróleo. El crecimiento de bacterias se realizó en medio selectivo de King A y King B, con la siguiente metodología.



Figura 11: Siembra de muestras de 3 (agua, suelo e hidrocarburo) y 2 (agua y suelo) componentes provenientes de Pirín.

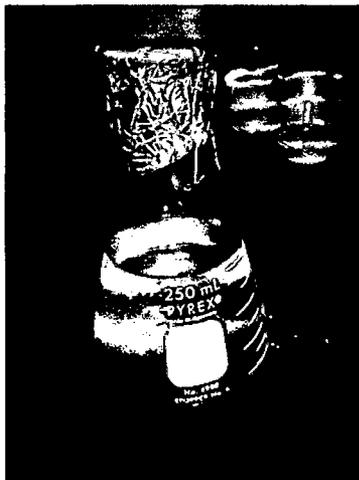


Figura 12: Muestra de agua de producción de hidrocarburo proveniente de Talara.

– Procedimiento.

- Preparación de las muestras de Pirín - Puno: En la primera muestra y por duplicado en matraces de 250 mL se pusieron 10 g de tierra, 50 mL de agua del lugar y 10 mL de petróleo del lugar. En la segunda muestra por duplicado en matraces de 250 mL se colocaron 10 g de tierra y 50 mL de agua del lugar, luego se llevó a agitación constante a 150 rpm por 72 horas, finalmente se incubaron por 48 horas a 37 °C.
- Preparación de la muestra de Talara: En un matraz de 250 mL se colocó una alícuota de 50 mL de muestra de agua de producción de petróleo de UNIPETROABC.
- De cada una de las muestras de Pirín y Talara, se tomaron alícuotas de 1 mL y se realizaron diluciones en agua peptonada en diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , seguidamente se sembraron en placas petri con medios de King A y King B y se incubaron a 37 °C por 72 horas.



Figura 13: Siembra de muestras en medios de King A y King B.

### 3.1.2. Aislamiento de bacterias en agar nutritivo

De cada medio King A y King B, se retiraron muestras con un asa estéril para resiembras por la técnica de estrías en medio de agar nutritivo (placas petri previamente rotuladas y codificadas, por cada lugar de procedencia de microorganismos), seguidamente se incubaron por 24 horas a 37 °C.

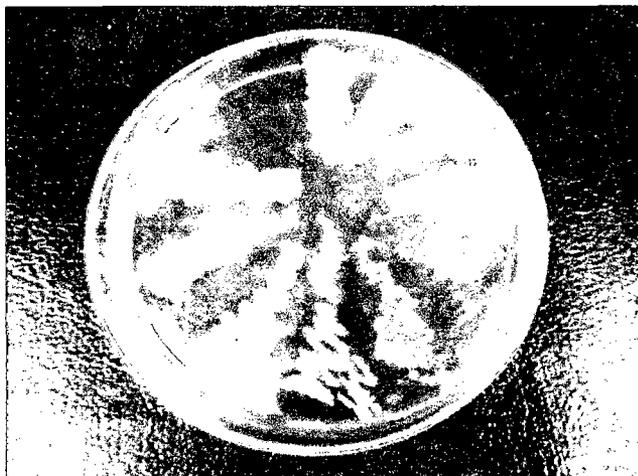


Figura 14: Aislamiento de bacterias en placas de agar nutritivo

### 3.1.3. Trasplante de microorganismos en tubos de ensayo

El trasplante de los microorganismos de medios King A y King B, tuvo como finalidad la conservación y evitar la contaminación de las cepas, por lo que se inocularon en tubos de ensayo de contenido de agar nutritivo en pico de flauta, por un periodo de un mes, pasando ese tiempo se resemebraron nuevamente.



Figura 15: Trasplante de microorganismos en tubos de ensayo

### 3.2. Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se realizaron en medios selectivos - diferenciales, que ayudan a identificar la especie bacteriana. Cada medio contiene un sustrato que es modificado o no por las cepas inoculadas permitiendo establecer un patrón de respuestas positivas o negativas según se trate de especies diferentes. En medios selectivos el desarrollo se inhibe en unas u otras permitiendo una discriminación de especies.

Por tanto se realizaron los siguientes ensayos.

- Tinción Gram.
- Prueba de la Oxidasa.
- Prueba de la Catalasa.
- Prueba de Citrato de Simmons.
- Prueba de TSI.
- Prueba de LIA.
- Prueba de la UREA.
- Prueba de crecimiento en medios King A y King B.
- Prueba de crecimiento de *Pseudomonas* en Agar Cetrimide.



Figura 16: Fijación de cepas para la tinción Gram.

### 3.3. Aclimatación de bacterias selectas

#### 3.3.1. Medio mineral

El medio mineral utilizado como técnica de enriquecimiento en medio líquido ha sido el medio Fatherpure y Vogel, empleado para el aislamiento de microorganismos que se encontraran en hidrocarburos, compuesta por la siguiente modificación<sup>(93)</sup>: macronutriente (g/L):  $K_2HPO_4$ , 0.9;  $KH_2PO_4$ , 0.45;  $NH_4Cl$ , 0.45;  $NaCl$ , 0.45;  $MgSO_4$ , 0.216;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.02;  $FeCl_2$ , 0.005, micronutriente (mg/L):  $H_3BO_3$ , 0.2;  $CuCl_2 \cdot H_2O$ , 0.1;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.5;  $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ , 0.1;  $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ , 0.1;  $ZnCl_2$ , 0.1;  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.2, stock de vitaminas (mg/L): piridoxina-HCl, 0.1; tiamina, 0.05; riboflavina, 0.05; ácido nicotínico, 0.05; biotina, 0.05; ácido fólico, 0.02; cobalamina, 0.005; ácido p-aminobenzoico, 0.05, fuente de carbono y energía: extracto de levadura, 1 g/L. Además se adicionó 0.025 g/L del reactivo ciclo heximida para evitar contaminaciones.

#### 3.3.2. Adaptación de las bacterias en altas concentraciones de fenol

De las cepas identificadas por medio de pruebas bioquímicas, se hicieron ensayos de adaptación de 7 a 1400 mg/L de concentración de fenol, con la siguiente metodología.

– Cultivo Primario.

- Se cultivaron las cepas identificadas en 5 mL de caldo nutritivo.
- En cada tubo Falcon de 50mL, se colocaron 5mL del cultivo bacteriano seguidamente se adicionaron 10 mL de medio mineral salino (medio mineral modificado de Fatherpure y Vogel) y 35 mL de la solución acuosa de 10 mg/L de fenol (solución previamente autoclavada), con equivalencia de 7 mg/L de fenol en la solución total, seguidamente se incubaron a 37 °C por 72 horas.
- Finalmente, los tubos Falcon se centrifugaron a 5000 rpm por 30 min, la precipitación celular de cada tubo Falcon se colectó para los siguientes ensayos experimentales.

– Cultivo Secundario.

- En cada tubo Falcon de 50mL, se adicionó 5mL del cultivo primario (células precipitadas), a este se le incorporó 10 mL de medio mineral salino, y 35 mL de solución de 50 mg/L fenol, con equivalencia de

35 mg/L de fenol en la solución total, seguidamente se incubaron a 37 °C por 72 horas. Finalmente, se centrifugaron a 5000 rpm por 30 min.

- Los ensayos experimentales posteriores se continuaron con el procedimiento mencionado, con adiciones de concentraciones de 100, 500, y 1000 mg/L de fenol equivalentes a 70, 350, y 700 mg/L de fenol en solución total, se incubaron a 37 °C por 72 horas para cada uno; y para concentraciones adicionales de 1500 y 2000 mg/L de fenol (equivalentes a 1050 y 1400 mg/L de fenol en solución total) se incubaron a 37 °C por 168 horas para cada uno. Del último ensayo se tomó una alícuota de 1 mL de cada muestra y se realizó diluciones de  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  para las siembras bacteriológicas en agar nutritivo.



Figura 17: Proceso de siembra en la aclimatación

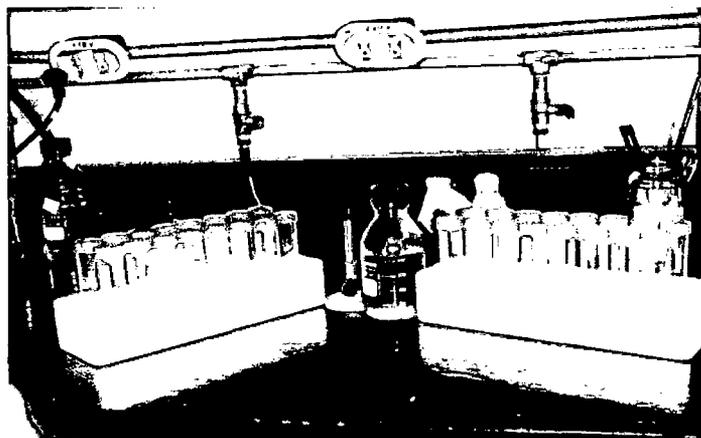


Figura 18: Proceso de aclimatación de cepas

### 3.4. Encapsulamiento en geles de alginato de calcio

La inmovilización de los microorganismos se realizó por atrapamiento de bacterias, durante la formación de la matriz de alginato de calcio <sup>(28)</sup>, con la siguiente metodología.

– Procedimiento

- De la última adaptación de 1400 mg/L de fenol, se realizó el recuento de colonias en agar nutritivo. La cepa seleccionada se resembró en caldo nutritivo para su utilización.

– Inmovilización en alginato de calcio

- En un matraz erlenmeyer de 250 mL se disolvió 3.2 gr. de ácido algínico (3.2% w/v) con 100 mL de medio mineral modificado de Fatherpure y Vogel, seguidamente se esterilizó. A esta solución se le agregó 1.5 mL de la cepa seleccionada, luego se agitó el matraz hasta su completa homogenización.
- La solución homogénea se transfirió a una pera de decantación, y se dejó gotear la solución algínica con bacterias en 100 mL de cloruro de calcio (al 3.2%, de pH 6,016 a 19,9°C) previamente esterilizada, estando en agitación constante de 400 rpm por 1 hora. La altura de la caída de la gota de la pera de decantación fue de 16.7 cm, para la formación de la perla. Finalmente, fueron lavadas con 100 mL de agua destilada para remover el exceso de iones de calcio (se lavaron 2 veces, cada uno por 20 minutos).

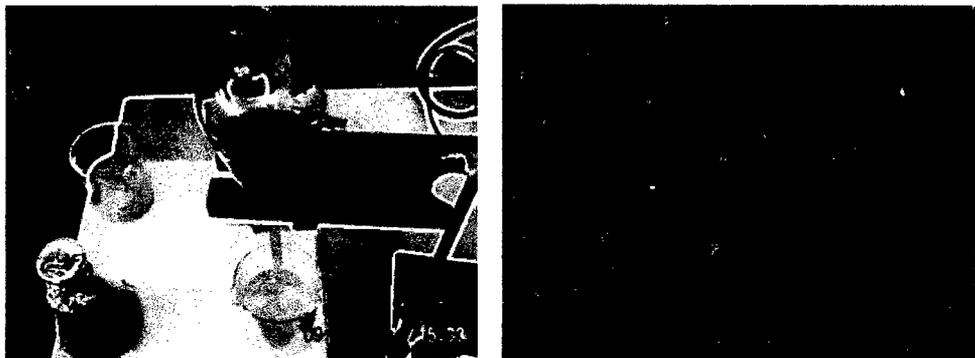


Figura 19: Inmovilización de *Pseudomonas aeruginosa* en matrices de alginato.

### 3.5. Determinación de fenol por el método de 4 amino antipirina

#### 3.5.1. Determinación de la curva de calibración

– Preparación de soluciones.

- Disolución patrón de fenol (1g/L). Se pesó 1.00 g de fenol que se disolvió en una fiola de un litro con agua destilada.
- Disolución intermedia de fenol (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ó mg/ L). Se diluyeron 10.0 mL de la disolución patrón de fenol en agua hasta 1 L (1.0 mL contiene aproximadamente 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fenol).
- Disolución de 4-aminoantipirina (2% P/V). Se pesó 2.0 g de 4-aminoantipirina que se disolvió con 100 mL de agua, preparación diaria.
- Disolución de ferricianuro de potasio (8 % P/V). Se pesó 8.0 g de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  que se disolvió con 100 mL de agua destilada y en seguida se guardó en un frasco de vidrio ámbar, preparación semanal.
- Disolución de hidróxido de amonio,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; 0.5 N: Se diluyó 35 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado hasta 1 litro con agua destilada.
- Solución buffer de fosfato: Se pesó 104.5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 72.3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  que se disolvieron con agua destilada hasta 1 litro. El pH de la solución buffer fue de 6.8.
- Cloroformo,  $\text{CHCl}_3$ .
- Sulfato de sodio  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , anhidro granular.

– Procedimiento

- Se preparó un blanco de 50 mL de agua destilada y una serie de soluciones estándar de fenol de 50 mL, de 0.5, 1, 2, 3 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fenol.
- El blanco y las soluciones estándar se traspasaron a vasos precipitados de 100mL, en seguida se adicionaron las siguientes soluciones para cada uno: 1.2 mL de solución 0.5 N de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e inmediatamente se ajustaron el pH hasta  $7.9 \pm 0.1$  con la solución buffer de fosfato, luego se transfirieron a ampollas de decantación de 120 mL, se agregaron 0.3 mL de solución de 4 amino-antipirina,



Figura 24: Ajuste de la muestra a pH 7.9, con  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0.5 N) y solución buffer de fosfato.

### 3.6. Metodología superficie respuesta aplicado en el proceso de la degradación del fenol

Con la cepa elegida se realizaron ensayos en minireactores batch a diferentes condiciones ambientales, en el que se hicieron variar la temperatura, el número de perlas de alginato de calcio (*Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada) y concentración de fenol, para condiciones de trabajo de 300 mL (10% de medio mineral Fatherpure y 90% de solución acuosa de Fenol), aireación constante de 0.047 vvm, diámetro de la perla 0.319 cm (cada perla contiene  $32 \times 10^5$  células de *Pseudomonas aeruginosa*).

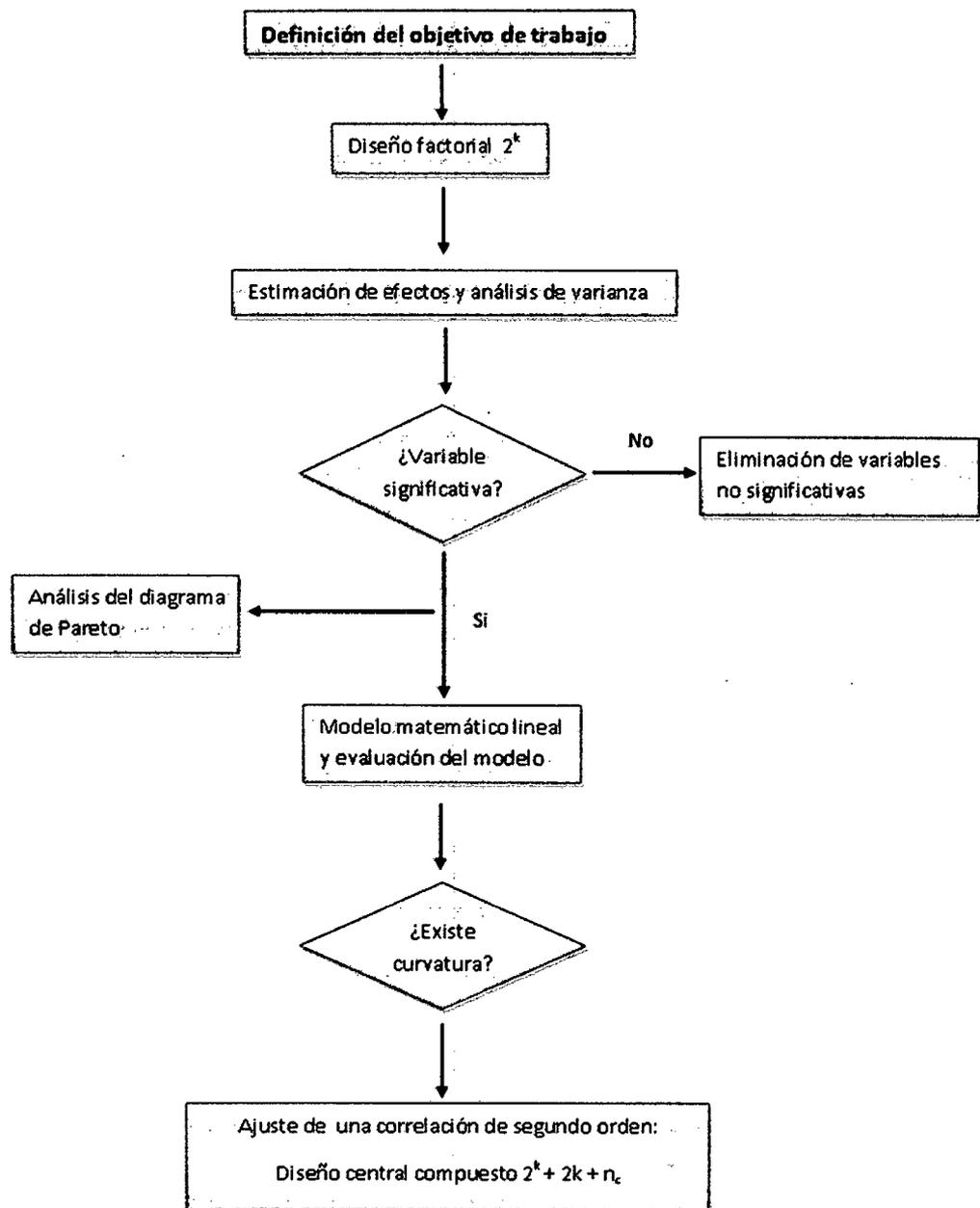


Figura 25: Diagrama de flujo diseño factorial.

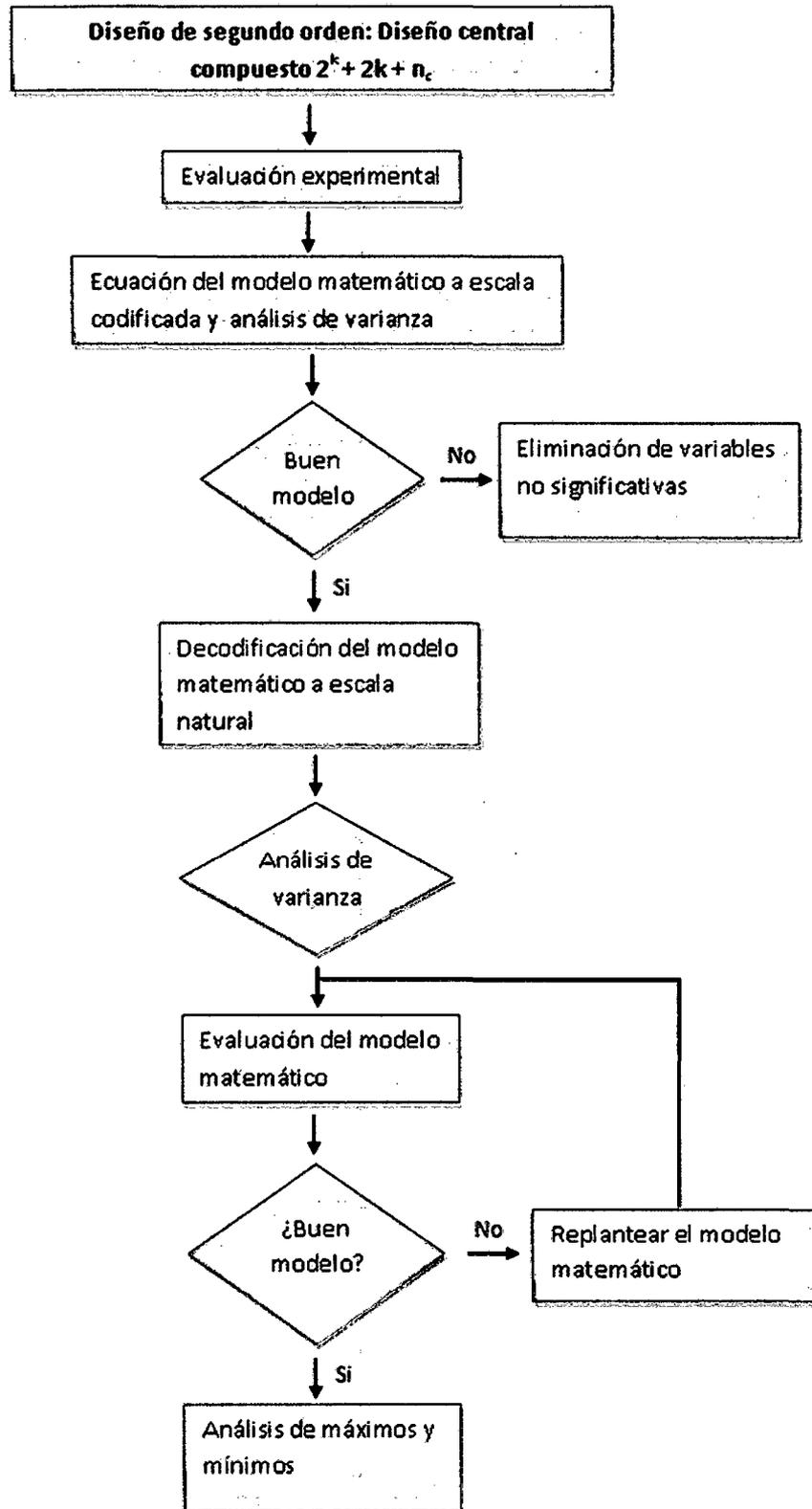


Figura 26: Diagrama de flujo del diseño central compuesto.

Para un diseño factorial de 3 variables, se elaboró la siguiente tabla.

Tabla 7: Diseño factorial  $2^k$  aplicado al proceso de la degradación del fenol.

Niveles	$2^k$		$n_0$
	+ 1	-1	
Matriz (# de perlas)	55	37	46
Temperatura (°C)	28	16	22
[ ] <sub>0</sub> mg/L fenol	70	30	50

Tabla 8: Niveles para el diseño factorial  $2^k$ .

N°	Natural			Codificado			Respuesta
	Matriz (# de perlas)	Temperatura (°C)	[ ] <sub>0</sub> Fenol (mg/L)	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Y
1	37	16	30	-	-	-	
2	55	16	30	+	-	-	
3	37	28	30	-	+	-	
4	55	28	30	+	+	-	
5	37	16	70	-	-	+	
6	55	16	70	+	-	+	
7	37	28	70	-	+	+	
8	55	28	70	+	+	+	
9	46	22	50	0	0	0	
10	46	22	50	0	0	0	
11	46	22	50	0	0	0	
12	46	22	50	0	0	0	
13	46	22	50	0	0	0	
14	46	22	50	0	0	0	

Tabla 9: Diseño central compuesto aplicado al proceso de la degradación de fenol.

Niveles	2 <sup>K</sup>		2K		n <sub>0</sub>
	+ 1	-1	- 1.682	1.682	
Matriz (# de perlas)	55	37	31	61	46
Temperatura (°C)	28	16	12	32	22
[ ] <sub>0</sub> mg/L fenol	70	30	16	84	50

Tabla 10: Niveles para un diseño central compuesto

Nº	Natural			Codificado			Respuesta Y
	Matriz (# de perlas)	Temperatura (°C)	[ ] <sub>0</sub> Fenol (mg/L)	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	37	16	30	-	-	-	
2	55	16	30	+	-	-	
3	37	28	30	-	+	-	
4	55	28	30	+	+	-	
5	37	16	70	-	-	+	
6	55	16	70	+	-	+	
7	37	28	70	-	+	+	
8	55	28	70	+	+	+	
9	31	22	50	-1.682	0	0	
10	61	22	50	1.682	0	0	
11	46	12	50	0	-1.682	0	
12	46	32	50	0	1.682	0	
13	46	22	16	0	0	-1.682	
14	46	22	84	0	0	1.682	
15	46	22	50	0	0	0	
16	46	22	50	0	0	0	
17	46	22	50	0	0	0	
18	46	22	50	0	0	0	
19	46	22	50	0	0	0	
20	46	22	50	0	0	0	

En la presente investigación se aplicó el modelo polinomial de segundo orden para tres factores, con la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \varepsilon \quad [3.2]$$

### 3.7. **Ámbito de estudio: Aguas residuales proveniente de los retretes de aeronaves**

Actualmente el aeropuerto internacional Jorge Chávez está concesionado a la empresa Lima Airport Partners desde el 2001 y es administrado por la empresa Comercial Corpac S.A., empresa del sector de Transporte y Comunicación.

El manejo de los efluentes líquidos provenientes de los retretes de las aeronaves que cubren las rutas nacionales e internacionales, tienen concentraciones elevadas de 5 a 15 mg/L fenoles, que hacen imposible descargar directamente a la red pública y /o sistema de tratamiento biológico por lo requiere un acondicionamiento previo<sup>(43)</sup>.

Para el presente trabajo de investigación se extrajo una muestra de uno de los retretes que se llevó al laboratorio para su caracterización respectiva y se guardó en refrigeración hasta la puesta en funcionamiento del reactor por lotes.

#### 3.7.1. **Caracterización de la muestra**

Se registraron datos de pH, temperatura (°C), conductividad eléctrica, salinidad, y, se analizaron la presencia de sólidos totales, sólidos disueltos y sólidos volátiles.

#### 3.7.2. **Degradación de fenol en un reactor en lote (batch)**

La degradación del fenol presente en aguas residuales provenientes de retretes de aeronaves se desarrolló en simulación de un reactor de lotes (batch) de capacidad de 3.5 L con aireación constante de 0.018 vvm. El sistema de aireación consta de una piedra difusora de 2.84 cm de altura y 1 cm de diámetro conectado a una bomba de aireación de marca elite 802 (35 W, 3.5 Psi) y la regulación de temperatura ha sido por medio de calentadores de agua para acuarios (10 y 16 W). El análisis de la determinación del fenol se realizó por el método de 4 aminoantipirina<sup>(69)</sup>.

## CAPÍTULO IV

### Resultados

#### 4.1. Siembra, aislamiento, reconocimiento de la cepa y aclimatación

##### 4.1.1. Siembra y aislamiento

Mediante la técnica de selección en medios de King A y King B (medio selectivo para *Pseudomonas*) se obtuvieron 191 cepas provenientes de Pirín y 79 cepas provenientes de Talara. Se observaron que de las muestras provenientes de Pirín, se obtuvieron una mayor cantidad de cepas, debido a que se utilizaron tres clases de muestra (agua, suelo e hidrocarburo del lugar), sin embargo en la muestra de Talara se obtuvo pocas cepas debido a que solo se tenía un solo tipo de muestra. Por lo que se obtuvieron un total de 370 cepas, entre bacilos y cocos, que son gram positivos y gram negativos.

##### 4.1.2. Pruebas de reconocimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*

Mediante la tinción de gram se realizó el primer reconocimiento de las bacterias gram negativas, tinción propia de las *Pseudomonas aeruginosa*, de este primer ensayo se seleccionaron sólo a bacterias que tenían la forma de bastones.

Los ensayos de Oxidasa y Catalasa ayudaron a reconocer la especie debido a que sólo las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* son catalasa positiva y oxidasa positiva. A partir de los ensayos mencionados se redujeron a 20 las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Las pruebas bioquímicas de Citrato de Simmons, LIA, TSI, UREA, medios King A y King B, y Agar Cetrimide (medio específico de crecimiento sólo para *Pseudomonas*), nos confirmaron que de las 20 cepas sólo 16 tienen la característica de ser *Pseudomonas aeruginosa*, con el siguiente resultado.

Tabla 11: Resultados de pruebas bioquímicas para *Pseudomonas aeruginosa*

Citrato de Simmons	LIA			TSI			UREA
	Desaminación	Descarboxilasa	Hierro	Lactosa	Sacarosa	Glucosa CO <sub>2</sub>	
+	-	+	+	k	k	-	-

A continuación se tiene las imágenes de reconocimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

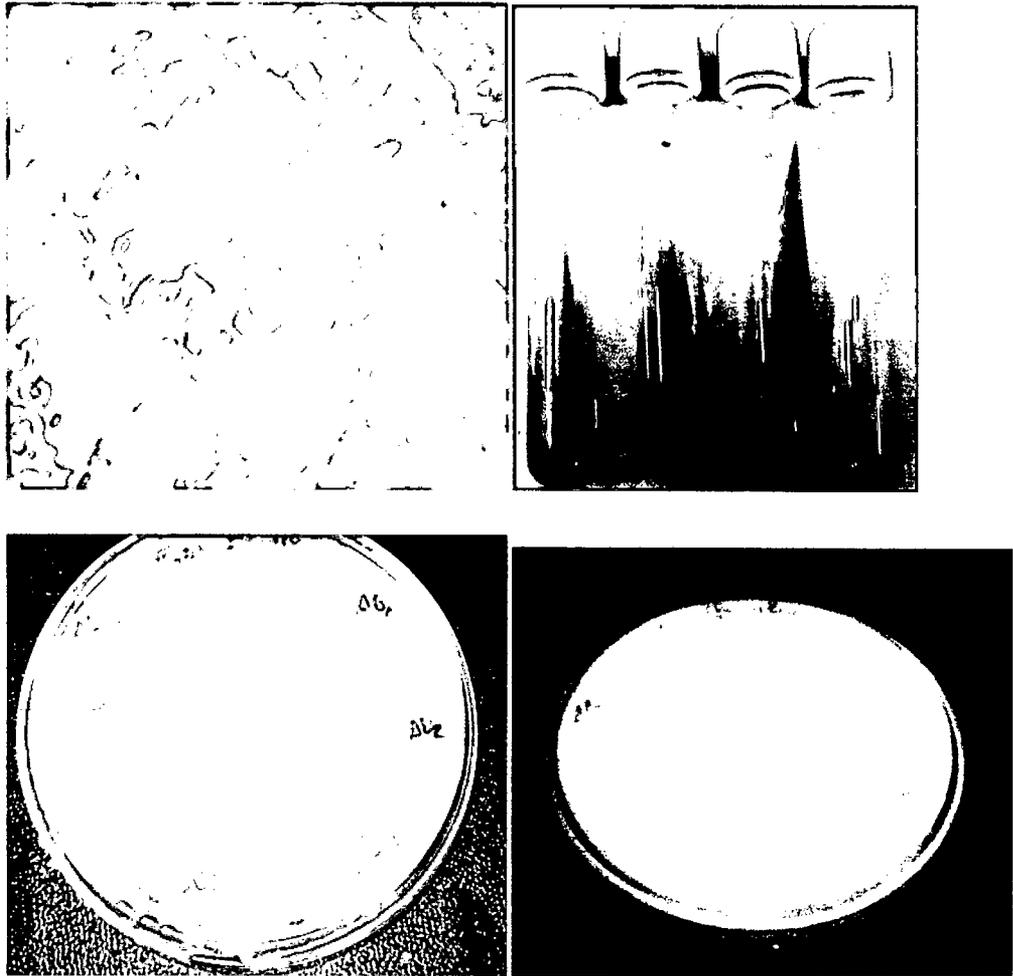


Figura 27: Tinción gram, pruebas bioquímicas (Citrato de Simmons, LIA, TSI y UREA), producción de pioverdina en medio King B, presencia de fluorescencia bajo longitud de onda corta de 254 nm.

#### 4.1.3. Resultados de las adaptaciones de las bacterias en altas concentraciones de fenol

La adaptación de bacterias se desarrolló de forma gradual con incrementos de dosificación de 70% de fenol de concentraciones 10, 50, 100, 500, 1000, 1500, y 2000 mg/L, en medio mineral de Fatherpure y Vogel (20%) con 10% de cultivo de cepas, en un periodo de 696 horas

Tabla 12: Variación del pH a diferentes concentraciones de fenol, en el proceso de aclimatación.

Concentración de fenol en 70 % (mg/L)	Concentración de fenol en la muestra (mg/L)	Horas	T1	T2	T3	T4	T5	34	111	113	118	AB1	AB2	AB3	AB4	AB7	MM4	MM2.3.
10	7	72	7.171	7.096	7.531	6.921	7.056	6.269	6.382	6.309	6.281	6.880	6.510	6.770	6.660	7.080	6.790	6.738
50	35	72	7.505	7.232	7.030	7.312	7.636	6.850	6.730	6.860	6.850	6.865	6.859	6.812	6.835	6.754	6.830	6.915
100	70	72	6.803	6.609	6.609	6.595	6.900	7.047	6.632	6.391	6.294	6.441	6.346	6.393	7.355	6.431	6.670	7.442
500	350	72	6.646	6.622	6.612	7.130	6.760	6.729	6.712	7.184	6.761	6.673	6.662	6.682	6.721	6.641	6.700	7.026
1000	700	72	6.567	6.422	6.464	6.410	6.353	6.677	6.674	6.706	6.685	6.836	6.694	6.695	6.808	6.475	6.600	6.512
1500	1050	168	6.708	6.672	6.896	6.650	6.678	6.580	6.574	6.592	6.587	6.537	6.526	6.55	6.535	6.569	6.600	6.610
2000	1400	168	6.867	6.831	6.915	6.757	6.881	6.694	6.761	6.871	6.988	6.624	6.639	7.073	6.691	6.653	6.650	6.710
pH promedio			6.8953	6.7834	6.8653	6.825	6.89486	6.6923	6.6379	6.7019	6.6351	6.6937	6.6051	6.7107	6.8007	6.6576	6.692	6.8504

De la tabla, se observa que el pH tiene una ligera variación, debido a la producción de metabolitos producidos por las bacterias, siendo el valor más alto de 7.505 y el valor más bajo de 6.281. Los resultados obtenidos del pH nos mostraron que la bacteria del tipo *Pseudomonas* se encuentran en un hábitat cercano al neutro.

Tabla 13: Crecimiento de colonias a 1400 mg/L de fenol

	Tiempo (h)	T1	T2	T3	T4	T5	34	111	113	118	AB1	AB2	AB3	AB4	AB7	MM4	MM2.
Conteo de colonias a 1400 mg/L	168	$112 \times 10^{-4}$	$80 \times 10^{-2}$	$456 \times 10^{-4}$	$36 \times 10^{-4}$	$333 \times 10^{-4}$	$278 \times 10^{-5}$	$102 \times 10^{-5}$	$124 \times 10^{-5}$	$72 \times 10^{-5}$	$382 \times 10^{-5}$	$521 \times 10^{-4}$	$57 \times 10^{-4}$	$504 \times 10^{-5}$	$562 \times 10^{-4}$	$817 \times 10^{-4}$	$639 \times 10^{-4}$

El número de colonias crecidas en placas de medio agar nutritivo, nos permitió seleccionar al tipo de bacteria con la que se realizó todos los ensayos experimentales.

#### 4.2. Curva de calibración por el método 4 aminoantipirina

Para determinar el fenol se utilizó la técnica de 4 aminoantipirina, se resume en la siguiente tabla.

Tabla 14: Técnica de 4-aminoantipirina

Fenol ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.5	1	2	3	4
$\text{NH}_4\text{OH}$ (0.5 N) en mL	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Ajuste de pH a $7.9 \pm 0.1$ ( con Solución buffer de fosfato)						
4 aminoantipirina (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (mL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Dejar en reposo por 15 minutos para el desarrollo del color						
Extracción con cloroformo (mL)	10	10	10	10	10	10
Filtrar el extracto, con sulfato de sodio anhidro						
$\text{NaSO}_4$ (g)	1	1	1	1	1	1
Lectura en Absorvancia a 560 nm						

Fuente: Modificado del AWWA, 1998.

Tabla 15: Curva de calibración para el fenol a una longitud de onda de 560 nm

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvancia	Absorvancia corregida
0	0.008	0
0.5	0.041	0.033
1	0.083	0.075
2	0.146	0.138
3	0.232	0.224
4	0.341	0.333

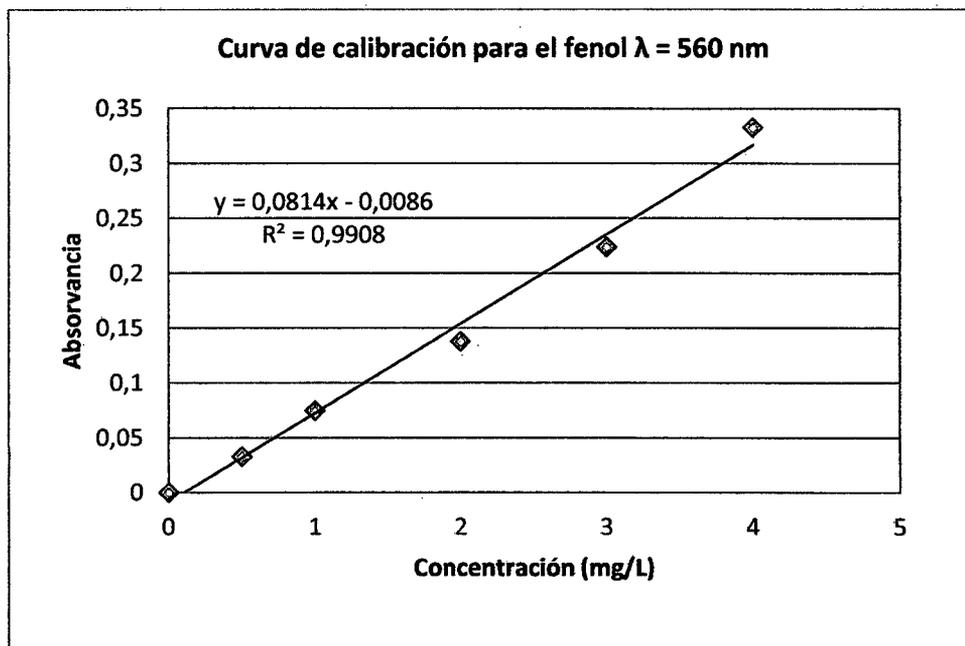


Figura 28: Curva de calibración para el fenol a una longitud de onda de 560 nm.

#### 4.3. Metodología de superficie respuesta aplicado en el proceso de degradación del fenol

Tabla 16: Resultado del análisis en la degradación del fenol para soluciones acuosas.

Nº	Matriz (# de perlas)	Temperatura (°C)	[ ] <sub>0</sub> Fenol (mg/L)	Y Concentración en equilibrio (mg/L)	Y Concentración degradada (mg/L)	% de degradación
	$x_1$	$x_2$	$x_3$			
1	37	16	30	21.536	12.764	28.21
2	55	16	30	17.236	8.464	42.55
3	37	28	30	16.480	13.520	45.07
4	55	28	30	8.241	21.759	72.53
5	37	16	70	59.327	10.673	15.25
6	55	16	70	54.090	15.910	22.73
7	37	28	70	34.742	35.258	50.37
8	55	28	70	22.058	47.942	68.49
9	46	22	50	24.283	25.717	51.43
10	46	22	50	24.730	25.270	50.54
11	46	22	50	23.060	26.940	53.88
12	46	22	50	23.850	26.150	52.30
13	46	22	50	24.570	25.430	50.86
14	46	22	50	23.550	26.450	52.90

#### 4.3.1. Etapa de selección de variables (screening).

Determinación del modelo de primer orden en aplicación del diseño factorial  $2^k$ .

Tabla 17: Matriz del diseño factorial  $2^k$  con su respectiva respuesta.

Nº	X <sub>0</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	Y (mg/L)	% de degradación
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	21.536	28.21
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	17.236	42.55
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	16.48	45.07
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	8.241	72.53
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	59.327	15.25
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	54.09	22.73
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	34.742	50.37
8	1	1	1	1	1	1	1	1	22.058	68.49
9	1	0	0	0	0	0	0	0	24.283	51.43
10	1	0	0	0	0	0	0	0	24.73	50.54
11	1	0	0	0	0	0	0	0	23.06	53.88
12	1	0	0	0	0	0	0	0	23.85	52.30
13	1	0	0	0	0	0	0	0	24.57	50.86
14	1	0	0	0	0	0	0	0	23.55	52.90

– Estimación de efectos.

Los valores de los efectos se obtienen a partir del producto de matrices:

$$[X]^T * Y / [(N/2) * r]$$

Tabla 18: Efectos del diseño factorial  $2^k$ .

Diseño base	X <sub>0</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>
Efectos	86.300	16.850	31.930	-7.880	5.940	-4.050	8.510	-0.620

De la tabla se observa que la variable matriz (X<sub>1</sub>) y la variable temperatura (X<sub>2</sub>) son de signo positivo por lo que son de efecto positivo, sin embargo la variable concentración inicial (X<sub>3</sub>) es de signo negativo por lo que es de efecto negativo, es decir el incremento de la matriz y la temperatura favorecen la degradación del fenol, no obstante al aumentar la concentración inicial afecta negativamente al proceso de remoción y que esta será favorable cuando esté en su nivel más bajo.

– Ecuación del modelo matemático a escala codificada.

Los coeficientes de la ecuación se hallan a partir del producto de matrices:

$$[X]^T * Y / [N * r]$$

$$Y_{est} = 43.150 + 8.425X_1 + 15.965X_2 - 3.940X_3 + 2.970X_1X_2 - 2.025X_1X_3 + 4.255X_2X_3 - 0.310X_1X_2X_3 \quad [4.1]$$

– Análisis de varianza.

Tabla 19: Análisis de varianza para el diseño factorial  $2^k$ .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	Significancia	F tabla $\alpha = 0.05$
$X_1$	567.845	1	567.845	346.712	>	6.61
$X_2$	2039.05	1	2039.05	1244.993	>	6.61
$X_3$	124.189	1	124.189	75.827	>	6.61
$X_1 X_2$	70.567	1	70.567	43.086	>	6.61
$X_1 X_3$	32.805	1	32.805	20.03	>	6.61
$X_2 X_3$	144.84	1	144.84	88.436	>	6.61
$X_1 X_2 X_3$	0.769	1	0.769	0.47	<	6.61
Curvatura	267.625	1	267.625	163.405	>	6.61
Error	8.189	5	1.6378	1		
Total	3255.879	13				

Para un nivel de significancia de 0.05, con  $F_{1,5}$ , se obtiene 6.61, con un coeficiente de determinación de  $R^2 = 0.99748$ ,  $R^2$  ajustado = 0.99346.

#### Interpretación

Se tiene que:

- Si  $F_o > F_{1,5}$ , significa que el modelo se ajusta a la ecuación hallada.
- Los términos lineales  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ , y, los términos de interacción  $X_1 X_2$ ,  $X_1 X_3$ ,  $X_2 X_3$ , son significativos, para  $\alpha = 0.05$ , por lo tanto los parámetros mencionados son importantes para el proceso de la biodegradación del fenol, por otro lado la interacción de  $X_1 X_2 X_3$  no es tan significativo en la biodegradación del fenol, por lo que esta se descarta.
- La presencia de la curvatura es significativa en la región estudiada de manera que la región óptima del proceso de biodegradación se encuentra cerca al centro del diseño experimental.
- El valor hallado de  $R^2 = 0.99748$ ; con  $R^2$  ajustado = 0.99346, nos indican que el modelo ajustado explica el 99.346 % de la variabilidad del rendimiento, es decir significa un buen ajuste en el modelo y que va por un buen camino hacia la optimización.

Analizando los valores obtenidos de la tabla de análisis de variancia (19) para diseño factorial  $2^k$  se obtiene la nueva ecuación, con lo siguiente:

$$Y_{\text{est}} = 43.150 + 8.425X_1 + 15.965X_2 - 3.940X_3 + 2.970X_1X_2 - 2.025X_1X_3 + 4.255 X_2X_3 \quad [4.2]$$

La ecuación mencionada puede ser descrita como:

$$Y_{\text{est}} = 43.150 + 8.425 * \text{Matriz} + 15.965 * \text{Temperatura} - 3.940 * [\text{ ]}_0 \text{ Fenol} + 2.970 * \text{Matriz} * \text{Temperatura} - 2.025 * \text{Matriz} * [\text{ ]}_0 \text{ Fenol} + 4.255 * \text{Temperatura} * [\text{ ]}_0 \text{ Fenol} \quad [4.3]$$

De la ecuación [4.2] y [4.3] se observa que de los coeficientes que acompañan a las variables en la ecuación, el coeficiente de temperatura es de mayor valor por lo que significa que la degradación del fenol alcanza su máximo cuando esta, esté en el nivel más alto (nivel +1).

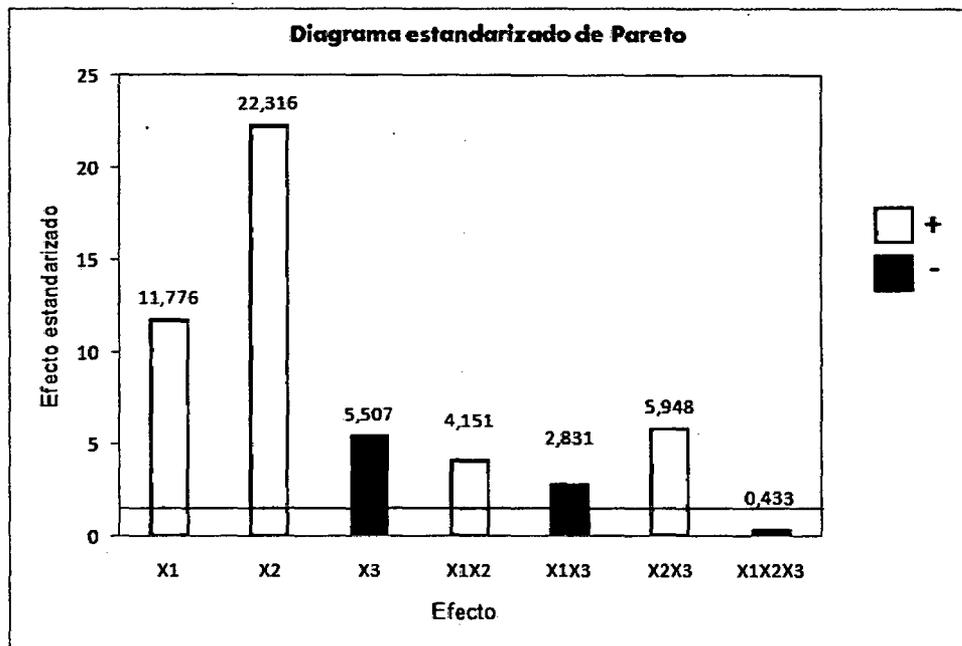


Figura 29: Diagrama de Pareto.

El diagrama de Pareto muestra la jerarquía de significancia de cada efecto influyente en la degradación del fenol, así pues mediante el análisis del valor crítico en las tablas de distribución T de student, se obtuvo un valor de 1.476 para 5 grados de libertad del error con  $\alpha = 0.1$ , con el mencionado dato se analizó el efecto de cada variable, siendo la temperatura (22.316) de mayor significancia seguida de la matriz (11.776) y finalmente la concentración inicial de fenol (5.507) para los efectos principales, así mismo en los efectos de interacción se obtuvieron que la temperatura con la concentración inicial (5.948) es la más significativa seguida de la matriz con la temperatura (4.151) y finalmente la matriz con la concentración inicial (2.831), por tanto de lo observado se concluye que la temperatura es de gran influencia en el proceso de la degradación de

fenol por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de alginato de calcio, y, que esta afecta a las reacciones químicas y enzimáticas del metabolismo celular <sup>(62)</sup>, como también influyen de forma significativa sobre las membranas microbianas <sup>(53)</sup>.

- Decodificación del modelo matemático a escala natural

Cálculo del centro del diseño.

$$Z^o = \frac{Z_i^{\text{Max}} + Z_i^{\text{Min}}}{2} \quad [4.4]$$

Cálculo del radio del diseño.

$$\Delta Z = \frac{Z_i^{\text{Max}} - Z_i^{\text{Min}}}{2} \quad [4.5]$$

Cálculo de la relación.

$$\varepsilon = \frac{Z^o}{\Delta Z} \quad [4.6]$$

Donde:

$Z_i^{\text{Max}}$ : Nivel superior de la variable.

$Z_i^{\text{Min}}$ : Nivel inferior de la variable.

$Z^o$  : Centro del diseño.

$\Delta Z$  : Radio del diseño.

$\varepsilon$  : Relación entre  $Z^o$  y  $\Delta Z$ .

Tabla 20: Datos de estudio para el modelo matemático a escala natural.

	$Z_1$	$Z_2$	$Z_3$
Nivel inferior	37	16	30
Nivel superior	55	28	70
Centro de diseño ( $Z^o$ )	46	22	50
Radio de diseño ( $\Delta Z$ )	9	6	20
Relación ( $\varepsilon$ )	5.111	3.667	2.5

Donde:

$\varepsilon_i, \varepsilon_j$  : Relación entre  $Z^o$  y  $\Delta Z$ .

$\Delta Z_i, \Delta Z_j$ : Radio del diseño.

- Gráfica del modelo matemático:

$$\text{Para } X_3 = 0; Y_{\text{est}} = 43.150 + 8.425X_1 + 15.965X_2 + 2.970X_1X_2 \quad [4.7]$$

$$\text{Para } X_2 = 0; Y_{\text{est}} = 43.150 + 8.425X_1 - 3.940X_3 - 2.025X_1X_3 \quad [4.8]$$

$$\text{Para } X_1 = 0; Y_{\text{est}} = 43.150 + 15.965X_2 - 3.940X_3 + 4.255 X_2X_3 \quad [4.9]$$

- Decodificación de ecuaciones a escala natural:
  - Para  $X_3=0$ , su modelo matemático a escala natural es:

$$Y = -58.449 + 0.936Z_1 + 2.661Z_2 \quad [4.10]$$

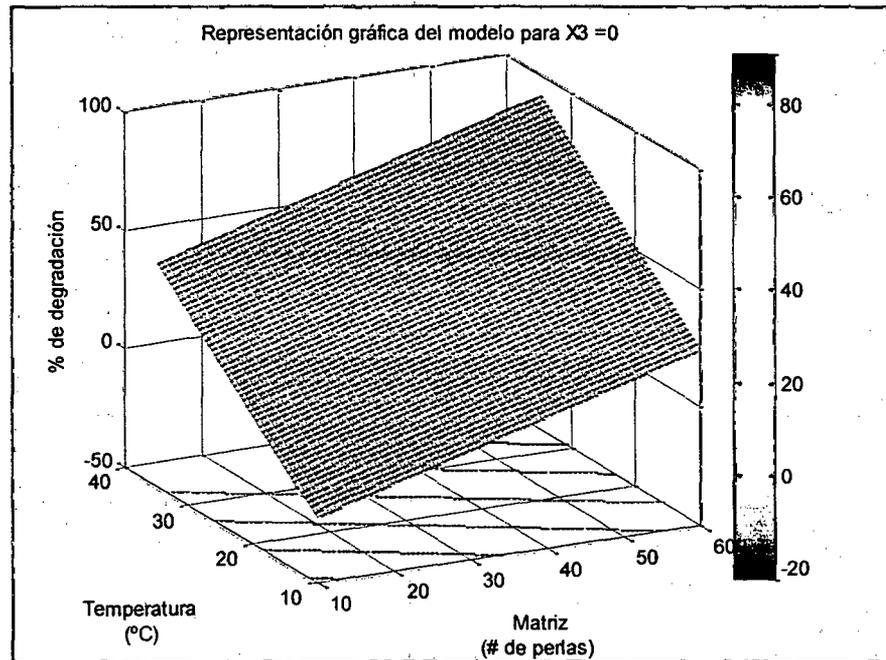


Figura 30: Representación gráfica de la escala natural para  $X_3=0$

#### Interpretación

Se observa que:

- La gráfica señalada es un plano en el espacio con pendiente positiva.
  - El porcentaje de degradación aumenta a medida que se incrementa la temperatura y el número de perlas de alginato de calcio (matriz).
  - El incremento del porcentaje de degradación es directamente proporcional al número de perlas y temperatura aplicada.
- Para  $X_2=0$ , su modelo matemático a escala natural es:

$$Y = 9.938 + 0.936Z_1 - 0.197Z_3 \quad [4.11]$$

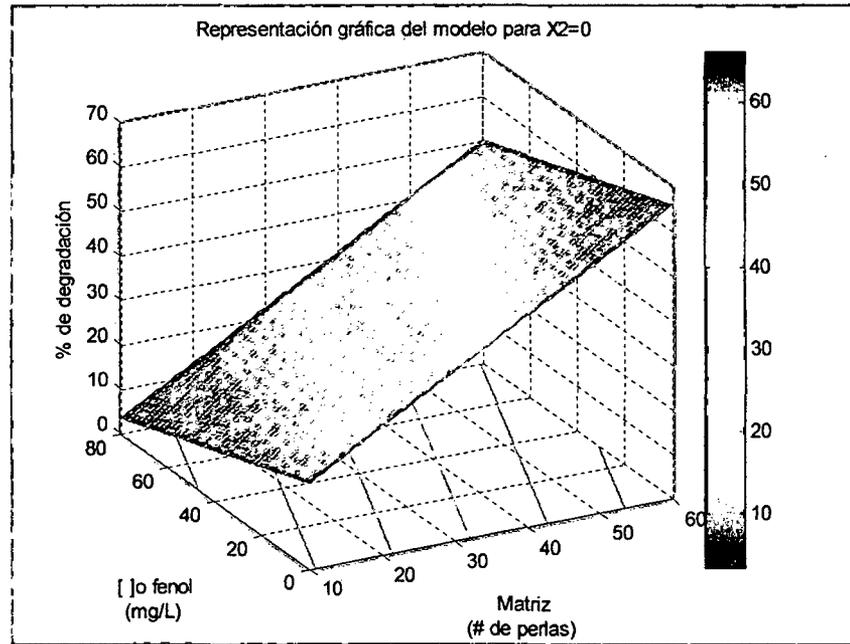


Figura 31: Representación gráfica de la escala natural para  $X_2=0$

### Interpretación

Se observa que:

- La gráfica señalada es un plano en el espacio con pendiente positiva en el incremento de la matriz y pendiente negativa con el aumento de la concentración inicial de fenol.
  - La concentración inicial del fenol influye directamente en el porcentaje de degradación.
  - La eficiencia de degradación es directamente proporcional al número de perlas e inversamente proporcional a la concentración inicial del fenol.
- Para  $X_1=0$ , su modelo matemático a escala natural es:

$$Y = -5.538 + 2.661Z_2 - 0.197Z_3 \quad [4.12]$$

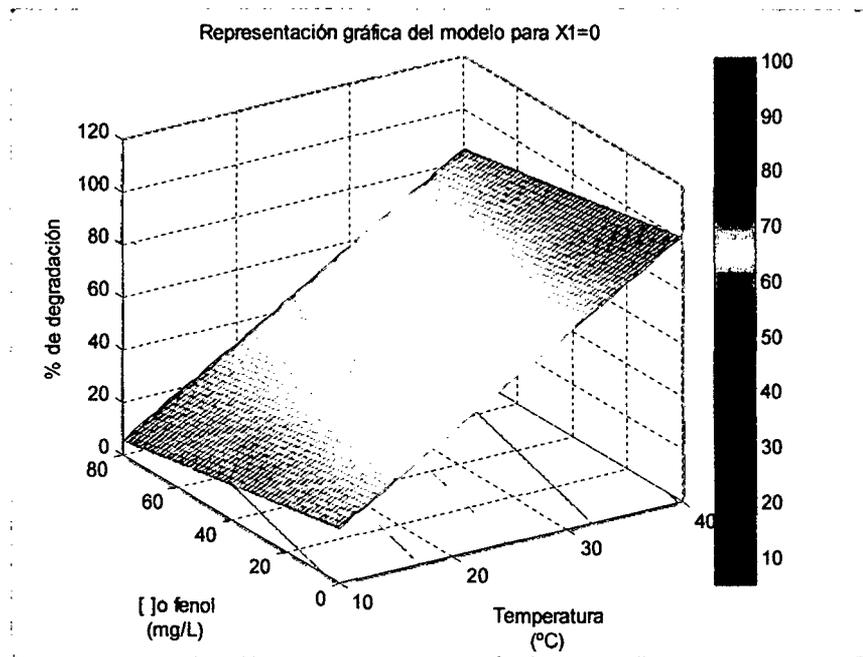


Figura 32: Representación gráfica de la escala natural para  $X_1=0$

### Interpretación

Se observa que:

- La gráfica señalada es un plano en el espacio con pendiente positiva en el incremento de la temperatura y pendiente negativa con el aumento de la concentración inicial del fenol.
- El incremento del porcentaje de degradación es directamente proporcional a la temperatura e inversamente proporcional concentración inicial del fenol.

#### 4.3.2. Etapa de optimización final: diseño central compuesto

Tabla 21: Valores del diseño central compuesto.

	$2^k$		2K		$n_o$
Niveles	+1	-1	+1.682	-1.682	0
Matriz (# de perlas)	55	37	46	30.862≈31	61.138≈61
Temperatura (°C)	28	16	22	11.908≈12	32.092≈32
[ ] <sub>o</sub> fenol (mg/L)	70	30	50	16.36≈16	83.64≈84

\*Nota: Los valores de 2K, se obtuvieron por la siguiente metodología:  $k \cdot 1.682 - \text{central} + 1.682 + \text{central}$ .

Tabla 22: Variables del DCC con su respectiva respuesta.

Nº	X <sub>0</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	Y (mg/L)	% degradación
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	21.536	28.21
2	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	17.236	42.55
3	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	-1	16.480	45.07
4	1	1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	8.241	72.53
5	1	-1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	59.327	15.25
6	1	1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	54.090	22.73
7	1	-1	1	1	1	1	1	-1	-1	1	34.742	50.37
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22.058	68.49
9	1	-1.682	0	0	2.829124	0	0	0	0	0	36.690	26.62
10	1	1.682	0	0	2.829124	0	0	0	0	0	25.283	57.90
11	1	0	-1.682	0	0	2.829124	0	0	0	0	45.491	9.02
12	1	0	1.682	0	0	2.829124	0	0	0	0	17.660	64.68
13	1	0	0	-1.682	0	0	2.829124	0	0	0	5.740	64.13
14	1	0	0	1.682	0	0	2.829124	0	0	0	40.79	51.44
15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24.283	51.43
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24.730	50.54
17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23.060	53.88
18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23.850	52.30
19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24.570	50.86
20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23.550	52.90

El diseño central compuesto está descrito por la ecuación de segundo orden, con el siguiente modelo matemático.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \varepsilon \quad [3.2]$$

Hallando los valores de los coeficientes por el método matricial, en aplicación de la siguiente fórmula.

$$B_j = [X^T * X]^{-1} * [X^T * Y] \quad [4.13]$$

A continuación, se tiene el modelo matemático para el diseño central compuesto en escala codificada.

$$Y = 51.628 + 8.785X_1 + 16.202X_2 - 3.869X_3 - 4.051X_1^2 - 5.964X_2^2 + 1.439X_3^2 + 2.970X_1X_2 - 2.025X_1X_3 + 4.255X_2X_3 \quad [4.14]$$

La ecuación descrita también se puede expresar como:

$$Y = 51.628 + 8.785 * \text{Matriz} + 16.202 * \text{Temperatura} - 3.869 * [\text{]o Fenol} - 4.051 * \text{Matriz} * \text{Matriz} - 5.964 * \text{Temperatura} * \text{Temperatura} + 1.439 * [\text{]o Fenol} * [\text{]o Fenol} + 2.970 * \text{Matriz} * \text{Temperatura} - 2.025 * \text{Matriz} * [\text{]o Fenol} + 4.255 \text{Temperatura} * [\text{]o Fenol} \quad [4.15]$$

Tabla 23: Análisis de varianza para el diseño central compuesto.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	Significancia	F <sub>tabla</sub> α = 0.01
X <sub>1</sub>	720.156	1	720.156	879.419	>	10
X <sub>2</sub>	2449.572	1	2449.572	2991.296	>	10
X <sub>3</sub>	139.733	1	139.733	170.635	>	10
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	17071.351	1	17071.351	20846.686	>	10
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	15329.541	1	15329.541	18719.674	>	10
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	22590.078	1	22590.078	27585.881	>	10
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	28.227	1	28.227	34.469	>	10
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	13.122	1	13.122	16.024	>	10
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	57.936	1	57.936	70.749	>	10
Error	8.189	10	0.8189	1		
Total	58407.905	19				

Para un nivel de significancia de 0.01, con F<sub>1,10</sub>, se obtuvo 10.00, con un coeficiente de determinación de R<sup>2</sup> = 0.9998, R<sup>2</sup> ajustado = 0.9997.

### Interpretación

Se tiene que:

- Si F<sub>0</sub> > F<sub>1,10</sub>, significa que el modelo se ajusta a la ecuación hallada.
- Los términos lineales X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, los términos cuadráticos X<sub>1</sub><sup>2</sup>, X<sub>2</sub><sup>2</sup>, X<sub>3</sub><sup>2</sup>, y los términos de interacción X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>, X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>, X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>, son significativos, para α = 0.01, por lo tanto los parámetros mencionados son importantes para el proceso de la biodegradación del fenol.
- El valor hallado de R<sup>2</sup> = 0.9998; con R<sup>2</sup> ajustado = 0.9997, nos indican que el modelo ajustado explica el 99.97 % de la variabilidad del rendimiento.

La ecuación [4.14] también se puede expresar en su escala natural <sup>(61)</sup>.

$$Y_{est} = a_0 + \sum_{i=1}^k a_i Z_i + \sum_{i=1}^k a_{ii} Z_i^2 + \sum_{i,j=1}^k a_{ij} Z_i Z_j \quad [4.16]$$

$$a_0 = b_0 - \sum_{i=1}^k b_i \varepsilon_i + \sum_{i,u=1}^k b_{iu} \varepsilon_i \varepsilon_u + \sum_{i=1}^k b_{ii} \varepsilon_i^2 \quad [4.17]$$

$$a_i = \frac{b_i}{\Delta Z_i} - 2 * \frac{b_{ii}}{\Delta Z_i} * \varepsilon_i - \frac{b_{ij}}{\Delta Z_i} * \varepsilon_u \quad [4.18]$$

$$a_{ii} = \frac{b_{ii}}{\Delta Z_i^2} \quad [4.19]$$

$$a_{ij} = \frac{b_{ij}}{\Delta Z_i * \Delta Z_j} \quad [4.20]$$

Donde:

$\varepsilon_i, \varepsilon_u$ : Relación entre  $Z^o$  y  $\Delta Z$ .

$\Delta Z_i, \Delta Z_j$ : Radio del diseño.

$b_0, b_i, b_{ii}, b_{iu}, b_{ij}$ : Coeficientes del modelo lineal.

$a_0$ : Término independiente del modelo matemático a escala natural.

$a_i$ : Coeficientes de los términos lineales del modelo a escala natural.

$a_{ii}$ : Coeficientes del término cuadrático del modelo a escala natural.

$a_{ij}$ : Coeficientes del término de interacción del modelo a escala natural.

Aplicando las fórmulas descritas se tiene:

$$Y_{est} = -151.231 + 4.929Z_1 + 5.687Z_2 - 0.816Z_3 - 0.050Z_1^2 - 0.166Z_2^2 + 0.004Z_3^2 + 0.055Z_1Z_2 - 0.011Z_1Z_3 + 0.035Z_2Z_3 \quad [4.21]$$

– Análisis de varianza para el DCC

Análisis de significancia de los coeficientes:

- Cálculo de la desviación estándar del error experimental.

$$SS_E = \sum_{i=1}^{no} (Y_i^o - \bar{Y}^o)^2 \quad [4.22]$$

$$MS_E = \frac{SS_E}{f_2} \quad [4.23]$$

$$S_E = \sqrt{MS_E} \quad [4.24]$$

Donde:

$Y^0$ : Réplicas en el punto central del diseño.

$n_0$ : Número de réplicas en el centro del diseño.

$N$ : Número de pruebas experimentales.

$\bar{Y}^0$ : Promedio de todas las réplicas del punto central del diseño.

$SS_E$ : Suma de cuadrados del error en el punto central del diseño.

$f_2$ : Grados de libertad para el error experimental.

$MS_E$ : Suma de cuadrados para  $f_2$ .

$S_E$ : Desviación estándar del error experimental.

- Cálculo de la variancia asociada a cada coeficiente.

$$Sb_j = C_{jj}^{1/2} * S_E \quad [4.25]$$

- Cálculo del test de Student.

$$t_j = \frac{|b_j|}{Sb_j} \quad [4.26]$$

Donde:

$Sb_j$ : Desviación estándar asociado a los coeficientes

$C_{jj}$ : Elementos de la diagonal de la matriz de correlación  $(X^T * X)^{-1}$ .

$t_j$ : Test de Student.

$b_j$ : Coeficientes del modelo lineal.

- Aplicando las fórmulas, se tienen los siguientes resultados.

$$\bar{Y}^0 = 51.985$$

$$SS_E = 8.189$$

$$MS_E = 1.637$$

$$S_E = 1.279$$

Tabla 24: Análisis de significancia.

Cód.	S <sub>E</sub>	(C <sub>ij</sub> ) <sup>0.5</sup>	Sb <sub>j</sub>	b <sub>j</sub>	t <sub>j</sub>	Significancia
X <sub>1</sub>	1.28	0.271	0.34688	8.785	25.326	Si
X <sub>2</sub>	1.28	0.271	0.34688	16.202	46.708	Si
X <sub>3</sub>	1.28	0.271	0.34688	-3.87	11.156	Si
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1.28	0.263	0.33664	-4.051	12.034	Si
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1.28	0.263	0.33664	-5.964	17.716	Si
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1.28	0.263	0.33664	1.439	4.274	Si
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1.28	0.354	0.45312	2.97	6.554	Si
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1.28	0.354	0.45312	-2.025	4.469	Si
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1.28	0.354	0.45312	4.255	9.390	Si

### Interpretación

Se observa que:

- Para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , se tiene  $F_{5,20}$  con 2.71 de valor.
- Si  $t_j > F_{5,20}$ , significa que los coeficientes del término son significativas.
- Las variables X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> son significativas en el término lineal, al igual que en los términos cuadráticos X<sub>1</sub><sup>2</sup>, X<sub>2</sub><sup>2</sup>, X<sub>3</sub><sup>2</sup> e interacciones X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>, X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>, X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>.

– **Evaluación del modelo matemático**

- Cálculo de residuales.

Tabla 25: Cálculo de residuales.

Y	$Y_{est} = X \cdot B_j$	$Y - Y_{est}$
28.21	27.135	1.075
42.55	42.815	-0.265
45.07	45.089	-0.019
72.53	72.649	-0.119
15.25	14.935	0.315
22.73	22.515	0.215
50.37	49.909	0.461
68.49	69.369	-0.879
26.62	25.391	1.229
57.90	54.944	2.956
9.02	7.503	1.517
64.68	62.007	2.673
64.13	62.208	1.922
51.44	49.190	2.250
51.43	51.628	-0.198
50.54	51.628	-1.088
53.88	51.628	2.252
52.30	51.628	0.672
50.86	51.628	-0.768
52.90	51.628	1.272

Con el fin de evaluar la ecuación [4.14] se obtuvo la tabla 25 con las siguientes figuras.

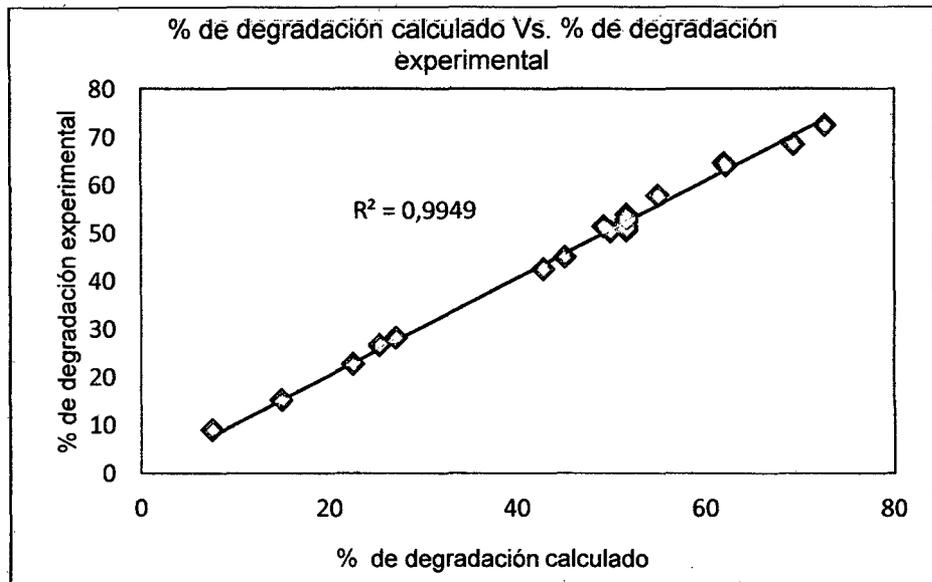


Figura 33: Porcentaje de degradación calculado Vs. porcentaje de degradación experimental.

Mediante la figura 33 se obtuvo el coeficiente de correlación  $R^2 = 0.9949$ , el valor de  $R^2$  obtenido propone una confiabilidad del 99.49% en los experimentos realizados.

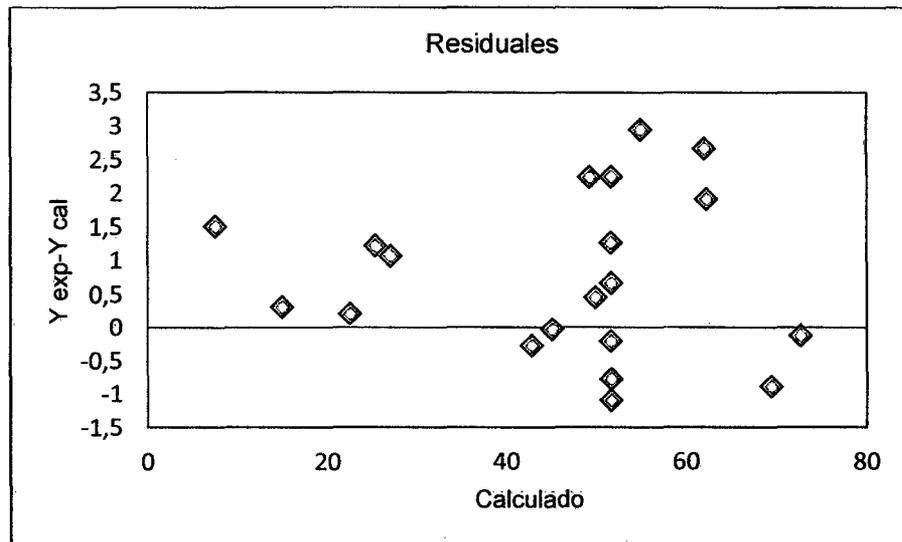


Figura 34: Valores de los residuales en la degradación del fenol calculado.

Los valores obtenidos de los residuales nos indican la relación entre las variables independientes (matriz, temperatura, y concentración inicial de fenol) con la variable dependiente (% de degradación del fenol).

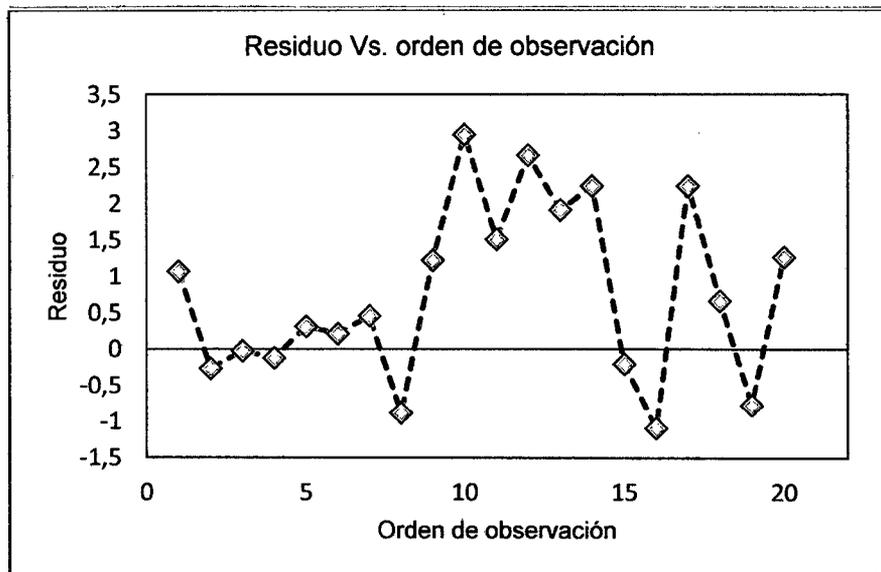


Figura 35: Residuo Vs. orden temporal

La figura 35 muestra la independencia de datos, es decir el comportamiento de los residuos frente al orden temporal de forma aleatoria alrededor de cero.

- Cálculo de la suma de los cuadrados del residual.

$$SS_R = \sum_{i=1}^N (Y_i - Y_{est})^2 \quad [4.27]$$

Donde:

N: Número de pruebas experimentales.

$Y_i$ : Valores de respuesta del diseño experimental.

$Y_{est}$ : Valores predichos o estimados de la regresión.

$SS_R$ : Suma de cuadrados del residual.

- Cálculo de la suma de cuadrados de la falta de ajuste.

$$SS_{FA} = SS_R - SS_E \quad [4.28]$$

Donde:

$SS_{FA}$ : Suma de cuadrados de la falta de ajuste.

$SS_R$ : Suma de cuadrados del residual.

$SS_E$ : Suma de cuadrados del error en el punto central del diseño.

- Cálculo de la suma de cuadrados de la falta de ajuste para  $f_2$ .

$$MS_{FA} = \frac{SS_{FA}}{f_2} \quad [4.29]$$

Donde:

$MS_{FA}$ : Suma de cuadrados de la falta de ajuste para  $f_2$ .

$SS_{FA}$ : Suma de cuadrados de la falta de ajuste.

$f_2$  : Grados de libertad para el error experimental.

- Cálculo del valor del modelo F.

$$F = \frac{MS_{FA}}{MS_E} \quad [4.30]$$

Donde:

F : Valor del modelo de diseño.

$MS_{FA}$ : Suma de cuadrados de la falta de ajuste para  $f_2$ .

$MS_E$  : Suma de cuadrados para  $f_2$ .

- Aplicando las fórmulas se tiene los siguientes resultados.

$$SS_R = 39.776$$

$$SS_{FA} = 31.587$$

$$MS_{FA} = 6.317$$

$$F = 3.857$$

Tabla 26: Cálculos involucrados en el DCC.

Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Y	28.21	42.55	45.07	72.53	15.25	22.73	50.37	68.49	26.62	57.90	9.02	64.68	64.13	51.44	51.43	50.54	53.88	52.3	50.86	52.9
Y est.	27.135	42.815	45.089	72.649	14.935	22.515	49.909	69.369	25.391	54.944	7.503	62.007	62.208	49.19	51.628	51.628	51.628	51.628	51.628	51.628
Y res.	1.075	-0.265	-0.019	-0.119	0.315	0.215	0.461	-0.879	1.229	2.956	1.517	2.673	1.922	2.250	-0.198	-1.088	2.252	0.672	-0.768	1.272
Test de buen modelo	Campo	SC		Fo	MS	F modelo	F tabla	Buen modelo												
	Residual	39.776		10	3.9776	3.857	5.05	Si												
	Error	8.189		5	1.637															
	F.A.	31.587		5	6.317															

### Interpretación

Se observa que:

- Para un nivel de significancia de 0.05, para  $F_{5,5}$ , se obtiene un valor de 5.05.
- Si  $F_{5,5} > F$ , significa que el modelo se ajusta o representa adecuadamente a los datos experimentales:  $5.05 > 3.857$ .

– **Análisis de máximos y mínimos.**

- Análisis del modelo matemático.

$$Y = 51.628 + 8.785X_1 + 16.202X_2 - 3.869X_3 - 4.051X_1^2 - 5.964X_2^2 + 1.439X_3^2 + 2.970X_1X_2 - 2.025X_1X_3 + 4.255X_2X_3 \quad [4.14]$$

$$\frac{\partial^2 Y}{\partial X_1^2} = -8.102 \quad [4.31]$$

$$\frac{\partial^2 Y}{\partial X_2^2} = -11.928 \quad [4.32]$$

$$\frac{\partial^2 Y}{\partial X_3^2} = 2.878 \quad [4.33]$$

$$\frac{\partial^2 Y}{\partial X_1 \partial X_2} = 2.970 \quad [4.34]$$

$$\frac{\partial^2 Y}{\partial X_1 \partial X_3} = -2.025 \quad [4.35]$$

$$\frac{\partial^2 Y}{\partial X_2 \partial X_3} = 4.255 \quad [4.36]$$

- Aplicando el criterio de la matriz Hessiana se tiene.

$$H_{11} = -8.102$$

$$H_{22} = \begin{bmatrix} -8.102 & 2.970 \\ 2.970 & -11.928 \end{bmatrix} = 87.819 \quad [4.37]$$

$$H_{33} = \begin{bmatrix} -8.102 & 2.970 & -2.025 \\ 2.970 & -11.928 & 4.255 \\ -2.025 & 4.255 & 2.878 \end{bmatrix} = 397.163 \quad [4.38]$$

Por los resultados obtenidos de  $H_{11} = -8.102$ ,  $H_{22} = 87.819$ , y  $H_{33} = 397.163$  significa que el modelo matemático tiene un máximo en el rango investigado.

- Hallando las derivadas parciales para cada variable.

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = 8.785 - 8.102X_1 + 2.970X_2 - 2.025X_3 \quad [4.39]$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = 16.202 - 11.928X_2 + 2.970X_1 + 4.255X_3 \quad [4.40]$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_3} = -3.869 + 2.878X_3 - 2.025X_1 + 4.255X_2 \quad [4.41]$$

- Resolviendo el sistema de ecuaciones se tiene los valores óptimos de cada variable.

$$Z_1 = 61.72 \approx 62$$

$$Z_2 = 32.65 \approx 33$$

$$Z_3 = 48.98 \approx 49$$

Con un valor máximo de biodegradación de 73.78 %, para un tiempo de contacto de 2 horas.

#### – Gráfica del modelo

$$Y = 51.628 + 8.785X_1 + 16.202X_2 - 3.869X_3 - 4.051X_1^2 - 5.964X_2^2 + 1.439X_3^2 + 2.970X_1X_2 - 2.025X_1X_3 + 4.255X_2X_3 \quad [4.14]$$

- Para  $X_3 = 0$ ;  $Y = 51.628 + 8.785X_1 + 16.202X_2 - 4.051X_1^2 - 5.964X_2^2 + 2.970X_1X_2$  [4.42]

Decodificando:

$$Y = -183.029 + 4.367Z_1 + 7.459Z_2 - 0.050Z_1^2 - 0.165Z_2^2 + 0.055Z_1Z_2 \quad [4.43]$$

Hallando los valores óptimos para las variables.

$$Z_1 = 61.67 \approx 62 \text{ unidades de perlas inmovilizadas}$$

$$Z_2 = 32.75 \approx 33 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$Y_{\text{máx}} = 73.79 \% \text{ (biodegradación del fenol).}$$

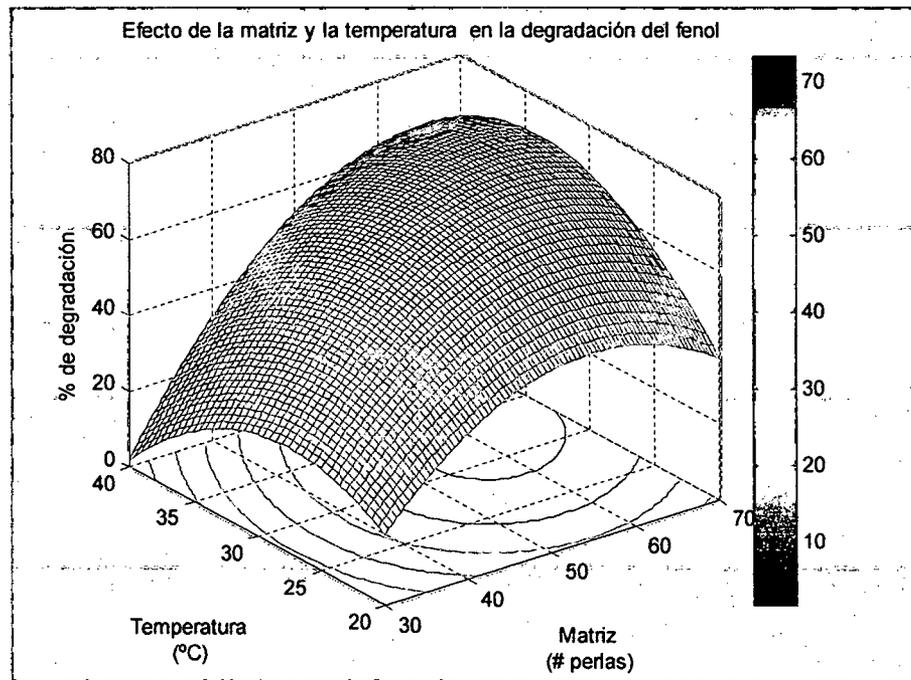


Figura 36: Interacción de la matriz con la temperatura con respecto al porcentaje de degradación del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* basado en la MSR.

### Interpretación

Se observa que:

- El tipo de curvatura que presenta el efecto de la biomasa inmovilizada en la matriz de alginato de calcio y temperatura es de elipse con un punto máximo y cóncavo hacia abajo
- La variable dependiente tiene una máxima degradación cuando la matriz y la temperatura se encuentra en el nivel superior, lo que confirma el efecto significativo de esta interacción.
- La ecuación decodificada [4.43] describe que la matriz y la temperatura son de efecto positivo, hecho que es observado en la figura 36.

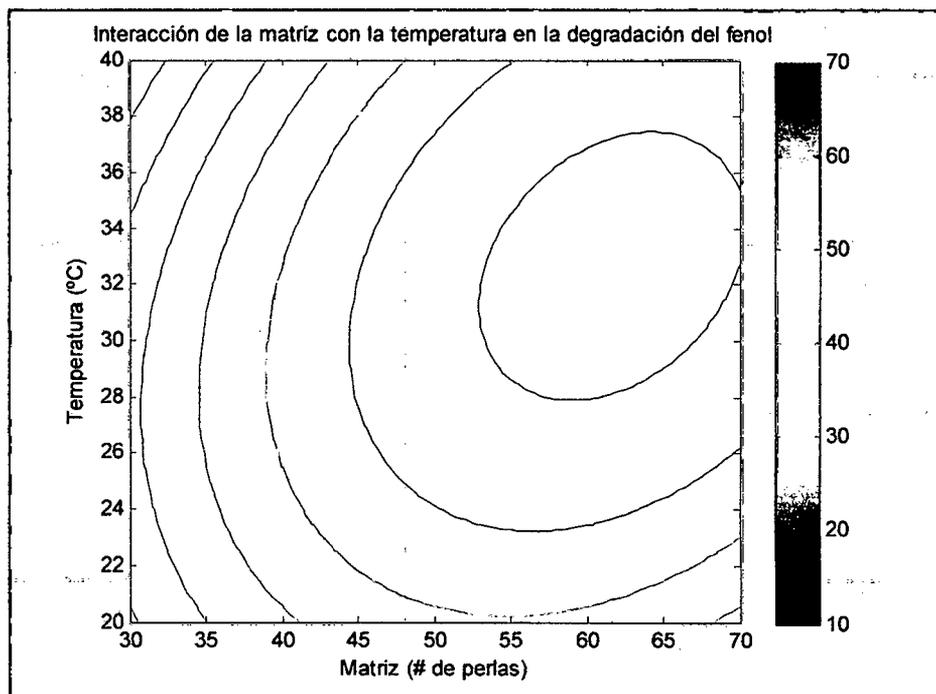


Figura 37: Mapa de contornos de MSR de interacción de la matriz con la temperatura en la degradación del fenol.

Las líneas representan los valores del parámetro respuesta utilizada, cuyos valores se encuentran al costado del gráfico.

### Interpretación

Se observa que:

- El incremento del porcentaje de degradación es directamente proporcional al número de perlas y a la temperatura en que se encuentra.
  - La máxima degradación se encuentra en 62 unidades de perlas de alginato de calcio con temperatura de trabajo de 33 °C en la degradación del fenol con eficiencia de remoción del 73.79%.
- Para  $X_2 = 0$ ;  $Y = 51.628 + 8.785X_1 - 3.869X_3 - 4.051X_1^2 + 1.439X_3^2 - 2.025X_1X_3$  [4.44]

Decodificando:

$$Y = -106.305 + 6.139Z_1 - 0.036Z_3 - 0.050Z_1^2 + 0.004Z_3^2 - 0.011Z_1Z_3$$
 [4.45]

Hallando los valores óptimos para las variables.

$$Z_1 = 51.72 \approx 52 \text{ unidades de perlas inmovilizadas}$$

$Z_3 = 85.84 \approx 86$  mg/L de fenol

$Y_{\text{máx}} = 50.95\%$  (biodegradación del fenol).

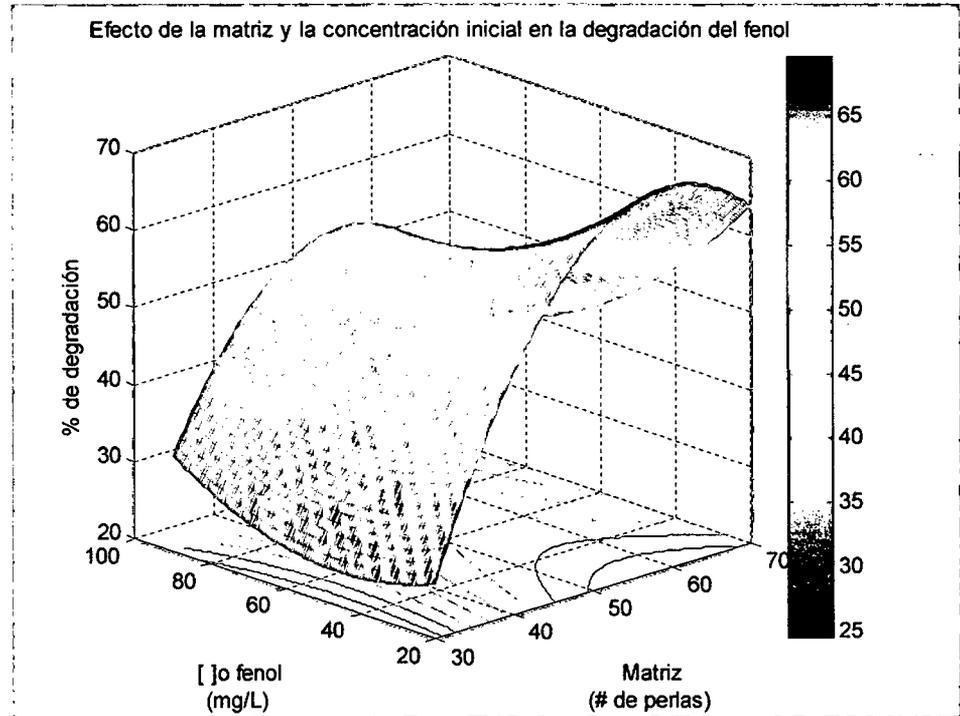


Figura 38: Interacción de la matriz con la concentración inicial con respecto al porcentaje de degradación del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* basado en la MSR.

### Interpretación

Se observa que:

- El efecto de interacción entre la matriz y concentración inicial de fenol, tienen un valor máximo que se encuentra en el nivel alto y bajo, respectivamente. Es decir a mayor cantidad de perlas y a menor concentración de fenol la degradación es eficaz
- El tipo de curvatura que presenta el efecto de la matriz y concentración inicial de fenol es del tipo curva silla de montar con puntos máximo y mínimo hacia abajo.
- La variable dependiente aumenta con el incremento del número de perlas (nivel superior) y con la disminución de la concentración inicial (nivel inferior).
- La ecuación decodificada [4.45] describe que la matriz es de efecto positivo y la concentración inicial es de efecto negativo, hecho que es observado en la figura 38.

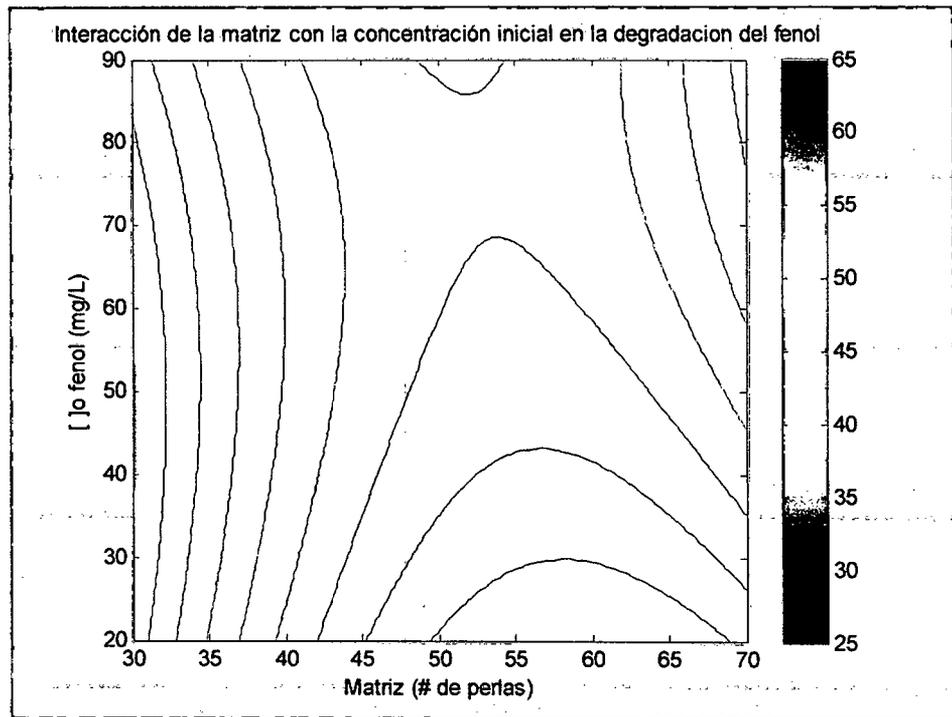


Figura 39: Mapa de contornos de MSR de interacción de la matriz con la concentración inicial en la degradación del fenol.

Las líneas representan los valores del parámetro respuesta utilizada, cuyos valores se encuentran al costado del gráfico.

### Interpretación

Se observa que:

- La eficiencia de biodegradación es directamente proporcional al número de perlas e inversamente proporcional a la concentración inicial de fenol.
  - La máxima degradación se encuentra en 52 unidades de perlas de alginato de calcio y la concentración inicial en 86 mg/L de fenol con eficiencia de remoción del 50.95%.
- Para  $X_1 = 0$ ;  $Y = 51.628 + 16.202X_2 - 3.869X_3 - 5.964X_2^2 + 1.439X_3^2 + 4.255X_2X_3$  [4.46]

Decodificando:

$$Y = -30.289 + 8.216Z_2 - 1.333Z_3 - 0.165Z_2^2 + 0.004Z_3^2 + 0.035Z_2Z_3$$

[4.47]

Hallando los valores óptimos para las variables.

$$Z_2 = 29.22 \approx 29 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$Z_3 = 41.31 \approx 41 \text{ mg/L de fenol}$$

$$Y_{\text{máx}} = 62.21\% \text{ (biodegradación del fenol).}$$

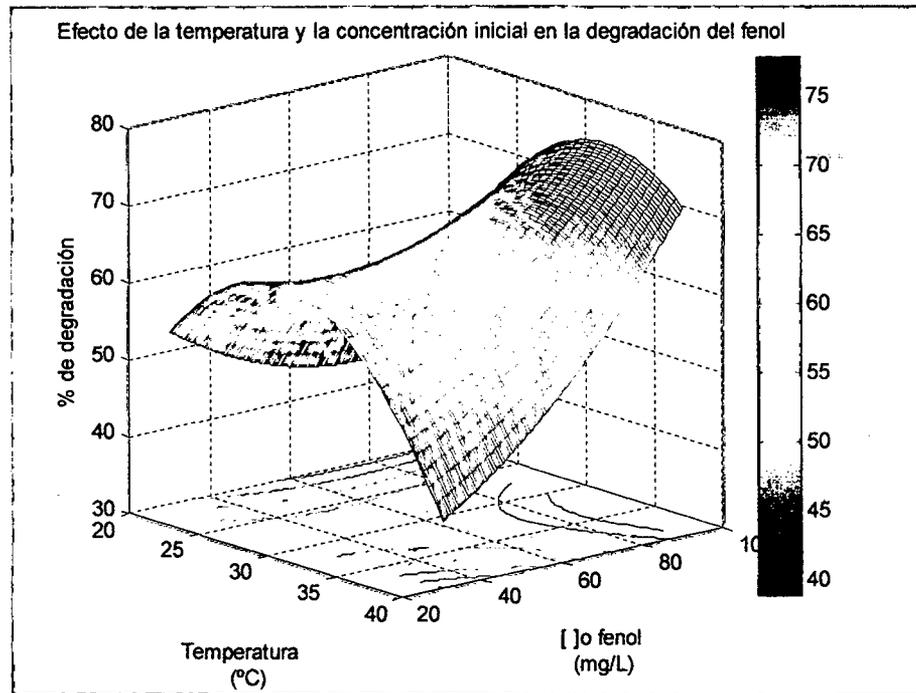


Figura 40: Interacción de la temperatura con la concentración inicial con respecto al porcentaje de degradación del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* basado en la MSR.

### Interpretación

Se observa que:

- El tipo de curvatura que presenta el efecto temperatura y concentración inicial de fenol es del tipo silla de montar con puntos máximo y mínimo hacia abajo.
- La variable dependiente aumenta con el incremento de la temperatura al nivel superior y con la disminución de la concentración inicial de fenol al nivel inferior.
- La ecuación decodificada [4.47] describe que la temperatura es de efecto positivo y la concentración inicial es de efecto negativo, hecho que es observado en la figura 40.

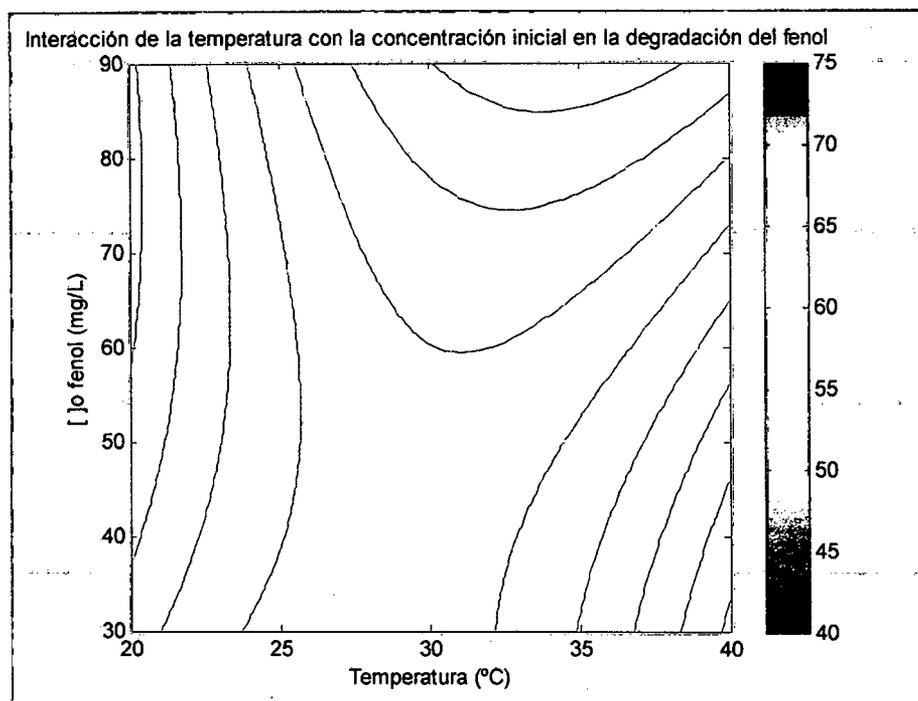


Figura 41: Mapa de contornos de MSR de interacción de la temperatura con la concentración inicial en la degradación del fenol.

Las líneas representan los valores del parámetro respuesta utilizada, cuyos valores se encuentran al costado del gráfico.

#### Interpretación

Se observa que:

- La eficiencia de la degradación es directamente proporcional a la temperatura e inversamente proporcional a la concentración inicial del fenol.
- La máxima degradación se encuentra a una temperatura de 29 °C a una concentración inicial de 41 mg/L de fenol con eficiencia de remoción del 62.21%.

#### 4.4. Modelo de isotermas

Tabla 27: Valores de concentración inicial y concentración en equilibrio de la solución acuosa de fenol con tiempo de contacto de 2 horas.

$C_i$	$C_e$	$q_e$	$C_e/q_e$	$\text{Log } C_e$	$\text{Log } q_e$
16	5.740	1.170	4.904	0.759	0.068
50	24.007	2.965	8.097	1.380	0.472
84	40.790	4.929	8.275	1.610	0.693

La tabla 27 muestra que a un tiempo de contacto de 2 horas se obtiene concentraciones en equilibrio de 5.740, 24.007 y 40.790 mg/L de fenol para la matriz de 2.63 g para c/u (46 unidades de perlas de alginato de calcio con diámetro de 0.319 cm, cada perla contiene  $32 \times 10^5$  células de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas), en disoluciones de concentraciones iniciales de 16, 50 y 84 mg/L, respectivamente, con volumen de 300 mL en aireación constante de 0.046 vvm a temperatura de 22°C, donde la concentración de fenol en equilibrio ( $C_e$ ) y la capacidad de adsorción ( $q_e$ ) están relacionadas directamente con la concentración inicial de fenol.

#### 4.4.1. Isoterma de Freundlich

Si la ecuación de Freundlich está designa por:

$$\log q_e = \log K_F + b_F \log C_e \quad b_F = \frac{1}{n}; n \neq 0 \quad [2.4]$$

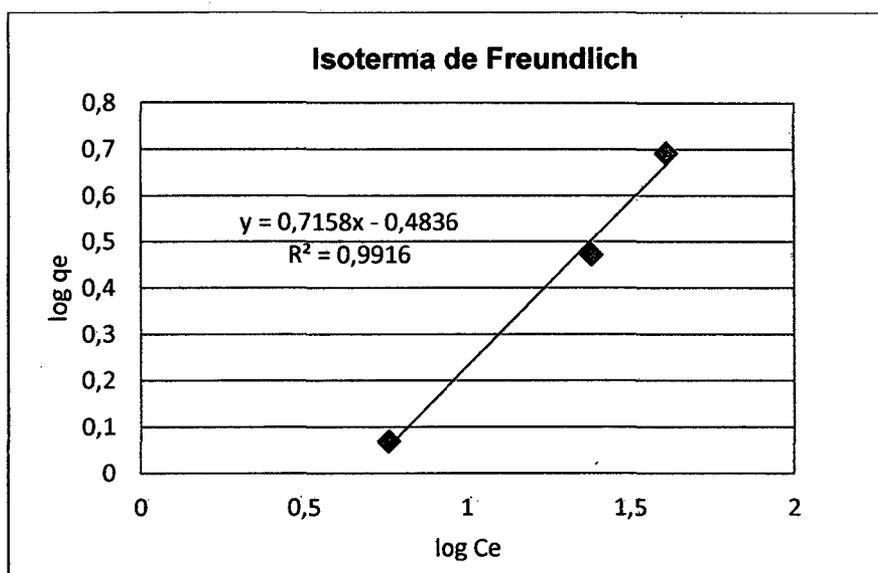


Figura 42: Isoterma de Freundlich para la adsorción-biodegradación del fenol utilizando 2.63 g de matriz, en disoluciones de concentración inicial de 16, 50, y 84 mg/L de volumen 300 mL en aireación constante de 0.046 vvm a temperatura de 22°C con tiempo de contacto de 2 horas.

En similitud a la ecuación lineal de regresión:  $Y=a + mx$ , se tiene:

- Para concentraciones iniciales 16, 50 y 84 mg/L de fenol.

$$Y_{16,50,84} = 0.7158 * x - 0.4836 \quad [4.48]$$

- Hallando la constante  $K_F$ .

$$\log K_F = -0.4836$$

$$K_F = 10^{-0.4836} = 0.3283$$

- Hallando los valores teóricos de la cantidad de adsorbato biodegradado por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en matrices de alginato de calcio.

$$q_{e,16} = 10^{(-0.4836+0.7158*\log 5.74)} = 1.147 \text{ mg/g}$$

$$q_{e,50} = 10^{(-0.4836+0.7158*\log 24.007)} = 3.195 \text{ mg/g}$$

$$q_{e,84} = 10^{(-0.4836+0.7158*\log 40.79)} = 4.669 \text{ mg/g}$$

Tabla 28: Resultados de las constantes de la isoterma de Freundlich y valores teóricos calculados de la cantidad de adsorbato adsorbido-biodegradado por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en matrices de alginato de calcio.

Concentración inicial	16, 50 y 84 mg/L de fenol
$K_F$	0.328 L/mg
n	1.397
$b = 1/n$	0.7158
$R^2$	0.9916
$q_e$ cal. 16 mg/L de fenol	1.147mg/g
$q_e$ cal. 50 mg/L de fenol	3.195 mg/g
$q_e$ cal. 84 mg/L de fenol	4.669 mg/g

### Interpretación.

Se observa que:

- El coeficiente de relación  $R^2$  tiene el valor de 0.9916, para concentraciones iniciales de 16, 50 y 84 mg/L de fenol.
- Los valores teóricos obtenidos de la tabla 28 comparando con los valores experimentales de la tabla 27 de la cantidad de adsorbato-biodegradado por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en matrices de alginato de calcio se observa que los valores experimentales son cercanos a los valores teóricos hallados de modo que la experimentación es aceptada.
- Reemplazando los valores obtenidos en la ecuación [2.3], se tiene el siguiente modelo matemático que describe en la ecuación de Freundlich.

$$q_e = 0.328 * C_e^{0.7158} \quad [4.49]$$

#### 4.4.2. Isoterma de Langmuir

Si la ecuación de Langmuir está designada por:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{\max} * K_L} + \frac{C_e}{q_{\max}} \quad [2.6]$$

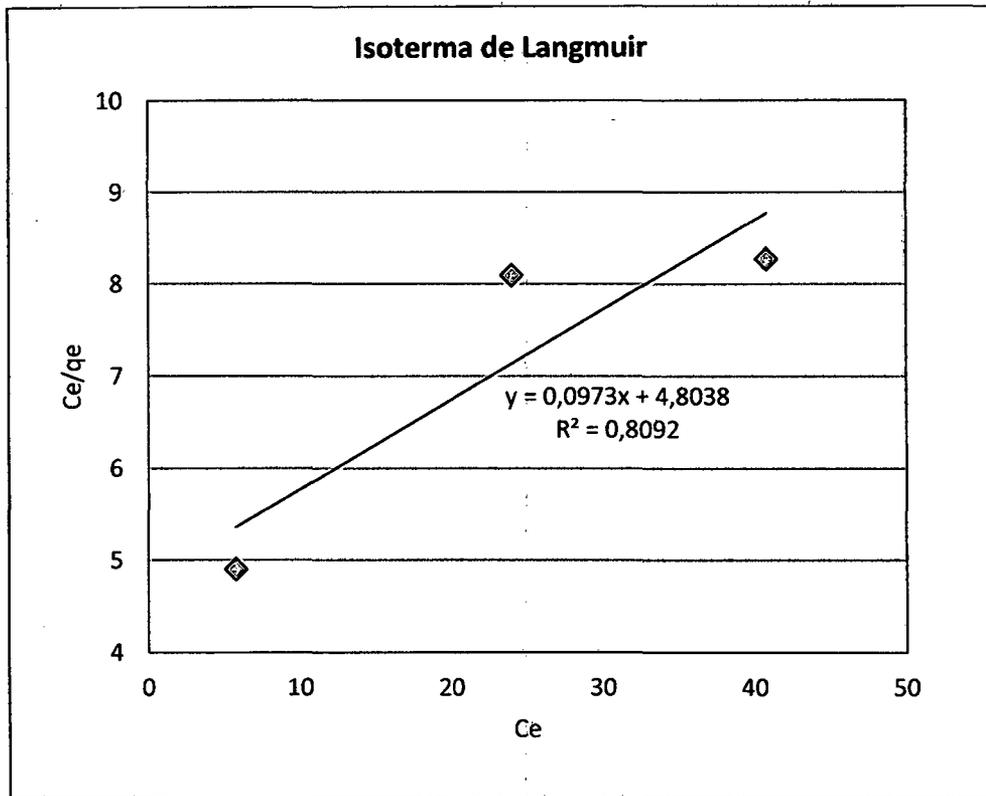


Figura 43: Isoterma de Langmuir para la adsorción-biodegradación del fenol utilizando 2.63 g de matriz, en disoluciones de concentración inicial de 16, 50, y 84 mg/L de volumen 300 mL en aireación constante de 0.046 vvm a temperatura de 22°C con tiempo de contacto de 2 horas.

En similitud a la ecuación lineal de regresión:  $Y=a + mx$ , se tiene:

- Para concentraciones iniciales 16, 50 y 84 mg/L de fenol.

$$Y_{16,50,84} = 0.0973 * x + 4.8038 \quad [4.50]$$

- Hallando la constante  $q_{max}$  y  $K_L$ .

$$q_{max} = \frac{1}{0.0973} = 10.277$$

$$K_L = \frac{1}{0.0973 * 4.803} = 0.020$$

- Hallando los valores teóricos de la cantidad de adsorbato biodegradado por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en matrices de alginato de calcio.

Reordenando la ec.2.5, se tiene

$$q_e = \frac{C_e}{\frac{1}{q_{max} * K_L} + \frac{C_e}{q_{max}}}$$

Reemplazando datos:

$$q_{e,16} = \frac{5,74}{\frac{1}{10,277 * 0,020} + \frac{5,74}{10,277}} = 1,070 \text{ mg/g}$$

Se tiene:  $q_{e, 50} = 3.362 \text{ mg/g}$ ,  $q_{e, 84} = 4.649 \text{ mg/g}$ .

Tabla 29: Resultados de las constantes de la isoterma de Langmuir y valores teóricos calculados de la cantidad de adsorbato adsorbido-biodegradado por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en matrices de alginato de calcio.

Concentración inicial	16, 50, y 84 mg/L de fenol
$q_{\max}$	10.277 mg/g
$K_L$	0.020
$R^2$	0.809
$q_e$ cal. 16 mg/L de fenol	1.070 mg/g
$q_e$ cal. 50 mg/L de fenol	3.362 mg/g
$q_e$ cal. 84 mg/L de fenol	4.649 mg/g

#### Interpretación.

Se observa que:

- El coeficiente de relación  $R^2$  tiene el valor de 0.809, para concentraciones iniciales de 16, 50 y 84 mg/L de fenol.
- Los valores teóricos obtenidos de la tabla 29 comparando con los valores experimentales de la tabla 27 de la cantidad de adsorbato-biodegradado por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en matrices de alginato de calcio se observa que los valores obtenidos de  $q_e$  teóricos disminuyen para las concentraciones iniciales de 16 y 84 mg/L de fenol a comparación del valor hallado de  $q_e$  para 50 mg/L el que incrementa su valor, esto se debe probablemente a que el microorganismo obtiene al fenol como cantidad máxima de carbono disponible <sup>(96)</sup>.
- Reemplazando los valores hallados en la ecuación [2.5], se tiene el siguiente modelo matemático que describe la ecuación de Langmuir.

$$q_e = \frac{10,277 * 0,020 * C_e}{1 + 0,020 * C_e} \quad [4.51]$$

En resumen, se tiene la siguiente tabla comparativa de ambas isotermas.

Tabla 30: Resumen comparativo de isotermas de adsorción-biodegradación del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en matrices de alginato de calcio.

Freundlich		Langmuir	
$K_F$	0.328	$K_L$	0.020
$n$	1.397	$q_{max}$	10.277
$1/n$	0.716	$R^2$	0.809
$R^2$	0.9916		

### Interpretación.

Se observa que:

- Los valores obtenidos de coeficientes de relación  $R^2$  de ambos modelos matemáticos describen que la isoterma de Freundlich modela mejor el proceso de adsorción-biodegradación de fenol por biomasa de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en matrices de alginato de calcio a comparación de la isoterma de Langmuir, por lo tanto, se asume que la matriz es de superficie heterogénea, donde los sitios activos son ocupados primero por enlaces fuertes, y dicha fuerza va creciendo a medida que los sitios activos son ocupados por el sorbato, por lo que no hay saturación (metabolización del fenol por la bacteria inmovilizada en geles de alginato de calcio).
- El resultado obtenido de  $1/n=0.7158$  y  $n = 1.397$  de la isoterma de Freundlich, por lo que representa, que el proceso es favorable en la adsorción-biodegradación del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en perlas de alginato de calcio.
- Por lo tanto, el modelo matemático de Freundlich, está representado por la siguiente ecuación.

$$q_e = 0.328 * C_e^{0.7158} \quad [4.49]$$

#### 4.5. Degradación del fenol presente en aguas residuales provenientes de los retretes de las aeronaves

##### 4.5.1. Caracterización de la muestra de aguas residuales

Con el propósito de obtener resultados de la degradación del fenol presente en aguas residuales por medio de *Pseudomonas aeruginosa*, se inició con la caracterización de la muestra, donde se analizaron los sólidos totales, fijos y volátiles, así como también sus parámetros fisicoquímicos. En la caracterización de los sólidos totales se consideró la mínima concentración de sólidos totales presentes en la muestra de agua residual proveniente de los retretes de las aeronaves para su tratamiento en el reactor, ya que los sólidos totales reales de la muestra afectarían al sistema de aireación, por lo tanto se consideró analizar la cantidad de sólidos totales que ingresaron al reactor de lotes sin que afecten el sistema de aireación.

Tabla 31: Resultados de sólidos totales de aguas residuales.

Resultado de sólidos					
	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	% error	Desviación estándar (s)
Sólidos totales (mg/L)	0.0621	0.0635	0.0628	2.205	0.001
Sólidos totales fijos (mg/L)	0.0401	0.0414	0.04075	3.140	0.001
Sólidos totales volátiles (mg/L)	0.0220	0.0221	0.02205	0.452	0

Tabla 32: Resultados de parámetros físico químico de aguas residuales.

Parámetro	Unidad	Valor
pH		7.886
Fenol	µg/mL	10.526
Conductividad eléctrica	mS/cm	7.47
Temperatura	°C	12

Con los resultados previos de la caracterización de la muestra de agua residual, se desarrollo la parte experimental de la remoción del fenol, en el reactor batch de 3.5 litros de capacidad se aplicó células de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de alginato de calcio (se empleó 20.13 gr. de geles de alginato de calcio equivalente a 238 perlas, cada perla contenía  $36 \times 10^5$  células de *Pseudomonas aeruginosa*, con un total de  $8\ 568 \times 10^5$  células inmovilizadas) con diámetro de 0.369 cm, en muestras de 3 L con

aireación constante de 0.018 vvm a temperaturas de 22 y 28 °C con tiempos de contacto de 2.75 y 4.5 h para concentraciones de iniciales de 10.526 mg/L de fenol (concentración real) y 20 mg/L de fenol (concentración y parámetros fisicoquímicos ajustadas), respectivamente.

Se propusieron valores de temperatura y número de perlas, mencionados para la obtención de la mayor cantidad de datos posible.

#### 4.5.1.1. Variación del pH y la conductividad eléctrica con el tiempo

La siguiente tabla muestra el reporte de la variación del pH y la conductividad eléctrica con respecto al tiempo para cada concentración inicial.

Tabla 33: Variación del pH y la conductividad eléctrica para la concentración de 10.526 µg/mL de fenol con tiempo de contacto de 2.75 h.

Tiempo correlativo (h)	Tiempo correlativo (min)	pH	Conductividad eléctrica (mS/cm)
0.00	0	7.886	7.47
0.25	15	8.185	7.40
0.50	30	8.212	7.33
0.75	45	8.24	7.305
1.00	60	8.26	7.28
1.25	75	8.24	7.26
1.50	90	8.248	7.23
1.75	105	8.251	7.19
2.00	120	8.246	7.16
2.25	135	8.322	7.07
2.50	150	8.288	6.99
2.75	165	8.288	6.87

Tabla 34: Variación del pH y la conductividad eléctrica para la concentración de 20 µg/mL de fenol con tiempo de contacto de 4.5 h.

Tiempo correlativo (h)	Tiempo correlativo (min)	pH	Conductividad eléctrica (mS/cm)
0.00	0	7.027	8.154
0.50	30	7.525	8.077
1.00	60	7.710	8.000
1.50	90	7.882	7.942
2.00	120	8.001	7.885
2.50	150	8.249	7.808
3.00	180	8.311	7.692
3.50	210	8.440	7.673
4.00	240	8.447	7.662
4.50	270	8.458	7.632

Las tablas 33 y 34 muestran la variación del pH con la temperatura impuesta de 22 y 28 °C, respectivamente, esto se debe precisamente por la producción de metabolitos de las bacterias, el que también se observó en la tabla 10 donde el pH varió con el proceso de adaptación de las bacterias.

La variación de la conductividad eléctrica con el tiempo mide el consumo de sales minerales que pueda contener la muestra así este también es un indicador del proceso de la metabolización del fenol (las sales minerales ayudan a la mineralización del fenol), descrito en las figuras 46 y 47.

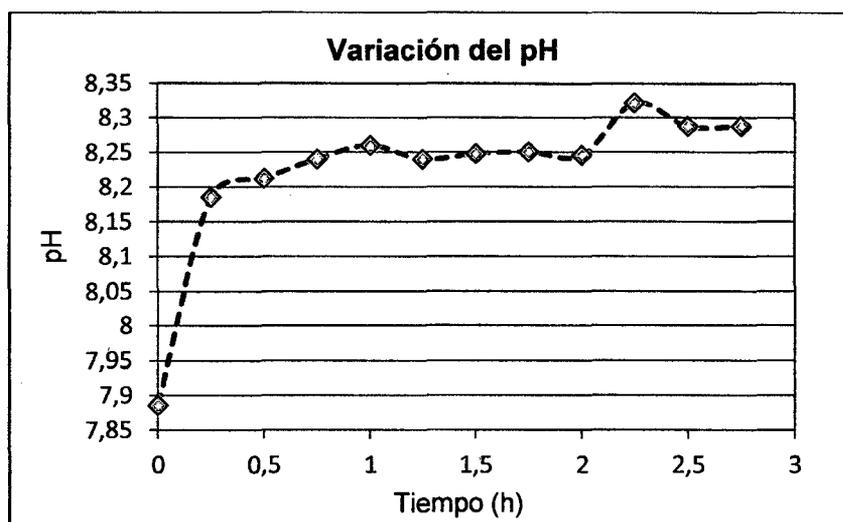


Figura 44: Variación del pH con el tiempo para la concentración de 10.526 µg/mL de fenol

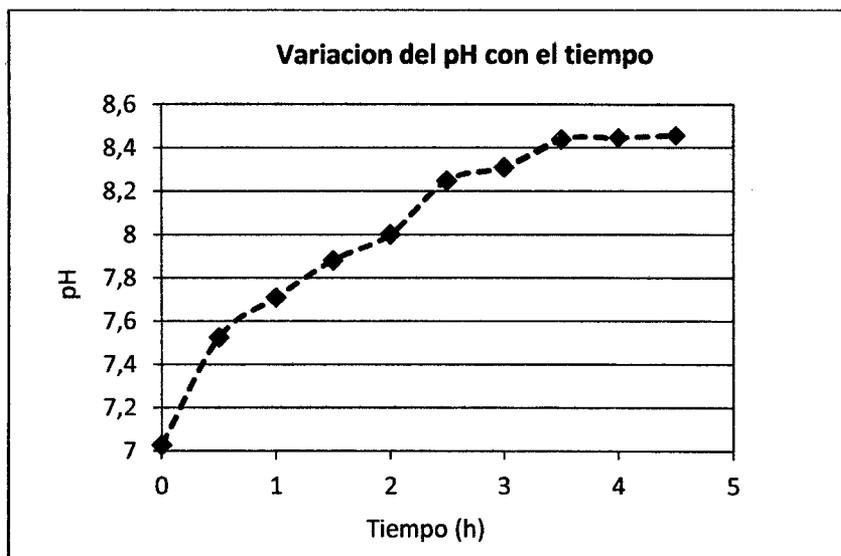


Figura 45: Variación del pH con el tiempo para la concentración de 20 µg/mL de fenol.

La figura 44 muestra la variación del pH con el tiempo, así pues se tiene un pH inicial de 7.886 y final de 8.288 con pico máximo de 8.322, sin embargo de la figura 45 se tiene un pH inicial de 7.027 y final de 8.548, así estas variaciones de pH se deben como resultado de la imposición de temperaturas hacia los microorganismos.

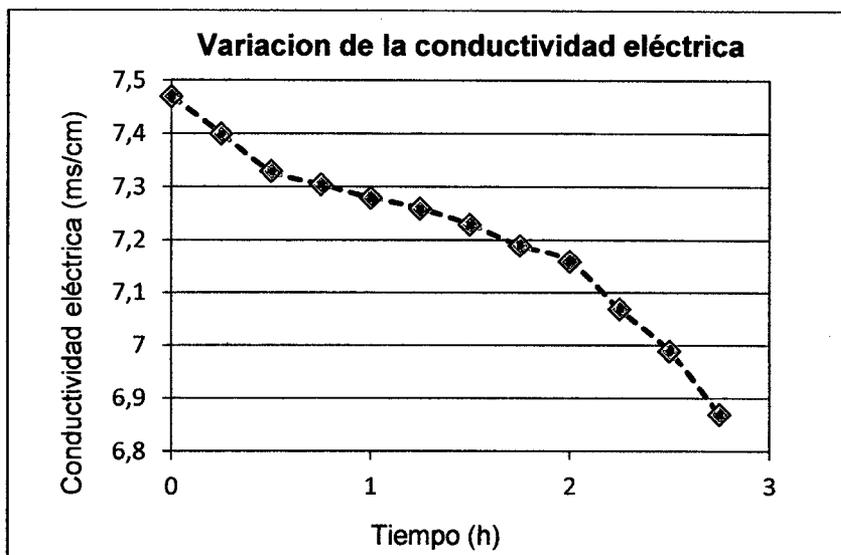


Figura 46: Variación de la conductividad eléctrica con el tiempo para la concentración de 10.526 µg/mL de fenol.

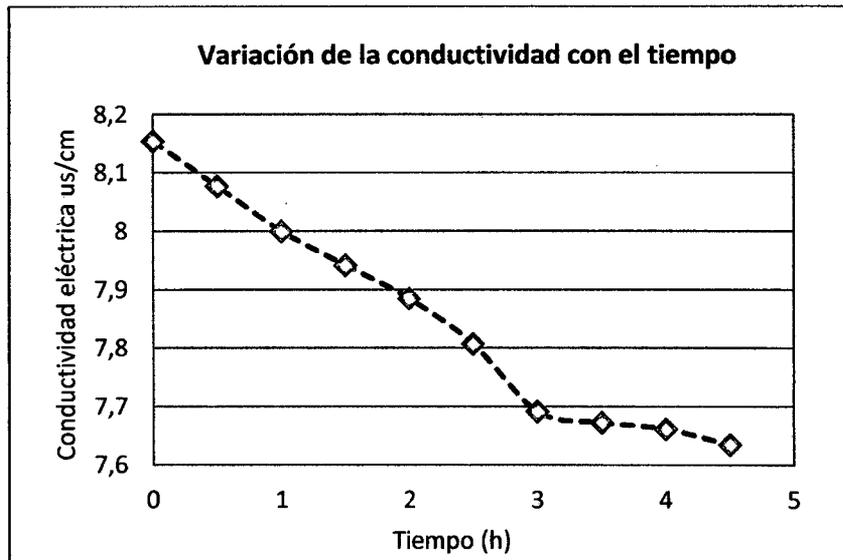


Figura 47: Variación de la conductividad eléctrica con el tiempo para la concentración de 20 µg/mL de fenol.

Las figuras 46 y 47 muestran la disminución de la conductividad eléctrica con el tiempo, donde las concentraciones de sales minerales son utilizadas por los microorganismos como fuentes de energía metabólica o para el funcionamiento de las células para la asimilación del fenol presente en aguas residuales provenientes de retretes de aeronaves.

#### 4.5.2. Modelos cinéticos

##### 4.5.2.1. Modelos cinéticos en un sistema en lotes (batch)

La degradación del fenol presente en aguas residuales provenientes de retretes de aeronaves se desarrolló en un reactor de lotes por un tiempo de contacto de 2.75 y 4.5 h para concentraciones de 10.526 y 20 mg/L, respectivamente. La remoción del fenol se midió en el equipo de espectrofotometría UV-1700 (UV-VIS spectrophotometer - Shimadzu), con el siguiente resultado.

Tabla 35: Degradación del fenol presente en aguas residuales de concentración inicial de 10.526 mg/L por medio de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de geles de alginato de calcio.

T (h)	$\theta=TRH$ (min)	Co (mg/L)	% de remoción	$\log(C/Co)$	1/C
0	0	10.526	0.000	0.000	0.095
0.25	15	10.276	2.375	0.010	0.097
0.50	30	9.213	12.474	0.058	0.109
0.75	45	8.145	22.620	0.111	0.123
1.00	60	7.093	32.614	0.171	0.141
1.25	75	5.113	51.425	0.314	0.196
1.50	90	4.185	60.241	0.401	0.239
1.75	105	3.709	64.763	0.453	0.270
2.00	120	3.434	67.376	0.486	0.291
2.25	135	2.782	73.570	0.578	0.359
2.50	150	2.531	75.955	0.619	0.395
2.75	165	2.281	78.330	0.664	0.438

Tabla 36: Degradación del fenol presente en aguas residuales de concentración inicial de 20 mg/L por medio de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de geles de alginato de calcio.

T (h)	$\theta=TRH$ (min)	Co	% de remoción	$\log(C/Co)$	1/C
0.0	0	20.000	0.00	0.000	0.050
0.5	30	19.538	2.31	0.010	0.051
1.0	60	18.857	5.72	0.026	0.053
1.5	90	15.176	24.12	0.120	0.066
2.0	120	12.208	38.96	0.214	0.082
2.5	150	10.054	49.73	0.299	0.099
3.0	180	8.963	55.19	0.349	0.112
3.5	210	7.728	61.36	0.413	0.129
4.0	240	6.324	68.38	0.5	0.158
4.5	270	5.748	71.26	0.542	0.174

Las tabla 35 y 36 muestran los resultados de la biodegradación de fenol presente en muestras de aguas residuales provenientes de los retretes de las aeronaves con concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol por

medio de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizados en geles de alginato de calcio, se obtuvieron concentraciones en equilibrio de 2.281 y 5.748 mg/L de fenol con remociones del 78.33 y 71.26 %, respectivamente.

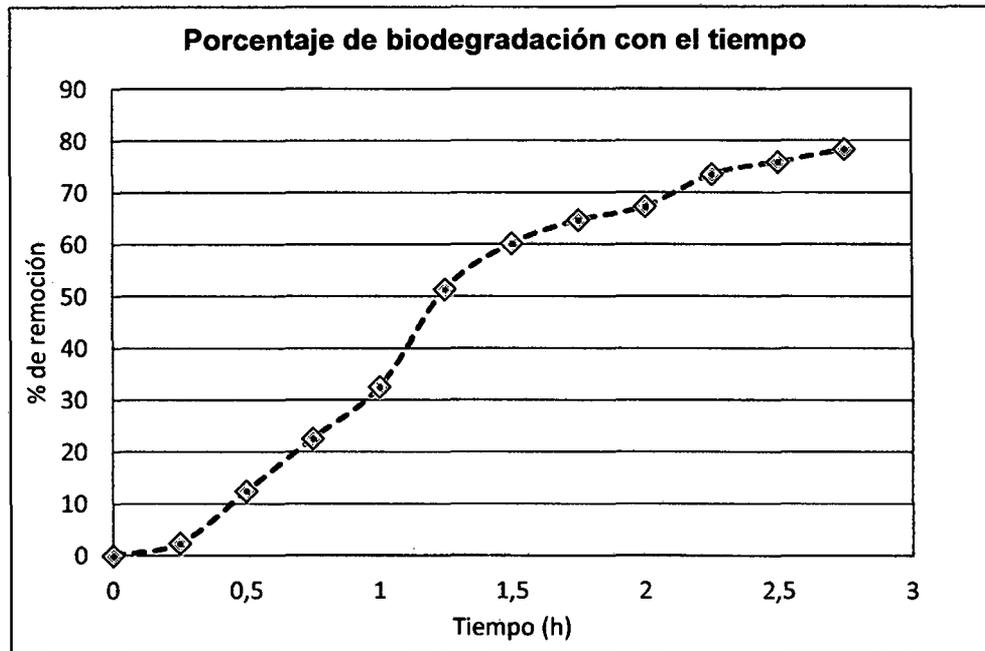


Figura 48: Porcentaje de remoción del fenol con el tiempo para una concentración de 10.526 mg/L.

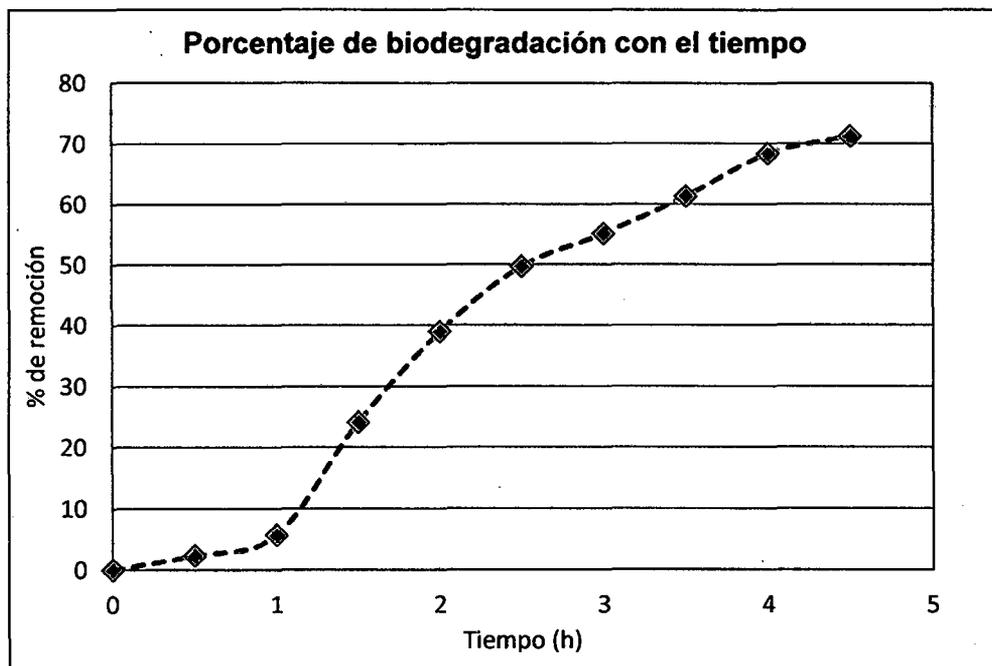


Figura 49: Porcentaje de remoción del fenol con el tiempo para una concentración de 20 mg/L.

Las figuras 48 y 49 muestran que el porcentaje de remoción aumenta con el tiempo, en las primeras horas la remoción es lenta debido a que las células tienden a adaptarse para iniciar el proceso de degradación del fenol y otros compuestos presentes en las aguas residuales provenientes de los retretes de las aeronaves, una vez ambientadas inician el proceso degradativo del fenol. Así pues estos fenómenos son observados para las concentraciones de 10.526 y 20 mg/L de fenol, donde los periodos de adaptación son de 0.25 y 1 h, respectivamente, a las nuevas condiciones ambientales, en esta etapa la remoción es lenta y una vez adaptadas el porcentaje de remoción se incrementa gradualmente.

#### 4.5.2.1.1. Modelo de orden cero

Si la ecuación cinética de orden cero está designada por:

$$[C] = [C_o] - k * t \quad [2.10]$$

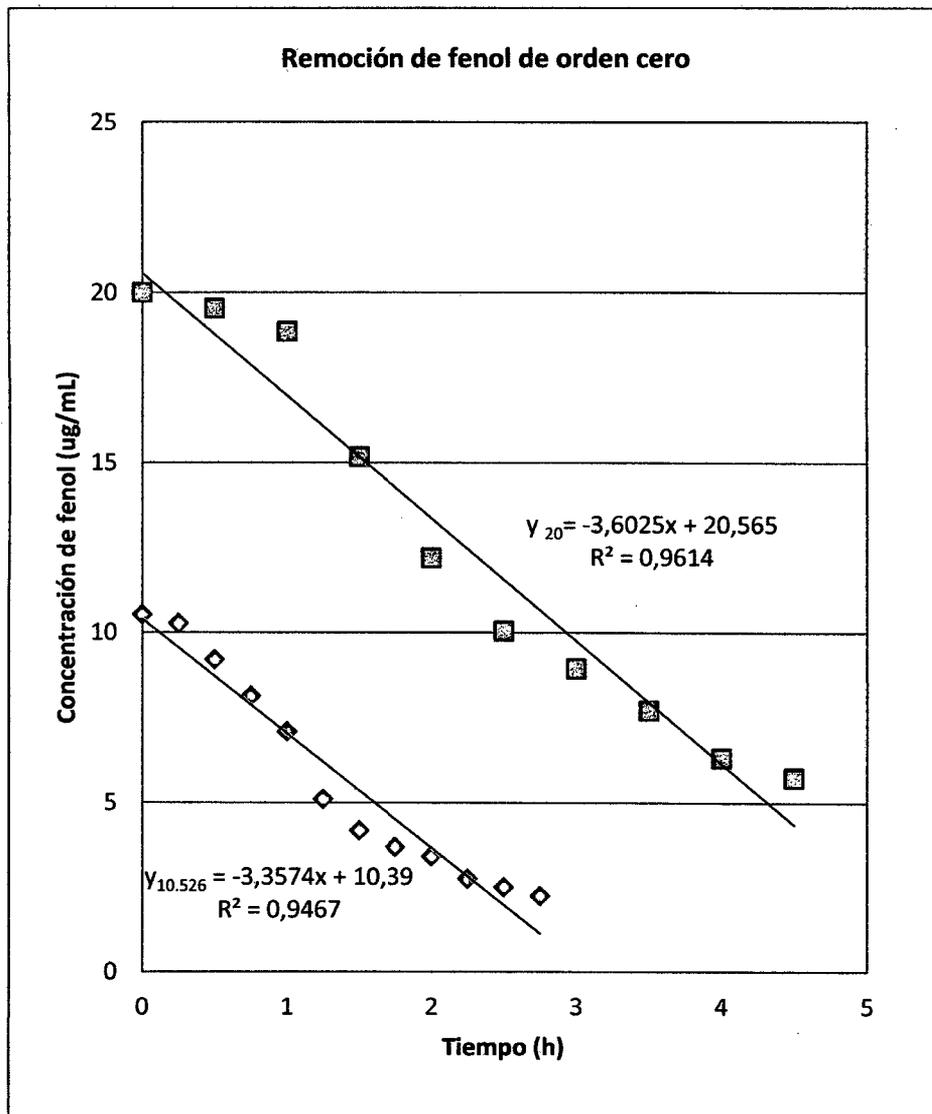


Figura 50: Modelo cinéticos de orden cero, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.

En similitud a la ecuación lineal de regresión:  $Y=a + mx$ , se obtienen los valores de las constantes de velocidad de degradación del fenol de 3.3574 y 3.6023  $\text{h}^{-1}$  para concentraciones de 10.526 y 20 mg/L de fenol con tiempos de contacto de 2.75 y 4.5 h a temperaturas de 22 y 28 °C, respectivamente.

#### 4.5.2.1.2. Modelo de primer orden

Si la ecuación cinética de primer orden está designada por:

$$\ln \left[ \frac{C}{C_0} \right] = -k * t \quad [2.11]$$

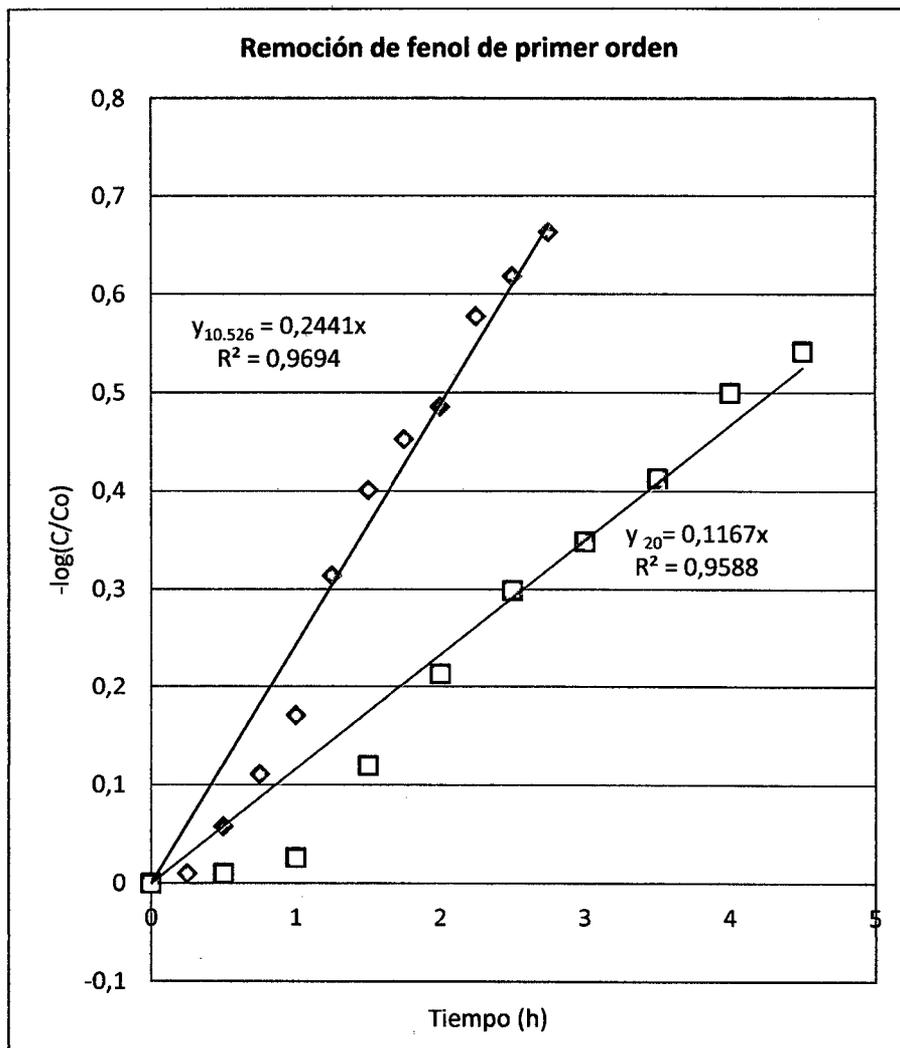


Figura 51: Modelo cinético de primer orden, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.

En similitud a la ecuación lineal de regresión:  $Y=a + mx$ , se obtienen los valores de las constantes de velocidad de degradación del fenol de 0.2441 y 0.1167  $\text{h}^{-1}$  para concentraciones de 10.526 y 20 mg/L de fenol con tiempos de contacto de 2.75 y 4.5 h a temperaturas de 22 y 28 °C, respectivamente

#### 4.5.2.1.3. Modelo de segundo orden

Si la ecuación cinética de segundo orden está designada por:

$$\frac{1}{[C]} - \frac{1}{[C_0]} = k * t \quad [2.12]$$

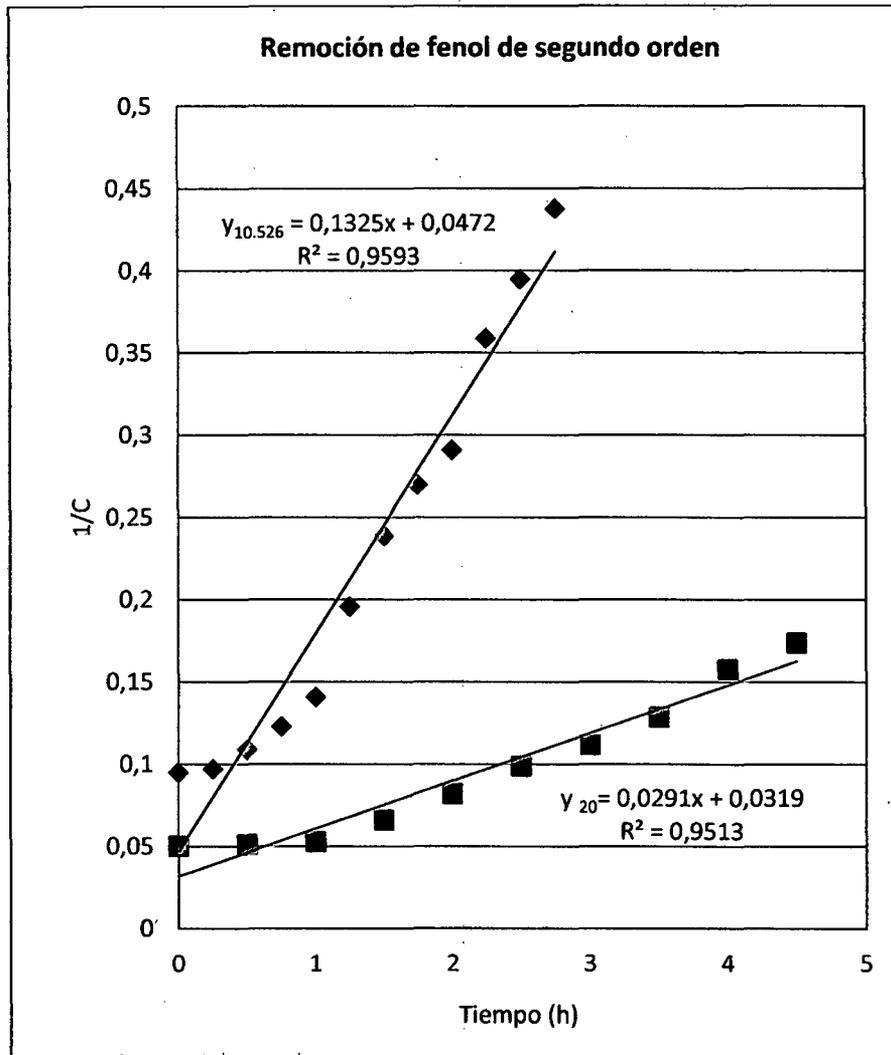


Figura 52: Modelo cinético de segundo orden, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.

En similitud a la ecuación lineal de regresión:  $Y=a + mx$ , se obtienen los valores de las constantes de velocidad de degradación del fenol de 0.1325 y 0.0291  $h^{-1}$  para concentraciones de 10.526 y 20 mg/L de fenol con tiempos de contacto de 2.75 y 4.5 h a temperaturas de 22 y 28 °C, respectivamente.

Tabla 37: Resumen comparativo de modelos cinéticos en un sistema de lotes (batch).

Con. de fenol	Orden cero		Primer orden		Segundo orden	
	k		$K_1$		$k_2$	
10.526 mg/L	k	3.6025	$K_1$	0.2441	$k_2$	0.1325
	$R^2$	0.9614	$R^2$	0.9694	$R^2$	0.9588
20 mg/L	k	3.3574	$K_1$	0.1167	$k_2$	0.0291
	$R^2$	0.9467	$R^2$	0.9588	$R^2$	0.9513

### Interpretación.

Se observa que:

- La constante de velocidad de biodegradación va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración inicial, que es descrito en los modelos matemáticos. Modelo matemático de orden cero:  $C_i = 10.526$  y  $20$  mg/L de fenol se obtienen valores de  $K = 3.6025$  y  $3.3574$   $h^{-1}$ , respectivamente. Modelo cinético de primer orden:  $C_i = 10.526$  y  $20$  mg/L de fenol se obtienen valores de  $K_1 = 0.2441$  y  $0.1167$   $h^{-1}$ , respectivamente. Modelo cinético de segundo orden:  $C_i = 10.526$  y  $20$  mg/L de fenol se obtienen valores de  $K_2 = 0.1325$   $h^{-1}$  y  $0.0291$   $h^{-1}$ , respectivamente.
- Los coeficientes de relación  $R^2$  hallados para las concentraciones de  $10.526$  y  $20$  mg/L, describen que los valores experimentales se ajustan en la cinética de primer orden con valores de  $R^2 = 0.9694$  y  $0.9588$ , respectivamente.

#### 4.5.2.2. Modelos cinéticos de adsorción - biodegradación

##### 4.5.2.2.1. Modelo de pseudo primer orden

Si la ecuación cinética de pseudo primer orden está designada por:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 * t \quad [2.15]$$

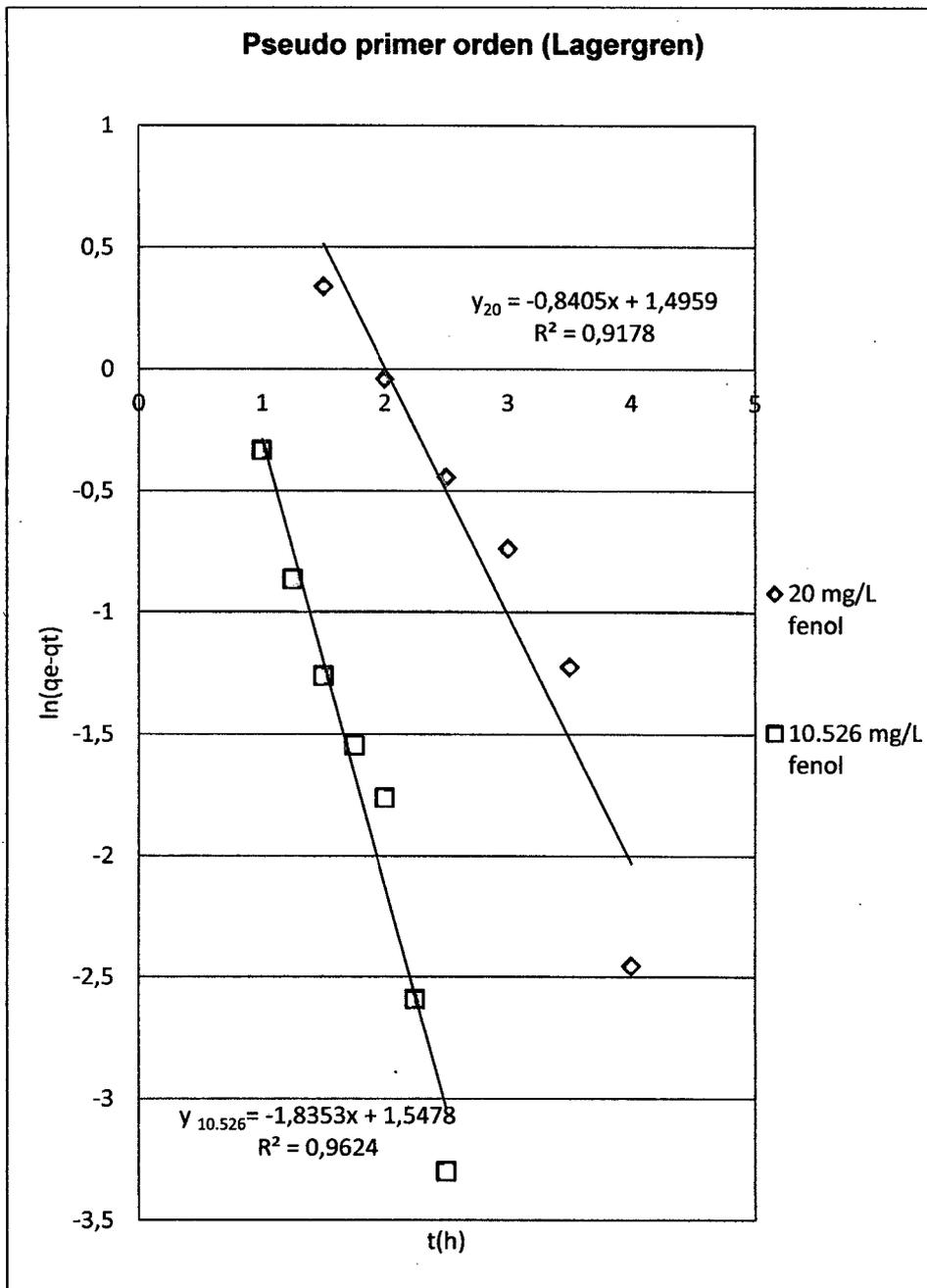


Figura 53: Modelo cinético de pseudo primer orden, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.

En similitud a la ecuación lineal de regresión:  $Y=a + mx$ , se obtienen los valores de las constantes de velocidad de adsorción-degradación del fenol de 0.8405 y 1.8353  $h^{-1}$  para concentraciones de 10.526 y 20 mg/L de fenol con tiempos de contacto de 2.75 y 4.5 h a temperaturas de 22 y 28 °C, respectivamente.

#### 4.5.2.2.2. Modelo de pseudo segundo orden

Si la ecuación cinética de pseudo segundo orden está designada por:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad [2.17]$$

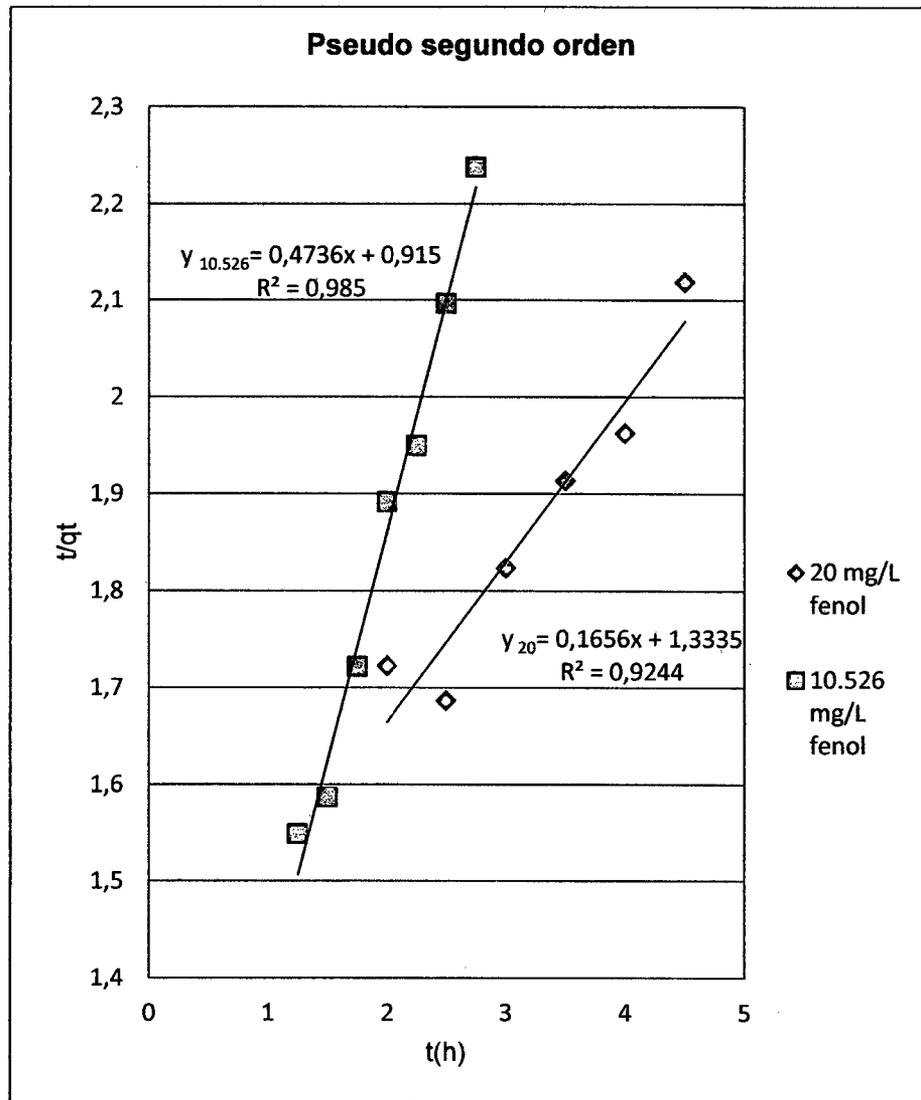


Figura 54: Modelo cinético de pseudo segundo orden, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.

En similitud a la ecuación lineal de regresión:  $Y=a + mx$ , se obtienen los valores de las constantes de velocidad de adsorción-degradación del fenol de 0.245 y 0.021  $h^{-1}$  para concentraciones de 10.526 y 20 mg/L de fenol con tiempos de contacto de 2.75 y 4.5 h a temperaturas de 22 y 28 °C, respectivamente.

#### 4.5.2.2.3. Modelo de transferencia de masa

Si la ecuación cinética del modelo de transferencia de masa está designada por:

$$\ln(C_o - C_t) = \ln D + K_o t \quad [2.19]$$

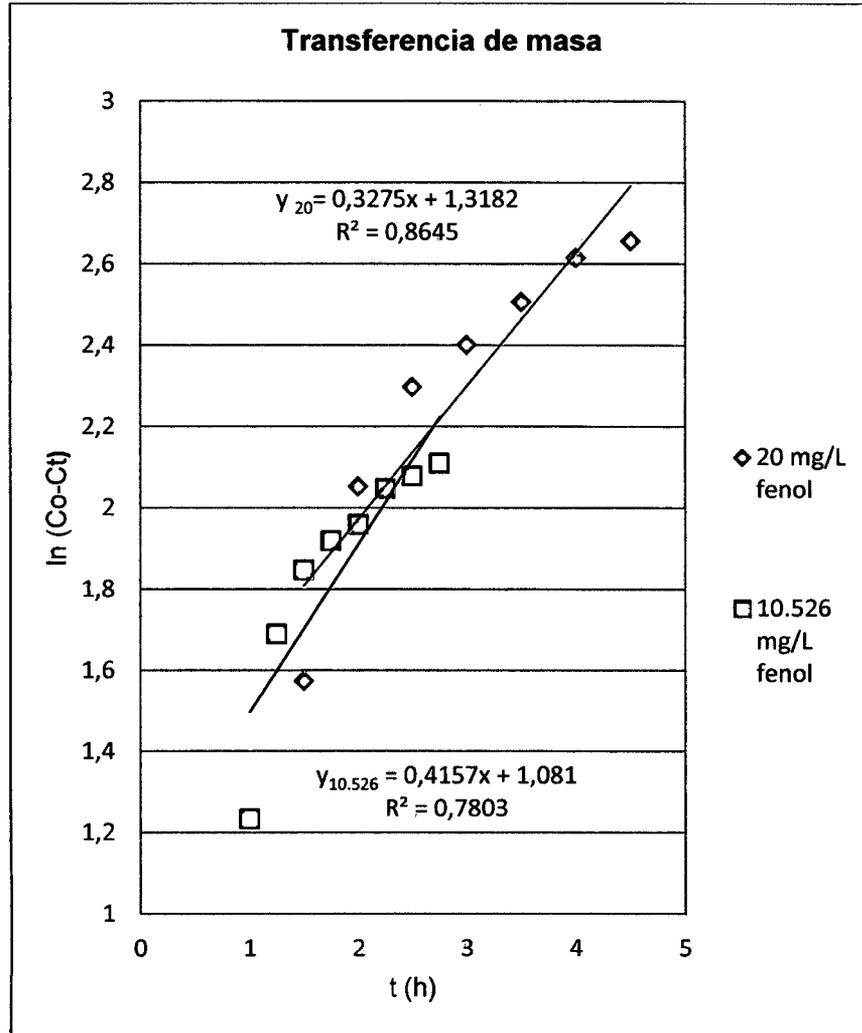


Figura 55: Modelo cinético de transferencia de masa, para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L de fenol con temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente.

En similitud a la ecuación lineal de regresión:  $Y=a + mx$ , se obtienen los valores de las constantes de velocidad de adsorción-degradación del fenol de 0.4157 y 0.3275  $\text{h}^{-1}$  para concentraciones de 10.526 y 20 mg/L de fenol con tiempos de contacto de 2.75 y 4.5 h a temperaturas de 22 y 28 °C, respectivamente

Tabla 38: Resumen comparativo de modelos cinéticos de adsorción-biodegradación del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizados en matrices de alginato de calcio.

Concentración	Pseudo primer orden		Pseudo segundo orden		Modelo de Transferencia de masa	
	$k_1$		$k_2$		$K_o$	
10.526 mg/L fenol	$k_1$	1.8353	$k_2$	0.245	$K_o$	0.4157
	$R^2$	0.9624	$R^2$	0.985	D	6.054
					$R^2$	0.783
20 mg/L fenol	$k_1$	0.8405	$k_2$	0.021	$K_o$	0.3275
	$R^2$	0.9178	$R^2$	0.924	D	3.736
					$R^2$	0.864

### Interpretación.

Se observa que:

- La constante de velocidad de adsorción-biodegradación va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración inicial, que es descrito en los modelos matemáticos. Modelo matemático de pseudo primer orden:  $C_i = 10.526$  y  $20$  mg/L de fenol se obtienen valores de  $K_1 = 1.8353$  y  $0.84054 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Modelo cinético de pseudo segundo orden:  $C_i = 10.526$  y  $20$  mg/L de fenol se obtienen valores de  $K_2 = 0.2451$  y  $0.021 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Modelo cinético de transferencia de masa:  $C_i = 10.526$  y  $20$  mg/L de fenol se obtienen valores de  $K_o = 0.1325$  y  $0.0291 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.
- Los coeficientes de relación  $R^2$  hallados para las concentraciones de  $10.526$  y  $20$  mg/L, describen que los valores experimentales se ajustan al modelo de pseudo segundo orden con valores de  $R^2 = 0.985$  y  $0.924$ , respectivamente, para la cinética de adsorción-biodegradación del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de alginato de calcio
- Por lo tanto, la cinética de adsorción-biodegradación es controlada por reacciones químicas producidas por las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en geles de alginato de calcio (metabolización del fenol por reacciones enzimáticas).

#### 4.6. Evaluación económica del método desarrollado en la degradación del fenol

En las siguientes tablas se representan la evaluación económica del tratamiento de las aguas residuales provenientes de las aeronaves por medio del microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 39: Costo total del aislamiento, reconocimiento, adaptación e inmovilización de la *Pseudomonas aeruginosa*.

Costo total de aislamiento, reconocimiento, adaptación e inmovilización de la <i>P. aeruginosa</i>	
Costo total de medios y/o reactivos	S/. 59.40
Costo energético total	S/. 5.50
Costo total	S/. 64.90

Tabla 40: Costo total del tratamiento del agua residual proveniente de las aeronaves.

Costo energético en el reactor de lotes de tres litros en un tiempo de 4.5 horas	
Costo energético de la bomba de aireación de 35 W	S/. 0.05
Costo energético del calentador de agua de 16 W	S/. 0.02
Costo total	S/. 0.07

Tabla 41: Costo total del análisis de una muestra.

Costo total del análisis de una muestra	
Costo energético del análisis	S/. 0.51
Costo de gasto del agua en la destilación	S/. 0.12
Costo total de reactivos utilizados	S/. 0.45
Costo total	S/. 1.08

De la tabla 39 se observa el costo de aislar, reconocer, adaptar e inmovilizar al microorganismo para utilizar en el proceso de la degradación del fenol (ver anexo: tablas 45 y 46 de equipos y reactivos utilizados, respectivamente). En la tabla 40 también se observa el costo de tratar la muestra residual, y finalmente en la tabla 41 se observa el costo de cada análisis de la muestra (ver anexo: tablas 48 y 49 de equipos y reactivos utilizados, respectivamente).

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 5.1. Reconocimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados obtenidos de las pruebas de reconocimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* por medio de ensayos de tinción y pruebas bioquímicas descritas en la tabla (11) se observaron que poseen características de ser Gram negativa, fueron positiva a las pruebas de Oxidasa y Catalasa, utilizaron al citrato como fuente de carbono (Citrato de Simmons positivo), crecieron en medio LIA por lo que son sideróforo, no fermentaron lactosa, sacarosa, glucosa (resultado de TSI negativo), no sintetizaron la urea (resultado de UREA negativo), crecieron en el medio King B con pigmentación amarillo-verdoso y presentaron fluorescencia bajo la luz ultra violeta ( $\lambda=254$  nm), crecieron en Agar Cetrimide, con características físicas morfológicas: forma circular con elevación plano de superficie lisa y brillante, y de consistencia mucosa.

Esta caracterización concuerda con lo reportado por Ruiz Martínez (2007); Del Castillo (2008); Ortiz y otros (2004) quienes describen a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* de ser bacilos Gram negativo, de Oxidasa y Catalasa positivas, presentan un color azul-verdoso debido a la producción del pigmento piociana, y amarillo-verdoso por la producción de pioverdina, se considera como sideróforo, pertenece al grupo heterogéneo denominado no fermentadores, descarboxilan L-lisina hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O vía cadaverina (Revellés, 2005) con morfología colonial alargada y plana, con el centro elevado, de crecimiento en medio sólido con producción de mucoide como consecuencia de sobreproducción de alginato. Algunas diferencias encontradas entre lo mencionado por los investigadores y los resultados obtenidos son el tipo de borde que presenta la bacteria, la elevación del centro en la cepa, esto se debe precisamente a las variaciones fenotípicas morfológicas que pueden presentar las diversas bacterias dependiendo del lugar de aislamiento como pueden ser hospitalarios de ambientes limpios o contaminados de ecosistemas terrestres y acuáticos entre otros lugares de procedencia.

## 5.2. Discusión de resultados de la metodología superficie respuesta aplicado al proceso de la degradación del fenol

La metodología superficie respuesta permite analizar uno de los objetivos propuestos en la evaluación de obtención de los valores óptimos de las variables de matriz, temperatura y concentración inicial en la degradación del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en matrices de alginato de calcio, por lo tanto, la evaluación de los valores óptimos se analizó por dos etapas. La primera etapa consiste en la selección de variables, por medio del análisis del diseño factorial  $2^k$ , donde se analiza la significancia de cada variable (tabla 19) así como también el coeficiente de determinación de variabilidad de rendimiento, donde se obtuvo el valor de  $R^2 = 0.99346$  lo que significó que la ecuación del modelo matemático obtenido pasa a la etapa de optimización final, también en esta etapa se analizó el diagrama de Pareto donde se obtuvo la jerarquía de significancia de cada efecto de cada variable, así se observó que de las 3 variables, la variable temperatura obtuvo el máximo valor de 22.316, por lo tanto, la degradación del fenol está influenciado fuertemente por el efecto de la temperatura del sistema.

La segunda etapa de optimización final estuvo analizada por el diseño central compuesto donde se obtuvieron los valores adecuados para la obtención de la máxima degradación del fenol por microorganismos inmovilizados en geles alginato de calcio

### 5.2.1. Etapa de selección de variables (screening).

Mediante el diseño factorial  $2^k$  se obtuvo la siguiente ecuación [4.3]:

$$\begin{aligned} Y_{est} = & 43.150 + 8.425 * \text{Matriz} + 15.965 * \text{Temperatura} - 3.940 * [\text{ ]o Fenol} + \\ & 2.970 * \text{Matriz} * \text{Temperatura} - 2.025 * \text{Matriz} * [\text{ ]o Fenol} + 4.255 * \\ & \text{Temperatura} * [\text{ ]o Fenol} \end{aligned} \quad [4.3]$$

De la tabla de efectos (18) y de la ecuación [4.3] nos muestran que la variable matriz es de efecto positivo al igual que la temperatura, no obstante la variable concentración inicial es de efecto negativo en la degradación del fenol. Así pues, la remoción del fenol está favorecida con el incremento de la matriz y temperatura en mayor nivel (nivel + 1) y la concentración inicial es favorable cuando está en el nivel más bajo (nivel 0).

### 5.2.1.1. Efecto de la matriz, temperatura y concentración inicial en la degradación del fenol.

- El análisis sobre el efecto positivo de matriz ha sido estudiado por Ullhyan & Ghosh (2012) afirmando que el incremento del inóculo libre o inmovilizado incrementa el porcentaje de remoción, por su parte Yordanova et al. (2013) plantea que las células aclimatadas e inmovilizadas reducen más rápido la concentración del fenol, en conclusión la cantidad de inóculo libre o inmovilizado tiene efecto positivo en la degradación del fenol (Leile et al., 2012).
- El análisis sobre el efecto positivo de temperatura en la degradación del fenol es de gran importancia debido a que permite obtener la mayor eficiencia de remoción del fenol, así el incremento de temperatura permite que los microorganismos puedan realizar sus reacciones químicas y enzimáticas más rápidas, no obstante a bajas temperaturas ocurre un descenso de fluidez en la membrana de los microorganismos de modo que se detienen los procesos de transporte de nutrientes y gradiente de protones <sup>(62)</sup>. Este incremento de temperatura también ha sido observado por Nor et al. (2010), quien afirma que la degradación del fenol está influenciada por la temperatura, por su parte Chakraborty et al., (2010) y Nor et al. (2013) sostienen que la temperatura es de efecto positivo en la degradación del fenol, asimismo Bhattacharya et al. (2012) menciona que la eficiencia de biodegradación está afectada por la temperatura, en fin, podemos concluir con Balamurugan et al. (2012) que la temperatura juega un rol importante en la degradación del fenol, hecho que ha sido observado en el presente trabajo de investigación.
- El análisis sobre la variable concentración inicial, de efecto negativo con el incremento de la misma, ha sido observado por Ghanem (2009) afirmando que la concentración inicial del fenol influye en el proceso de degradación, por su parte Duan (2011) sostiene que a mayor concentración inicial la biomasa inmovilizada requiere mayor tiempo de contacto para la mineralización del fenol, asimismo Ullhyan & Ghosh (2012) plantearon que el incremento de la concentración inicial afecta el porcentaje de remoción, igualmente Agarray & Aremu (2012) proponen que la remoción del fenol decrece con el incremento de la concentración inicial, además Balamurugan et al. (2012) refiere que el efecto de la concentración inicial es inversamente proporcional con en el porcentaje de remoción, en conclusión la

concentración inicial afecta la degradación del fenol (Nor et al., 2013). Hecho que se coincide con los resultados obtenidos del presente estudio.

### 5.2.1.2. Análisis sobre el diagrama de Pareto

Mediante el diagrama de Pareto (figura 29) se obtuvo la significancia de efectos principales, siendo de gran significancia la temperatura con un valor de 22.316 luego la matriz con 11.776 y finalmente la concentración inicial de fenol con 5.507. Por lo tanto la temperatura tiene un efecto positivo en la degradación del fenol como lo mencionan Chakraborty et al. (2010) y Nor et al (2013), como efecto principal de la mineralización del fenol (Duan, 2011), y de gran influencia sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (Ali et al., 2012).

### 5.2.2. Optimización final mediante el diseño central compuesto

La optimización final representada en la tabla (24) de análisis de significancia, se obtuvo que las variables  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  (matriz, temperatura y concentración inicial de fenol) son significativas en el término lineal, al igual que es su término cuadrático  $X_1^2$ ,  $X_2^2$ ,  $X_3^2$ , e interacciones  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$ ,  $X_2X_3$ , con nivel de significancia de 0.05 para un  $F_{5,20}$ , de valor 2.71, representada en la siguiente ecuación en su escala codificada:

$$Y = 51.628 + 8.785X_1 + 16.202X_2 - 3.869X_3 - 4.051X_1^2 - 5.964X_2^2 + 1.439X_3^2 + 2.970X_1X_2 - 2.025X_1X_3 + 4.255X_2X_3 \quad [4.14]$$

Los cálculos involucrados en el diseño central compuesto están representadas en la tabla 26, donde se obtuvo que el  $F_{\text{tabla}}$ , de valor 5.05 >  $F_{\text{modelo}}$ , de valor 3.857, por lo tanto, mediante el resultado obtenido se cumple que el diseño experimental modela perfectamente a las variables que intervienen en el proceso de degradación del fenol en soluciones acuosas, por lo que se considera que la ecuación obtenida es de un buen modelo matemático, que pasa a la siguiente etapa de obtención de puntos óptimos.

Los puntos óptimos se obtuvieron a partir del análisis de las ecuaciones [4.14], [4.39], [4.40] y [4.41], donde se concluyeron que las condiciones óptimas para maximizar la variable respuesta de la degradación del fenol corresponden a 62 unidades de perlas de alginato de calcio, 33 °C y 49 mg/L de fenol, para las variables de matriz, temperatura y concentración inicial, respectivamente, con resultado de eficiencia máxima de 73.78% de remoción del fenol.

Por lo tanto la MSR y DCC describe que la matriz es una variable importante en la degradación de fenol, así pues la cantidad de perlas de alginato de calcio también puede ser descrita como cantidad de inóculo utilizado en la degradación del fenol por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC27853), como lo sostiene Hank et al. (2010). Así pues, el diseño experimental de la MSR y DCC identifica que la variable matriz es de gran influencia en la degradación de fenol, que también ha sido observado por los autores Zhou et al. (2011) y Ghanem et al. (2011), en los estudios estadísticos de Plackett-Burman y CCD; y, Plackett-Burman y Box-Behnken, respectivamente.

Por otra parte el análisis estadístico de la MSR y DCC describe que la variable respuesta de degradación de fenol está influenciada por la temperatura, así para la presente investigación se obtuvo de 33 °C como temperatura óptima en la degradación de fenol, variable que también ha sido estudiada por los distintos investigadores, Agarry et al. (2008), Agarry et al. (2010), Amara & Salem (2010), Sridevi et al. (2011), Zhou et al. (2011), Balamurugan et al. (2013), donde obtuvieron diversas temperaturas óptimas de 30.1, 30, 27.7, 29.99, 30.4, y 28 °C, respectivamente, en la degradación de fenol por diferentes microorganismos con distintos análisis estadísticos de MSR y CCD; MSR y CCD; Plackett- Burman y Box-Behnken; Plackett-Burman y CCD; MSR y CCD; MSR y CCD, respectivamente, estas diferencias de temperaturas óptimas (ver anexo: tabla 42) pueden estar influenciadas por condiciones externas del medio, como también por la naturaleza en particular de cada microorganismo que pueden estar libres o inmovilizados en el proceso de la degradación de fenol, así Janagi et al. (2012), Balamurugan et al. (2012), Shweta & Dhanayuthapani (2013) y Rahman et al. (2013), afirman que a 35 °C se obtienen las máximas eficiencias de degradación del 80 % para la bacteria *Pseudomonas sp.* inmovilizadas en alginato de calcio, 94 % para la bacteria *Aspergillus fumigatus*, 79 % para la bacteria *Pseudomonas putida*, y más del 50 % de remoción de fenol para las bacterias aisladas de suelos de áreas industriales de Lahore, Jahang y Gomal University D. I. Khan, respectivamente. Por otra parte los autores Marrot et al. (2006), Ying et al. (2006), Nor et al. (2010) y Bhattacharya et al. (2012) refieren que una variación de 5 °C da como resultado una variación de eficiencia del 50 % de remoción del fenol, por su parte Duan (2011) refiere que la alta eficiencia de remoción de fenol se debe probablemente a la gran producción de metabolitos a la temperatura óptima del microorganismo, además Ali et al. (2012) menciona que la degradación del

fenol a temperaturas superiores a 45 °C se inactivan las enzimas metabólicas. Por lo tanto, en relación a la presente tesis se obtuvo que a 33 °C la actividad enzimática y los requerimientos celulares de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, están influenciados por la temperatura óptima mencionada, es decir a esta temperatura la velocidad de metabolización se encuentra en su máxima actividad degradativa de fenol con 73.78% de eficiencia de remoción.

Sin embargo, el análisis estadístico de la MSR y DCC, también describe que la variable concentración inicial de fenol influye en la máxima eficiencia de remoción, así para la presente investigación se obtuvo de 49 mg/L de fenol como concentración óptima. Variable que también ha sido estudiada por Duan (2011), que a una concentración de 50 mg/dm<sup>3</sup> de fenol se degrada completamente en un tiempo de contacto de 0.8 h para un volumen 1.5 dm<sup>3</sup> con velocidad de aireación constante de 0.3 m<sup>3</sup>/h a 30 °C con velocidad de agitación 100 rpm y pH 6, resultado que es muy cercano a lo obtenido en la presente tesis, por su parte Zhou et al. (2011) y Balamurugan et al. (2013), afirman que la concentración inicial de fenol es importante en la degradación del mismo, el que ha sido analizado por medio del diseño estadístico de Plackett-Burman y MSR; y MSR y CCD, respectivamente. Por consiguiente, la máxima eficiencia de remoción de fenol está influenciada por la concentración inicial de este, que puede ser degradado inmediatamente o que puede requerir tiempos de adaptación para la metabolización de altas concentraciones.

### 5.3. Discusión de resultados de modelos matemáticos en Isotermas

Los modelos de isotermas nos muestran una mejor comprensión de la naturaleza del gel y de la *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en ella misma, donde la capacidad de adsorción-biodegradación del fenol ha sido analizada por los modelos teóricos de Freundlich y Langmuir. En la tabla 30 se representa el resumen comparativo de las isotermas de Freundlich y Langmuir, con los siguientes valores:  $K_F = 0.328$  L/mg,  $1/n = 0.7158$ ,  $n = 1.397$ ,  $R^2 = 0.9916$ ; y  $K_L = 0.020$ ,  $q_{m\acute{a}x} = 10.277$  mg/g,  $R^2 = 0.809$ , respectivamente. Analizando los valores de coeficiente de correlación “R<sup>2</sup>” de ambas isotermas, se observó que la isoterma de Freundlich es más cercano a la unidad en comparación a la isoterma de Langmuir, por lo que la isoterma de Freundlich se ajusta mejor para el proceso de adsorción-biodegradación del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en geles de alginato de calcio, con la siguiente ecuación:

$$q_e = 0.328 * C_e^{0.7158}$$

Las isothermas de adsorción-biodegradación han sido estudiadas ampliamente en la remoción de compuestos tóxicos, así como en el fenol, donde se obtuvieron que los datos experimentales del presente estudio se ajustan al modelo de la isoterma de Freundlich, resultado que también ha sido observado por Zhao et al. (2009) en microorganismos inmovilizados (B350 de la empresa Bio-systems Co) en geles de OMMT-PSF, asimismo Antizar & Galil (2004) refieren que los datos experimentales de bioadsorción del fenol por bacterias hidrofóbicas crecidas en agar nutritivo se ajustan a la isoterma de Freundlich, también hace referencia el mencionado autor que los investigadores Aksu & Yener (1998) y Annadurai et al. (2000) ajustaron los datos experimentales en la isoterma de Freundlich en la adsorción-biodegradación de fenol y clorofenol por células desecadas en un sistema de lodos activados, y bacterias de *Pseudomonas putida* inmovilizada en quitosano, respectivamente, por lo tanto, los datos experimentales ajustados en la isoterma de Freundlich consideran, que: la superficie del adsorbente es heterogénea, el proceso de adsorción-biodegradación se desarrolla en multicapas donde no hay saturación por parte del adsorbato en el adsorbente es decir las bacterias inmovilizadas en perlas de alginato de calcio metabolizan al fenol en cada contacto con el sorbato.

Sin embargo los resultados obtenidos de la presente investigación difieren con los autores Orshansky & Narkis (1997), Puerto et al. (2009), Agarry & Aremu (2012), Ullhyan & Ghosh (2012), Agarry & Aremu (2012), quienes consideran que la isoterma de Langmuir o isoterma de Redlich-Peterson puede modelar perfectamente los datos experimentales, estas diferencias encontradas se debe principalmente por el tipo de inmovilización utilizado en las bacterias con soportes naturales y/o sintéticos <sup>(58)</sup>, como pueden ser quitosano, alginatos, alcohol polivinilo, carbón activado, poliuretano entre otros, es por ello la diferencia de obtención de resultados, en el anexo tabla 43 se muestran los reportes de isothermas de los investigadores mencionados.

#### **5.4. Discusión de resultados de modelos cinéticos**

Con el fin de abordar el objetivo de la cinética degradativa del fenol en muestras de aguas residuales de aeronaves por medio de microorganismos inmovilizados en matrices de alginato de calcio, se estudió la cinética de degradación desde dos puntos de vista.

- Primero: El sistema de estudio por lotes, implica el análisis de la velocidad de reacción y orden cinético que ocurre en un sistema discontinuo para la

degradación del fenol presente en muestras de aguas residuales de aeronaves.

- Segundo: El análisis cinético de adsorción-biodegradación del fenol por los microorganismos inmovilizados en geles de alginato de calcio proporcionan la información del comportamiento de la matriz (*Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en geles de alginato de calcio) frente al fenol y otros compuestos presentes en el agua residual.

#### 5.4.1. Modelos cinéticos en un sistema en lotes (batch)

Los resultados obtenidos de los modelos cinéticos en sistema de lotes (batch) representados en la tabla 37, se obtuvieron los siguientes valores para las muestras de aguas residuales proveniente de retretes de aeronaves, para concentraciones iniciales de  $C_i = 10.526$  y  $20$  mg/L fenol: Modelo de orden cero  $K = 3.6025$  y  $3.3574$   $h^{-1}$ ;  $R^2 = 0.9614$  y  $0.9467$ . Modelo cinético de primer orden con los siguientes valores;  $K_1 = 0.2441$  y  $0.1167$   $h^{-1}$ ;  $R^2 = 0.9694$  y  $0.9588$ . Modelo de segundo orden  $K_2 = 0.1325$  y  $0.0291$   $h^{-1}$ ,  $R^2 = 0.9588$  y  $0.9513$ , respectivamente. Analizando los valores obtenidos del coeficiente de correlación " $R^2$ " de los distintos modelos cinéticos, se observa que la cinética de primer orden es más cercano a la unidad en comparación a la cinética de orden cero y de segundo orden, por lo que la cinética de primer orden se ajusta perfectamente para el proceso de biodegradación del fenol por células inmovilizadas en geles de alginato de calcio, este mismo mecanismo también ha sido observado por Seoud & Maachi (2003) en la degradación del naftaleno por células inmovilizadas de *Pseudomonas sp.*, para soluciones acuosas.

#### 5.4.2. Modelos cinéticos de adsorción – biodegradación

El estudio cinético de adsorción-biodegradación del fenol por medio de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en geles de alginato de calcio están analizadas por las ecuaciones de pseudo segundo primer, pseudo segundo orden y modelo de transferencia de masa, con los siguientes valores:  $K_1 = 1.8353$  y  $0.8405$   $h^{-1}$ ,  $R^2 = 0.9624$  y  $0.9178$ ;  $K_2 = 0.245$  y  $0.021$  (g/mg-h),  $R^2 = 0.985$  y  $0.924$ ; y  $K_o = 0.4157$  y  $0.3275$ ,  $D = 6.054$  y  $3.736$ ,  $R^2 = 0.783$  y  $0.864$ , respectivamente. Analizando los valores obtenidos del coeficiente de correlación " $R^2$ " de los distintos modelos cinéticos de adsorción-biodegradación, se observa que la cinética de pseudo segundo orden es el más cercano a la unidad en comparación a la cinética de pseudo primer orden y al modelo de transferencia

de masa, por lo que la cinética de pseudo segundo orden se ajusta perfectamente al proceso de adsorción-biodegradación del fenol, este mismo mecanismo también ha sido descrito por Zhao et al. (2009) en la biodegradación del fenol por microorganismos B350 de la empresa Bio-systems Co (USA) inmovilizados en geles de OMMT-PSF, reporta que el modelo de pseudo segundo orden se ajusta a la cinética de adsorción-biodegradación con los siguientes parámetros:  $K_2 = 0.0186, 0.0057, 0.0036$  y  $0.0023$  g/mg\*min;  $Q_{e2} = 15.9, 30.4, 43.5$  y  $58.1$  mg/g;  $R_2^2 = 0.9999, 0.9998, 0.9998$  y  $0.9996$ , para concentraciones de 1042.6, 2030.2, 3000.6 y 4067.6 mg/L de fenol, respectivamente, 6 g de geles de OMMT-PSF (1g de B350), volumen 100 mL de fenol, velocidad de agitación 180 rpm, diámetro 0.4mm. Sin embargo los resultados obtenidos de la presente investigación difieren con los autores Agarry & Aremu (2012), donde reportaron que el modelo de pseudo primer orden es el que se ajusta mejor en la adsorción-biodegradación del fenol y naftaleno por células inmovilizadas de *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950 en cáscaras de piña en sistema batch, esta diferencia se debe probablemente al tipo de soporte utilizado como matriz de inmovilización del microorganismo que permiten el contacto entre las bacterias con el fluido de la muestra, temperatura de reacción, concentración inicial del sorbato (fenol), aireación, velocidad de agitación y pH.

##### **5.5. Evaluación económica del método desarrollado en la degradación del fenol**

La búsqueda del microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* implica un costo en el aislamiento de esta, a partir de las muestras provenientes de Pirin-Puno y UNIPETROABC –Talara, donde los microorganismos han sido reconocidas por diferentes medios diferenciales. Una vez obtenida los microorganismos fueron adaptados desde pequeñas concentraciones a altas concentraciones de fenol con dosificación de medio suplementario de Fatherpure, este medio constituye como una fuente de energía y carbono inicial para la adaptación del microorganismo. Por tanto, los medios de aislamiento, medios diferenciales y medio suplementario de Fatherpure implican costos iniciales en la búsqueda y adaptación del microorganismo. Por otra parte, la inmovilización del microorganismo también genera costos de encapsulamiento en alginato de calcio.

Con respecto a la degradación del fenol presente en las aguas residuales provenientes de las aeronaves por medio de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas en alginato de calcio, se observó una generación de gastos en los costos energéticos del reactor de lotes generada por la potencia de la pequeña

bomba de aireación y por el calentador de agua para alcanzar la temperatura adecuada de reacción con un costo total de S/. 0.07, además los reactivos y equipos utilizados para el análisis de una muestra generó un costo total de S/. 1.08, por lo tanto tratar una muestra de agua residual proveniente de las aeronaves tiene un costo total de S/. 1.15  $\approx$  S/. 1.20, para una muestra de 3 litros durante un tiempo de 4.5 horas.

## CONCLUSIONES

1. Mediante el diseño factorial  $2^k$  se obtuvo que la degradación de fenol esta favorecida por las variables de la matriz y la temperatura con efectos positivos, sin embargo la variable de concentración inicial es de efecto negativo, por lo que, esta será favorable cuando esté en su nivel más bajo, modelado por la siguiente ecuación.

$$Y_{est} = 43.150 + 8.425 * Matriz + 15.965 * Temperatura - 3.940 * [ ]_o Fenol + 2.970 * Matriz * Temperatura - 2.025 * Matriz * [ ]_o Fenol + 4.255 * Temperatura * [ ]_o Fenol$$

Mediante el diagrama de Pareto se obtuvo la jerarquía de significancia de cada efecto siendo la temperatura de mayor significancia con un valor de 22.316, seguida de la matriz con un valor de 11.776 y finalmente la concentración inicial de fenol con un valor de 5.507.

Mediante la etapa de optimización final se obtuvo que el diseño experimental se ajusta correctamente y que cumple con el análisis de un buen modelo  $F_{modelo} = 3.857 < F_{tabla} = 5.05$ , con la siguiente ecuación:

$$Y = 51.628 + 8.785 * Matriz + 16.202 * Temperatura - 3.869 * [ ]_o Fenol - 4.051 * Matriz * Matriz - 5.964 * Temperatura * Temperatura + 1.439 * [ ]_o Fenol * [ ]_o Fenol + 2.970 * Matriz * Temperatura - 2.025 * Matriz * [ ]_o Fenol + 4.255 * Temperatura * [ ]_o Fenol$$

El modelo final encontrado posee un máximo con los valores óptimos de 62 unidades de geles de alginato de calcio para la matriz, temperatura 33 °C y concentración inicial de 49 mg/L de fenol con eficiencia de remoción de 73.78 %.

De la figura (36) de superficie respuesta se observó que el incremento de temperatura y el número de perlas favorecen la biodegradación de fenol, la figura (38) da a conocer que el aumento de número de perlas y la disminución de la concentración inicial también favorece la remoción, de igual manera en la figura (40) también muestra que el incremento de la temperatura y la disminución de la concentración inicial favorece dicho proceso, por lo tanto, el proceso de degradación del fenol está influenciada con el aumento del número de perlas, incremento de temperatura (temperatura óptima del microorganismo) y la disminución de la concentración inicial del fenol (hasta alcanzar lo necesario como fuente de carbono y energía).

2. De los modelos teóricos de adsorción-biodegradación, la isoterma de Freundlich modela adecuadamente los datos experimentales para las soluciones acuosas de concentraciones iniciales de 16, 50 y 84 mg/L de fenol, con los siguientes valores:  $K_F = 0.328$  L/mg,  $1/n = 0.7158$ ,  $R^2 = 0.9916$ , con la siguiente ecuación:

$$q_e = 0.328 * C_e^{0.7158}$$

3. De los modelos teóricos de la cinética en sistema de lotes (batch), se obtuvo que la cinética de primer orden describe adecuadamente la velocidad de degradación del fenol, con los siguientes valores:  $K_1 = 0.2441$  y  $0.1167$  h<sup>-1</sup>;  $R^2 = 0.9694$  y  $0.9588$ , para concentraciones de 10.526 y 20 mg/L fenol, respectivamente.
4. De los modelos teóricos cinéticos de adsorción-biodegradación, se obtuvo que el modelo de pseudo segundo orden describe, apropiadamente la velocidad de adsorción-biodegradación del fenol, con los siguientes valores:  $K_2 = 0.245$  y  $0.021$  (g/mg-h),  $R^2 = 0.985$  y  $0.924$ , para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L fenol, respectivamente, así pues en el modelo de pseudo segundo orden describe que ocurren reacciones químicas dentro de los geles de alginato de calcio (metabolización del fenol por *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas).
5. La degradación del fenol presente en muestras de aguas residuales provenientes de los retretes de aeronaves mediante *Pseudomonas aeruginosa*, obtuvo eficiencias de biodegradación del 78.33 % y 71.26 % para concentraciones iniciales de 10.526 y 20 mg/L en tiempos de contacto de 2.75 y 4.5 h a temperaturas de trabajo de 22 y 28 °C, respectivamente, por tanto, estos valores obtenidos se encuentran dentro de la hipótesis planteada en la eficiencia de degradación de fenol, teniendo en cuenta el tiempo de contacto, la concentración inicial y la temperatura del sistema en lotes (batch).
6. El costo de tratamiento del agua residual mediante *Pseudomonas aeruginosa* a nivel laboratorio generó un costo aproximado de S/. 0.07 en una muestra de tres litros, con un costo aproximado de S/. 1.08 en el análisis de la muestra, por lo tanto el costo total aproximado ha sido de S/. 1.15 ≈ S/. 1.20, en el que se incluye el costo de tratamiento y el análisis de la muestra.

**Recomendaciones**

1. El diseño experimental de metodología superficie respuesta sirve para aproximar puntos óptimos mediante el modelo cuadrático de segundo orden, que puede seguir siendo ampliada con el efecto de otras variables como pH, volumen, inyección de oxígeno, teniendo en cuenta la disponibilidad de tiempo y el número de experimentos a realizarse, ya que a mayor cantidad de parámetros a evaluarse requieren nuevos ensayos experimentales para obtener los valores óptimos.
2. Investigar el comportamiento isotérmico de adsorción biodegradación para diferentes soluciones acuosas derivados del fenol.
3. Ampliar el estudio de la velocidad de biodegradación en diferentes muestras de aguas residuales que contengan al fenol o derivados.
4. Realizar estudios con otros materiales que sirvan de matriz de soporte para la inmovilización de microorganismos.

## LITERATURA CITADA

1. Agarry, S. E.; Durojaiye, A.; and Solomon, B. (2008). Microbial degradation of phenols: a review. *J. Environment and Pollution*, 32 (1), 12-27.
2. Agarry, S.E.; Solomon, B.O.; S.K., and Layokun. (2008). Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous binary mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescense*. *African Journal of Biotechnology*, 7 (14), 2417-2423.
3. Agarry, S. E.; and Aremu, M. O. (2012). Batch equilibrium and kinetic studies of simultaneous adsorption and biodegradation of naphthalene by orange peels immobilized *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950. *Bioremediation & biodegradation* , 3 (2), 2-12.
4. Agarry, S.; and Aremu, M. (2012). Batch Equilibrium and kinetic studies of simultaneous adsorption and biodegradation of phenol by pineapple peels immobilized *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950. *British Biotechnology Journal*, 2 (1), 26-48.
5. Agarry, S.; Solomon, B.; and Layokun, S. (2008). Optimization of process variables for the microbial degradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*, 7 (14), 2409-2416.
6. Agarry, S.E.; and Solomon, B.O. (2008). Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescense*. *Spring* , 5 (2), 223-232.
7. Agarry, S.E.; Solomon, B.O.; and Audu, T.O.K. (2010). Optimization of process variables for the batch degradation of phenol by *Pseudomonas fluorescense* using response surface methodology. *International Journal of Chemical Technology* , 2 (2), 33-45.
8. Ahumada Arias, M. P.; y Gómez Ibarra, R. K. (2009). Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría. Tesis: Microbiólogo Industria, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
9. Ali, O., Namane, A.; and Hellal, A. (2012). Microbial degradation of phenol by *Pseudomonas aeruginosa*: Operating conditions and kinetic study. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* , 6 (1), 35-53.

10. Al-Khalid, Taghreed; and El-Nass, Muftah H. (2012). Aerobic biodegradation of phenols: A comprehensive review. *Environmental Science and Technology* , 42, 1631-1690.
11. Al-Zuhair, S. N. (2012). Phenol biodegradation by *Ralstonia pickettii* extracted from petroleum refinery oil sludge. *Chemical Engineering Communications: Taylor & Francis* , 1194-1204.
12. Amara, A. A. (2010). Logical and experimental design for phenol degradation using immobilized *Acinetobacter sp.* Culture. *IJUM Engineering Journal*, 11 (1), 89-104.
13. Aneez Ahamad, P.Y.; and Mohammad Kunhi, A.A. (14 de Julio de 2010). Enhanced degradation of phenol by *Pseudomonas sp.* CP4 entrapped in agar and calcium alginate beads in batch and continuous processes. *Springer: Biodegradation*, 1-13.
14. Antizar-Ladislao, B.; and Galil, N. (2004). Biosorption of phenol and chlorophenols by acclimated residential biomass under bioremediation conditions in a sandy aquifer. *ELSEVIER: Water Research*, 38, 267-276.
15. Arvizu Higuera, D. L.; Hernández Carmona, G.; y Rodríguez Montesinos, E. (2002). Parámetros que afectan la conversión del ácido algínico en alginato de sodio. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* , 28 (001), 27-36.
16. Association, A. P., Association, A. W., & Federation, W. E. (1998). *Métodos estándares para el examen de aguas y aguas residuales* (20th ed.). (O. E. Alemán, Trad.) Argentina: Aguas de Salta.
17. B. Pharm, M. B. (2005). The phase behaviour of xanthan based biopolymer mixtures. Thesis: Doctor of Philosophy. The University of Nottingham, Formulation Insights Group School of Pharmacy, Nottingham.
18. Balamurugan, P.; Preetha, B.; Muthamilselvi, P.; and Viruthagiri, T. (2013). Application of statistical design for biodegradation of phenol using *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences: An international Peer Review E-3 Journal of Science* , 3 (1), 727-735.

19. Balamurungan, P.; Preetha, B.; and Virithagiri, T. (2012). Study on effect of operating parameters on biodegradation of Phenol by *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA)* , 2, 981-986.
20. Basha, K. M.; Rajendran, A.; and Thangavelu, V. (2010). Recent advances in the biodegradation of phenol: A review. *Society of applied sciences* , 1 (2), 219-234.
21. Bhattacharya, S.; Das, A.; and Nalini, P. (2012). Ex situ biodegradation of phenol by native bacterial flora isolated from industrial effluent.I. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. An international Peer Review E-3Journal of Sciences*, 2 (2), 1091-1101.
22. Bin Mohd, P.T. (2006). The performance of phenol biodegradation by *Candida tropicalis* RETL-Cr1 using batch and fed-batch fermentation techniques. Thesis: Doctor of Philosophy. Universiti Teknologi Malaysia, Faculty of Science, Malaysia.
23. Bódalo, A.; Gómez, J.L.; Gómez, E.; Hidalgo, A.M.; Murcia, M. D.;y Gómez, M. (2006). Eliminación de compuestos fenólicos en aguas residuales. (I); Tratamientos químicos. *Ingeniería Química*, 141-146.
24. Bódalo, A.; Gómez, J.L.; Gómez, E.; Hidalgo, A. M.; Murcia, M. D.; y Gómez, M. (2006). Eliminación de compuestos fenólicos en aguas residuales. (II); Tratamientos físicos y biológicos. *Ingeniería Química*, 136-144.
25. Cellesi, F. (2003). New fully synthetic materials for cell encapsulation. Thesis: Doctor of Science. Università degli Studi di Pisa, Zurich.
26. Chakraborty, S.; Bhattacharya, T.; Patel, T.N.; and Tiwari, K. K. (2010). Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from coke processing wastewater. *Journal of Environmental Biology* , 31, 293-296.
27. Charumathi, D.; and Das, N. (2010). Removal of synthetic dye basic violet 3 by immobilised *Candida tropicalis* grow on sugarcane bagasse extract medium. *International Journal of Engineering Science and Technology* , 2 (9), 4325-4335.
28. Chitiva Urbina, L.; y Dussan, J. (2003). Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas sp.* en biorremediación de fenol. *Revista colombiana de Biotecnología* , 2, 5-10.

29. Consejería de Sanidad. (2007). Riesgos químicos-accidentes graves. Dirección General de Salud Pública, Servicio de Sanidad Ambiental. Murcia. 1-17.
30. Corral Martínez, C. C. (2009). Velocidad de sedimentación de óxido de Zirconio dispersado en alginato de sodio adicionado con goma gelan. Reporte de Residencia Profesional. Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Victoria de Durango, Durango.
31. Crites, R.; and Tchobanoglous, G. (2000). *Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones*. (M. Camargo, L. P. Pardo, & G. y Mejía, Trads.) Bogotá, Colombia: McGraw-Hill Interamericana, S.A.
32. Del Castillo Santaella, T. (2008). Análisis genómico, transcripcional y de flujo del metabolismo de la glucosa en *Pseudomonas putida* KT2440. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Consejo Superior de investigaciones científicas Estación Experimental del Zaidín, Facultad de Ciencias, Granada.
33. Dhandayuthapani, S. (2013). Optimization of phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* isolated from industrial effluent. *International Journal of Pharma and Bio Science* , 3, 405-413.
34. Díaz Montiel, A. D.; Rincón Lizandro, C. N.; Fernandez Acosta, N.; y Marín Leal, J. C. (2005). Degradación de fenoles totales durante el tratamiento biológico de aguas de producción petroleras, *SciELO Venezuela* , 13 (3), 1-7.
35. Domínguez Domínguez, J. (2010). Optimización Estadística de Procesos Multi-Respuesta. *SMM: Sociedad Matemática Mexicana*, 1-15.
36. Duan, Z. (2011). Microbial degradation of phenol by activated sludge in a batch reactor. *Environment Protection Engineering* , 37 (2), 53-64.
37. El-Sayed, M.; El-Hameid Shalaby, A.; and El-Sheikh, K. (2003). Biological degradation of substrate mixtures composed of phenol, benzoate and acetate by *Burkholderia cepacia* G4. Thesis: Doctor of Philosophy. Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Egypten.
38. El-Sayed, Wael S.; Ibrahm, Mohamed K.; Abu-Shaday, Mohamed; El-Beih, Fawkia; Ohmura, Naoya; Saiki, Hiroshi; and Ando, Akikazu. (2003). Isolation and characterization of phenol – catabolizing bacteria from a Coking Plant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 67 (9), 2026-2029.

39. Fernández Melcón, C. D.; y Piñeiro Barcia, Montserrat. (2005). Superficie de Respuesta: Métodos y diseños. Departaménto de Estadística e Investigación Operativa y Didáctica Matemática. Universidad de Oviedo, 1-28.
40. García Altamirano, V. (2009). Transportadores involucrados en la tolerancia a disolventes orgánicos en *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Consejo Superior de investigaciones científicas Estación Experimental del Zaidín, Departamento de Bioquímica y Biología Molecula. Granada.
41. Garzón Jiménez, C. (2008). Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales* , 2 (1), 23-34.
42. Ghanem, K. M.; Al-Fassi, F.; and Al-Hazmi, N. M. (2012). Optimization of chloroxylenol degradation by *Aspergillus niger* using Plackett-Burman design and response surface methodology. *African Journal of Biotechnology* , 11 (84), 15040-15048.
43. Gómez Cortéz, S. (2010). Evaluación de eficiencia de tecnología de trataiento para reaccionar el fenol DBO5 y DQO, proveniente de los efluentes líquidos generados en las aeronaves. Tesis. Universidad Nacional de Ingenierías. Facultad de Ingeniería Ambiental, Lima
44. Hank, D.; Saidani, N.; Namane, A.; and Hellal, A. (2010). Batch phenol biodegradation study and application of factorial experimental design. *Journal of Engineering Science and Technology Review* , 3 (1), 123-127.
45. Hannaford, A. M.; and Kuek, C. (1999). Aerobic batch dégradation of phenol usin immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Micribiology and Biotechnology* , 22 (2), 121-126.
46. Hernandez Flores, L. R. (2008). Oxidación en fase húmeda de 2-clorofenol con catalizadores CuO/TiO2-Al2O3 para disminuir clorofenoles en aguas residuales.Tesis, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Centro de Investigaciones Químicas, Área Académica de Química, Hidalgo.
47. Herrejón Figueroa, M. L.; Limón Rodríguez, B.; y Martínez Miranda, V. (2008). Cinética e isotermas de adsorción de Pb (II) en suelos de Monterrey. *Ingenierías*, 11(41), 24-31.

48. Huerta Pérez, J. F. (2008). Desarrollo de nuevas metodologías para análisis ambiental, alimentario y clínico mediante FIA, HPLC y CE con diversos tipos de detección espectroscópica. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Departamento de Química Analítica, Granada.
49. Indu Nair, C.; Jayachandran, K.; and Shashidhar, S. (2008). Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology* , 7 (25), 4951-4958.
50. Jaiana Kleinübinga, S.; Silveira Vieira, R.; Masumi Beppua, M.; Guibalb, E.; and Carlos da Silvaa, M. G. (2010). Characterization and evaluation of copper and nickel biosorption on acidic algae *Sargassum filipendula*. *Materials Research*, 13 (4), 541-550.
51. Janagi, N.; Dandhayuthapani, K.; and Mazher, S. (2012). Phenol biodegradation by immobilized cell of *Pseudomonas sp.* *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 2 (4), 2277- 2782.
52. Kocatürk, S. (2008). Removal of heavy metal ions from aqueous solutions by keratin. Master of Science Thesis, Ege University Graduate School of Applied and Natural Sciences, Bornova, Izmir.
53. Kóneman, E. W. (2008). *Koneman Diagnóstico microbiológico* (6ta edición ed.). (O. Giovanniello, D. Klajn, & A. M. Pertierra, Trads.) Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.
54. Kowalska, M.; Bodzek, M.; and Bohdziewicz, J. (1998). Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms. *ELSEVIER: Process Biochemistry* , 33 (2), 189-197.
55. Kuehl, O. R. (2001). Diseño de Experimentos: Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. (2da edición ed.). México: Thomson Learning.
56. Lacal Romero, J. (2008). Caracterización bioquímica y molecular del sistema de dos componentes TODS/TODT de *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas Estación Experimental del Zaidín, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Granada.

57. Lack, A.; and Fuchs, G. (1992). Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism. *Journal of bacteriology* , 174 (11), 3629-3636
58. Leilei, Z.; Mingxin, H.; and Z., S. (2012). Biodegradation of p-nitrophenol by Immobilized *Rhodococcus sp. strain Y-1* . *Chem. Biochem. Eng. Q.* , 26 (2), 137-144.
59. León Santiesteban, H. H. (2010). Inmovilización de *Rhizopus oryzae* ENHE. Tesis: Maestro en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.
60. Loh, B. K.C.; Chung, T.S.; and Ang, W.F. (2000). Immobilized cell membrane bioreactor for high strength phenol wastewater. *Journal of environment engineering* , 126 (1), 1-5.
61. López Príncipe, P. H., & Ipanaqué Nizama, O. S. (2008). Caracterización y optimización de flotación a nivel laboratorio del mineral de cobre de la minera Candelaria. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Lima.
62. Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; and Parker, J. (2005). *Brock: Biología de los Microorganismos*. (10 ma ed.). Madrid: Pearson.
63. Mailín, M.; and Firdausi, R. (2006). High performance phenol degrading microorganisms insolate from wastewaters and oil-contaminated soil. *Malaysian Journal of Microbiology* , 2 (2), 31-36.
64. Manafi, M.; and Mehrnia, M. (2011). Phenol removal from synthetic wastewater by *Alcaligenes faecalis*. Online monitoring. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering* , 2 (2), 1-5.
65. Marrot, B.; Barrios Martínez, A.; Moulin, P.; y Roche, N. (2006). Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *ELSEVIER: Biochemical Engineering Journal* , 30, 174–183.
66. Martín Lara, M. Á. (2008). Caracterización y aplicación de la biomasa residual a la eliminación de metales pesados. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química, Granada

67. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (2005): Guías para manejo seguro y gestión ambiental de 25 sustancias. Consejo Colombiano de Seguridad. República de Colombia, 217-236.
68. Molina Rubio, M. J. (1992). Estudio de la estabilidad térmica del ácido alginico y derivados en diversas atmósferas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Madrid.
69. Montenegro Puga, J. P. (2010). Evaluación de la disminución de concentración de fenol en aguas sintéticas por medio de dos consorcios bacterianos nativos, aerobios y anaerobios facultativos, a nivel de laboratorio, para su aplicación futura en la biorremediación de efluentes textiles. Tesis. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de ciencias de la vida, Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí:
70. Nor Suhaila, Y.; Ariff, A.; Rosfarizan, M.; Abdul Latif, I.; Ahmad, S.; y Norazah, M.; (2010). Optimization of parameters for phenol degradation by *Rhodococcus* UKM-P in shake flask Culture. *Proceedings of the World Congress on Engineering* , 1, 1-4.
71. Nor Suhaila, Y.; Rosfarizan, M.; Aqlima Ahmad, S.; Abdul Latif, I.; and Bin Ariff, A. (2013). Nutrients and culture conditions requirements for the degradation of phenol by *Rhodococcus* UKMP-5M. *Journal of environmental Biology* , 34, 635-643.
72. Orshansky, F. (1997). Characteristics of organics removal by pact simultaneous adsorption and biodegradation. *Environmental ad Water Resources Engineering* , 31 (3), 391-398.
73. Ortiz Herrera, M.; Gerónimo Gallegos, A.; Cuevas-Schacht, F.; Pérez Fernández, L.; y Coria Jiménez, R. (2004). Caracterización, por RAPD-PCR de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *Salud Pública de México* , 46 (2), 149-157.
74. Palacios C., S. (2010). Estadística experimental: Aplicada a ciencias e ingeniería (Primera ed.). Lima, Perú: Edición CONCYTEC.
75. Palleroni, N. J. (2005). *Pseudomonas*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *Springer- Verlag* , 323-379.

76. Palleroni, N. J.; Ballard, R. W.; Ralston, Ericka; and Doudoroff, M. (1972). Deoxiribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas species*. *Journal of Bacteriology*, 110 (1), 1-11.
77. Polymenakou, Paraskevi N.; and Stephanou, Euripides G. (2005). Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonas*. *Biodegradation* (16), 403-413.
78. Prescott, L. M.; Harley, J. P.; y Klein, D. A. (2004). *Microbiología*. (5ta ed.). Madrid, España: McGraw-Hill.
79. Puerto Tello, A.; Moreno Piraján, J. C.; M., G. A.; and Escudero, M. E. (2009). Decomposition of phenol by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized activated carbons. *J. Environ. Eng. Manage.* , 19 (2), 73-78.
80. Rahman Awan, Z. U.; Haleem Shah, A.; and Amjad, M. (2013). Microbial degradation of phenol by locally isolated soil bacteria. *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 2 (4), 072-079.
81. Revelles López, O. M<sup>a</sup>. (2005). Caracterización de las rutas de catabolismo de L-lisina en *Pseudomonas putida* KT2440. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas Estación Experimental del Zaidín, Granada.
82. Reyes Tisnado, R.; Hernández Carmona, G.; López Gutiérrez, F.; Vermon Carter, E. J.; and Castro Moroyoqui, P. (2004). Sodium and potassium alginates extracted from *Macrocytis pyrifera* algae for use in dental impression materials. *Ciencias Marinas* , 30 (1B), 189-199.
83. Rodríguez, R.; Linares, R.; y Guadalupe, E. (2009). Adsorción y desorción de cromo hexavalente en relaves mineros. *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG* , 108 - 117.
84. Ruíz Martínez, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Departamento de Patología y Terapéutica experimental, Facultad de Medicina, Barcelona.
85. Sandeep, T.; Maier, E.; Benz, R.; and Hancock, R. E. (2007). Characterization of OpdH, a *Pseudomonas aeruginosa* Porin Involved in the Uptake of Tricarboxylates. *Journal Bacteriology* , 189 (3), 929-939.

86. Seira Ibáñez, J. (2008). Adsorción de boro mediante perlas de alginato. Tesis. Universitat Politècnica de Catalunya, Escola Politècnica Superior d' Enginyeria de Vilanova i la Geltrú, Departament: Enginyeria Química, Catalunya.
87. Seoud, M. A. (2003). Biodegradation of naphthalene by free and alginate entrapped *Pseudomonas sp.*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschun*, 58, 726-731.
88. Sharma, Neha; and Gupta, Vikas C. (2012). Batch biodegradation of phenol of paper and pulp effluent by *Aspergillus Niger*. *Intenational Journal of Chemical Engineering and Applications* , 3 (3), 182-187.
89. Services, A. F. (1998). Toxicological profile for phenol. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology and Environmental Medicine/Applied Toxicology Branch. Atlanta.
90. Silva Vargas, M. E. (2000). Preconcentración selectiva de fenoles contaminates prioritarios y determinación por espectrofotometría ultravioleta-visible, cromatografía líquida de alta eficacia y cromatografía de gases/espectrofotometría de masas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica, Madrid.
91. Siqueiros Tarazón, A. (2004). Aplicación de la Metodología de Superficie de Respuesta para el Mejoramiento de la Calidad del aceite de soya. Tesis, Universidad de Sonora, Departamento de matemáticas, División de Ciencias Exactas y Naturales, Sonora.
92. Sridevi, Velluru; Venkata Mahanti, Chandana Lakshmi; Narasimha Adimadhyam, Swamy Venkata; and Rao Medicherla, Narasimba. (2011). Statistical optimization of process variables by response surface methodology to enhance phenol degradation by *Pseudomonas putida* (NCIM2102). *Advances in Bioscience and Biotechnology* , 2, 175-181.
93. Suárez Herrera, M. A.; Fernández Delgadillo, S.S.; Gómez Treviño, J.A.; y Martínez Silva, Jorge. (2007). Cultivos bacterianos autóctonos con capacidad de degradar altas concentraciones de fenoles. Congreso Regional QFB, Memorias en extenso. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, México

94. Suárez Rodríguez, M. (1993). Degradación de los ácidos 3- y 4- Hidroxibenzoico en *Klebsiella pneumoniae*: Purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas. Tesis Doctoral. Universidad de Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Biología Celular, Madrid.
95. Thu, B.; Smidrod, O.; and Skjak Braek, G. (1996). Immobilized cells: Basics and Applications. Alginate gels – Some structure - function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. *Elsevier Science: Progress in Biotechnology* , 11, 19-30.
96. Ullhyan, A.; and Ghosh, U.K. (2012). Biodegradation of phenol with immobilized *Pseudomonas putida* activated carbon packed bio-filter tower. *African Journal of Biotechnology* , 11 (85), 15160-15167.
97. Valero Soria, H. A. (2009). Prototipo para producción de partículas esféricas por extrusión. Tesis. Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica. México-Durango.
98. Velmurugan, N.; Hwang, G.; Sathishkumar, M.; Kie Choi, T.; Kui Jae, L.; and Byung Taek, O. (2010). Isolation, identification, Pb(II) biosorption isotherms and kinetics of a lead adsorbing *Penicillium sp.* MRF-1 from South Korean mine soil. *Journal of Environmental* , 1049-1056.
99. Ying, W.; Ye, T.; Bin, H.; Hua-bing, Z.; Jian-nan, B.; and Bao-Li, C. (2007). Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter sp.* strain PD12. *Science Direct: Journal of Environmental Science*, 19 (2), 222-225.
100. Yordanova, G.; Godjevargova, T.; Nenkova, R.; and Ivanova, D. (2013). Biodegradation of phenol and phenolic derivatives by a mixtur of immobilized cells of *Aspergillus awamori* and *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnol. & Biotechnol.* 27 (2), 3681-3688.
101. Zanaty R., K.; Rabei M., G.; Ahmed A., S.; and Rehab M., M. (2006). Characterisation of acidic sites of *Pseudomonas aeruginosa* biomass capable of binding protons and cadmium and removal of cadmium via biosorption. *World Journal of Mic. World Journal of Microbiology* , 22, 975-982.
102. Zhao, G.; Zhou, L.; Li, Y.; Liu, X.; Ren, X.; and Liu, X. (2009). Enhancement of phenol degradation using immobilized microorganisms and organic modified montmorillonite in a two-phase partitioning bioreactor. *ELSEVIER: Journal of Hazardous Materials* , 160, 402-410.

103. Zhou, J.; Yu, X.; Ding, C.; Wang, Z.; Zhou, Q. P.; and Cai, W. (2011). Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences* , 23 (1), 22-30.

## ANEXOS

### Anexo 1: Preparación de medios

#### Anexo 1a: Medios de King A y King B

##### Reactivos para King A.

- Peptona: 20.0 g/L. Merck
- Sulfato de potasio: 10.0 g/L. Merck
- Cloruro de magnesio: 1.4 g/L. Merck
- Agar: 15.0 g/L. Merck
- Glicerina: 10 mL. Merck

##### Reactivos para King B.

- Tripteína: 10.0 g/L. Merck
- Peptona de carne: 10.0 g/L. Merck
- Fosfato dipotásico: 1.5 g/L. Merck
- Sulfato de magnesio: 1.5 g/L. Merck
- Agar: 15.0 g/L. Merck
- Glicerina: 10 mL. Merck

##### Procedimiento

- Pesar cada reactivo correspondiente a cada medio de King A y King B, que son colocadas en frascos de un litro cada uno, enseguida diluir con agua destilada.
- Los medios King A y King B, son esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min.
- Cada medio es vertido en grupos de placas petri (previamente rotuladas para cada medio, como King A y King B).

#### Anexo 1b: Agua peptonada

Pesar 7.5 g de peptona y diluir con agua destilada a 500 mL luego distribuir en tubos de ensayo (9 ml), seguidamente esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min.

### Anexo 1c: Agar nutritivo en plano inclinado

#### Reactivos

- Extracto de carne: 3 g/L. Merck.
- Peptona: 5 g/L. Merck.
- Agar agar: 15 g/L. Merck

#### Procedimiento

- Pesar los reactivos correspondientes, colocar a un frasco de un litro y disolver con agua destilada, seguidamente llevar a baño maría para la disolución completa.
- Colocar 5 mL de la disolución mencionada en tubos de ensayo con tapa rosca, seguidamente esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min, dejar enfriar en inclinación (la solidificación del medio en esta posición ayuda a obtener la forma de pico de flauta).

### Anexo 2: Pruebas de reconocimiento

#### Anexo 2a: Tinción Gram

- Procesamiento de la muestra.
  - Con el asa de siembra tomar una pequeña muestra de cultivo, de aproximadamente  $10^4$  -  $10^5$  microorganismos/cc (cantidad necesaria para que sea visible), que se coloca sobre una gota de agua del portaobjeto (previamente rotulado) donde se distribuye homogéneamente hasta alcanzar el frotis de 2 cm de diámetro aproximadamente, luego fijar a la muestra por flameo.
- Tinción Gram
  - A la muestra fija cubrir con cristal violeta por 40 segundos y eliminar el residual no adsorbido con una corriente suave de agua por 5 segundos.
  - Luego aplicar la solución lugol por 20 segundos, seguidamente lavar con una corriente suave de agua por 5 minutos.
  - Cubrir el frotis con solución alcohol-acetona por 10 segundos, luego lavar con una corriente suave de agua por 5 minutos.

- Por último a la muestra cubrir con colorante safranina por 15 segundos, lavar con una corriente suave de agua por 5 minutos y dejar secar a temperatura ambiente.
- Observar en microscopio.

#### Anexo 2b: Prueba de Oxidasa

- En agar nutritivo sembrar a las bacterias de estudio, luego incubar a 37°C por 24 horas.
- Colocar un trozo de papel de filtro de 3x3cm aproximadamente en una placa de petri.
- Agregar 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel.
- Extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado.
- La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos.

#### Anexo 2c: Prueba de Catalasa

- Con el asa de siembra tomar una colonia de cultivo de microorganismos crecido de 12 a 24 horas.
- Colocar a la colonia de microorganismos sobre un portaobjeto y añadir una gota de peróxido de hidrógeno al 30%.
- Observar la reacción

#### Anexo 2d: Pruebas de Citrato de Simmons, TSI, LIA, UREA.

Para el presente estudio se compraron medios preparados que se disolvieron y se usaron para el reconocimiento de cada microorganismo.

A continuación se detalla la forma de siembra para cada medio.

- Medio Citrato de Simmons: sembrar en superficie un inóculo ligero por estrías, usando un ansa sin arrastrar el agar.
- Medio TSI: sembrar el inóculo picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del medio.
- Medio LIA: sembrar al inóculo por punción profunda con aguja de inoculación.
- Medio UREA: sembrar por estrías sobre la superficie del pico de flauta.

#### Anexo 2e: Crecimiento en Agar Cetrimide. Medio específico para Pseudomonas

- Pesar 11.25 g de medio selectivo de agar cetrimide y diluir en 250 mL de agua destilada, esterilizar en autoclave por 15 min a 121 °C.

- Distribuir la solución en placas petris (previamente esterilizadas), dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Con un asa bacteriológica sembrar al microorganismo por la técnica de estrías, incubar a 37 °C por 24 horas.
- Observar su crecimiento.

## Anexo 3: Tablas del Decreto supremo 002-2008 MINAM (30/07/2008).

## Aprobación de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua

Tabla 42: Del anexo I: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua:

Categoría 1: Poblacional y Recreacional.

PARÁMETRO	UNIDAD	Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable			Aguas superficiales destinadas para recreación	
		A1	A2	A3	B1	B2
		VALOR	VALOR	VALOR	VALOR	VALOR
<b>FÍSICOS Y QUÍMICOS</b>						
Aceites y grasas (MEH)	mg/L	1,000	1,000	1,000	Ausencia de película visible	**
Cianuro libre	mg/L	0,005	0,022	0,022	0,022	0,022
Cianuro wad	mg/L	0,08	0,08	0,08	0,08	**
Cloruros	mg/L	250	250	250	**	**
Color	Color verdadero escala Pt/Co	15	100	200	Sin cambio normal	Sin cambio normal
Conductividad	us/cm	1500	1600	**	**	**
D.B.O.5	mg/L	3	5	10	5	10
D.Q.O.	mg/L	10	20	30	30	50
Dureza	mg/L	500	**	**	**	**
Detergentes (SAAM)	mg/L	0,5	0,5	na	0,5	Ausencia de espuma persistente
Fenoles	mg/L	0,003	0,01	0,1	**	**
Fluoruros	mg/L	1	**	**	**	**
Fósforo total	mg/L P	0,1	0,15	0,15	**	**
Materiales Flotantes		Ausencia de material flotante	**	**	Ausencia de material flotante	Ausencia de material flotante
Nitratos	mg/L N	10	10	10	10	**
Nitritos	mg/L N	1	1	1	1(5)	**
Nitrógeno amoniacal	mg/L N	1,5	2	3,7	**	**
Olor		Aceptable	**	**	Aceptable	**
Oxígeno disuelto	mg/L	≥ 6	≥ 5	≥ 4	≥ 5	≥ 4
pH	unidad de pH	6,5 - 8,5				
Sólidos disueltos totales	mg/L	1000	1000	1500	**	**
Sulfatos	mg/L	250	**	**	**	**
Sulfuros	mg/L	0,05	**	**	0,05	**
Turbiedad	UNT	5	100	**	100	**

Fuente: Normas Legales: El Peruano, 2008

A1: Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección.

A2: Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional.

A3: Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento Avanzado.

B1: Contacto primario.

B2: Contacto secundario.

\*\* Se entenderá que para esta sub-categoría, el parámetro no es relevante, salvo casos específicos que la Autoridad competente determine.

UNT: Unidad Nefelométrica Turbiedad

Tabla 43: Del anexo I: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua:  
Categoría 3: Riego de vegetales y bebidas de animales.

PARÁMETROS PARA RIEGO DE VEGETALES DE TALLO BAJO Y TALLO ALTO		
PARÁMETROS	UNIDAD	VALOR
Bicarbonatos	mg/L	370
Calcio	mg/L	200
Carbonatos	mg/L	5
Cloruros	mg/L	100-700
Coductividad	us/cm	< 2 000
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	15
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	40
Fluoruros	mg/L	1
Fosfatos- P	mg/L	1
Nitratos (NO <sub>3</sub> -N)	mg/L	10
Nitritos (NO <sub>2</sub> -N)	mg/L	0,06
Oxígeno Disuelto	mg/L	≥4
pH	Unidad de pH	6,5 -8,5
Sodio	mg/L	200
Sulfatos	mg/L	300
Sulfuros	mg/L	0,05
<b>Inorgánicos</b>		
Aluminio	mg/L	5
Arsénico	mg/L	0,05
Bario total	mg/L	0,7
Boro	mg/L	0,5-6
Cadmio	mg/L	0,005
Cianuro wad	mg/L	0,1
Cobalto	mg/L	0,05
Cobre	mg/L	0,2
Cromo (6+)	mg/L	0,1
Hierro	mg/L	1
Litio	mg/L	2,5
Magnesio	mg/L	150
Manganeso	mg/L	0,2
Mercurio	mg/L	0,001
Níquel	mg/L	0,2
Plata	mg/L	0,05
Plomo	mg/L	0,05
Selenio	mg/L	0,05
Zinc	mg/L	2
<b>Orgánicos</b>		
Aceites y Grasas	mg/L	1
Fenoles	mg/L	0,001
S.A.A.M. (detergentes)	mg/L	1
<b>Plaguicidas</b>		
Aldicarb	ug/L	1
Aldrín (CAS 309-00-2)	ug/L	0,004
Clordano (CAS 57-74-9)	ug/L	0,3
DDT	ug/L	0,001
Dieldrín (Nº CAS 72-20-8)	ug/L	0,7
Endrín	ug/L	0,004
Endosulfán	ug/L	0,02
Heptacloro (Nº CAS 76-44-8) y heptacloripoxido	ug/L	0,1
Lindano	ug/L	4
Paratión	ug/L	7,5

Fuente: Normas Legales: El Peruano, 2008

Tabla 44: Del anexo I: Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua:  
Categoría 3: Riego de vegetales y bebidas de animales.

PARÁMETROS PARA BEBIDAS DE ANIMALES		
PARÁMETROS	UNIDAD	VALOR
Fisicoquímicos		
Conductividad eléctrica	uS/cm	≤ 5000
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	≤ 15
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	40
Fluoruro	mg/L	2
Nitratos (NO <sub>3</sub> -N)	mg/L	50
Nitritos (NO <sub>2</sub> -N)	mg/L	1
Oxígeno Disuelto	mg/L	> 5
pH	Unidades de pH	6,5-8,4
Sulfatos	mg/L	500
Sulfuros	mg/L	0,05
Inorgánicos		
Aluminio	mg/L	5
Arsénico	mg/L	0,1
Berilio	mg/L	0,1
Boro	mg/L	5
Cadmio	mg/L	0,01
Cianuro WAD	mg/L	0,1
Cobalto	mg/L	1
Cobre	mg/L	0,5
Cromo (6+)	mg/L	1
Hierro	mg/L	1
Litio	mg/L	2,5
Magnesio	mg/L	150
Manganeso	mg/L	0,2
Mercurio	mg/L	0,001
Niquel	mg/L	0,2
Plata	mg/L	0,05
Plomo	mg/L	0,05
Selenio	mg/L	0,05
Zinc	mg/L	24
Orgánicos		
Aceites y grasas	mg/L	1
Fenoles	mg/L	0,001
S.A.A.M. (detergente)	mg/L	1

Fuente: Normas Legales: El Peruano, 2008

Anexo 4: Evaluación económica a nivel laboratorio de tratamiento del agua residual proveniente de los retretes de las aeronaves.

Tabla 45: Costo energético de aislamiento, identificación, adaptación y encapsulamiento del microorganismo.

Equipos de laboratorio y/o Gas	Potencia del equipo (W)	Costo unitario	Horas de trabajo de investigación	Costo energético S/.
Balanza analítica: Marca: Shimadzu, cód. AY120, serie: N° D423100046	12	* S/. 0.3154 kWH	2	0.008
Centrífuga: Marca: Atlanta G.A. Southern Scientific Co., serie 1	345		14	1.523
Agitador: Marca: PMC	45		74	1.050
Foto/phoresis I: Fotodyne	9		2	0.006
Microscopio binocular: Marca: Zuzi	30		48	0.454
Gas propano Repsol	Un balón de gas de 5 galones	S/. 37.00	5 horas de consumo de gas en plaqueados de medios, fijación de microorganismos, siembra de microorganismos.	2.467
<b>Costo energético total</b>				<b>5.50</b>

<http://www.ubaldolescano.com/index.php/2010/04/05/ahorro-de-energia-electrica-usando-monitores-lcd/>

Tabla 46: Costo de los reactivos utilizados en aislamiento, reconocimiento e inmóvilización de los microorganismos.

Reactivo	Unidad	Costo unitario S/.	Cantidad utilizada	Solución	Costo del medio S/.
<b>Agar nutritivo</b>					
Peptona de carne	500 g	170	8 g	1 L	2.72
Agar agar	500 g	151	15 g		4.53
Costo total del medio agar nutritivo					7.25
<b>King A</b>					
Peptona	500 g	189	20 g	1000 mL	7.56
Glicerina	1 L	75.2	10 mL		0.75
Agar agar	500 g	151	15 g		4.53
Sulfato de potasio	500 g	180	10 g		3.6
Cloruro de magnesio	500 g	185	1.4 g		0.52
Costo total del medio de King A					16.96
<b>King B</b>					
Tripteína	1 kg	552	10 g	1000 mL	5.52
Peptona de carne	500 g	170	10 g		3.4
Fosfato dipotásico	1 kg	176.72	1.5 g		0.26
Sulfato de magnesio	500 g	173	1.5g		0.52
Glicerina	1 L	75.2	10 mL		0.75
Agar agar	500 g	151	15 g		4.53
Costo total del medio de King B					14.98
Agar cetrimide	500 g	336.84	11.25 g	250 mL	7.58
Acido algínico	100 g	278	3.2 g	100 mL	8.89

Tabla 47: Resumen de costos de reactivos utilizados en aislamiento, reconocimiento, adaptación e inmovilización del microorganismo.

Medios y/o reactivo	Costo del medio S/.
Agar nutritivo	7.25
King A	16.96
King B	14.98
Agar cetrimide	7.58
Medio Fatherpure	3.77
Ácido algínico	8.89
Costo total	59.4

Tabla 48: Costo energético del análisis de una muestra y costo de consumo de agua potable para condensar una muestra.

Equipos de laboratorio	Potencia del equipo (W)	Costo unitario	Horas de trabajo de investigación	Costo energético S/.
Therm-plate: Marca: Precision Scientific Co.	1600	* S/. 0.3154	1	0.50464
Potenciómetro: Marca corning pH/ion meter 450	4.5		0.05	0.00007
Espectrofotómetro UV-1700. Marca: Shimadzu	130		0.083	0.0034
Consumo de agua potable				
Agua potable para condensar el destilado	** 01 m <sup>3</sup> agua x S/. 2.65		Caudal: 0.375 L por 30 s	0.1195
Costo total				0.6

\*<http://www.ubaldolescano.com/index.php/2010/04/05/ahorro-de-energia-electrica-usando-monitores-lcd/>

\* <http://publimetro.pe/actualidad/noticia-limenos-deberan-pagar-casi-doble-agua-13052>

Tabla 49: Costo de reactivos en el análisis de una muestra.

Reactivo	Unidad	Costo unitario S/.	Cantidad utilizada	Solución preparada	Costo de la solución preparada S/.	Cantidad utilizada en el análisis de una muestra	Costo de la solución para un análisis S/.
NH <sub>4</sub> OH	2.5 L	55	3.5 mL	100 mL	0.077	1.2 mL	0.0009
Hidróxido de sodio en lentejas	1 kg	39.5	10 g	100 mL	0.395	1 mL	0.0039
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	500 g	159	4 g	50 mL	1.272	0.3 mL	0.0076
Cloroformo	2.5 L	72	10 mL	10 mL	0.288	10 mL	0.288
4 aminoantipirina	100 g	244.2	0.25 g	25 mL	0.610	0.3 mL	0.0073
Sulfato de sodio anhidro	2.5 kg	155	1 g	1 g	0.062	1 g	0.062
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 kg	176.72	10.45 g	100 mL	1.847	2 mL	0.0516
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 kg	102.1	7.23 g		0.738		0.0147
Ácido fosfórico	1 L	50	10 mL	100 mL	0.500	2 mL	0.0100
Costo del análisis					5.789		0.45

## Anexo 5: Tablas de recopilación de autores en la degradación de fenol.

Tabla 50: Recopilación de temperaturas en la biodegradación del fenol con distintas cepas.

Tipo de biomasa	Temperatura			Velocidad de degradación	% eficiencia	Autor		
<i>Acinetobacter sp.</i> inmovilizado en PVA	30			óptimo		Ying et al., 2006		
Lodos activados	30				50	Marrot et al., 2006		
<i>Rhodococcus</i> UKM-P	20				120 horas	Nor, et al., 2010		
	25				120 horas			
	30				21 horas			
	40				24 horas			
Microorganismo nativo Codificado: ESDSPB <sub>2</sub>	20				48.62	Chakraborty et al., 2010		
	30				33.46			
	35				69.9			
	45				27.63			
<i>Rhodococcus</i> UKM-P	30			óptimo		Duan, 2011		
<i>P. fluorescens</i> (24h)	25	30	35		68	79	74	Bhattacharya et al., 2012
<i>P. fluorescens</i> (48h)					69	80	75	
<i>P. fluorescens</i> (72h)					68	80	74	
<i>P. aeruginosa</i> (24h)					42	64	62	
<i>P. aeruginosa</i> (48h)					44	65	63	
<i>P. aeruginosa</i> (72h)					43	63	61	
<i>B. cereus</i> (24h)					39	39	39	
<i>B. cereus</i> (48h)					38	40	40	
<i>B. cereus</i> (72h)					39	39	39	
<i>P. aeruginosa</i>	30			0,19 h <sup>-1</sup>	40	Ali et al., 2012		
	37			0,24 h <sup>-1</sup>	97			
	40			0,22 h <sup>-1</sup>	98			
	45			0,20 h <sup>-1</sup>	100			
	50			0,12 h <sup>-1</sup>	10			
<i>Pseudomonas sp.</i>	25				50	Janagi et al., 2012		
	30				60			
	35				80			
	40				30			
<i>Rhodococcus sp. strain</i> Y-1	20				40	Leile et al., 2012		
	25				53			
	30				90			
	35				76			
	40				43			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	30			1.83 mg/mL*h		Balamurugan et al., 2012		
	35			1.84 mg/mL*h				
	40			1.6 mg/mL*h				
	45			0.6 mg/mL*h				
<i>Rhodococcus</i> UKMP-5M	20				17.8	Nor et al., 2013		
	25				5.8			
	30				100			
	35				69.4			
	40				5.4			
ABGD-L-3, ABGD-L-12, ABGD-L-19, ABGD-L-27, y ABGD-L-35; ABGD-J- 2, ABGD-J-15 y ABGD-J-32; ABGD G-19 y ABGD-G-21	35			óptima		Rahman et al., 2013		
<i>Pseudomonas putida</i>	25				32	Shweta & Dhanayuthapani 2013		
	30				60			
	35				79			
	40				25			
	45				9			
	50				2			

Tabla 51: Recopilación de las constantes de isotermas.

Material de sorción-inmovilización	Isoterma de Langmuir		Isoterma de Freundlich		Isoterma de Redlich-Peterson		Autor
	K (mg/g)	R <sup>2</sup>	K <sub>F</sub>	R <sup>2</sup>	K	R <sup>2</sup>	
PAC	156.9	0.998	137.1	0.996			Orshansky & Narkis, 1997
Carbon activado - <i>P. aeruginosa</i> (AT 27853)	0.028						Puerto et al., (2009)
Geles de OMMT-PSF-microorganismo B350	0.0022	0.9703	0.51	0.991			Zhao et al., 2009
Agar nutritivo-bacterias hidrofóbicas			0.047	0.9889			Antizar & Galil, 2004
Carbon activado – <i>P. putida</i>	20.81	0.999	7.73	0.9797			Ullhyan & Ghosh, 2012
Cáscara de piña – <i>P. aeruginosa</i> NCIB 950	193.3	0.9998	8.23	0.9623	11.3	0.9998	Agarry & Aremu, 2012.
	163.3	0.9998	4.51	0.9424	5.52	0.9998	
	159.5	0.9998	2.58	0.9416	3.64	0.9998	
	153.5	0.9998	1.58	0.9395	2.41	0.9998	
Cáscara de piña – <i>P. aeruginosa</i> NCIB 950 (adsorción-biodegradación del naftaleno)	7.60	0.9907	1.85	0.9980	5.39	1.0	Agarry & Aremu, 2012.
	9.19	0.9992	0.98	0.9970	0.92	1.0	
	9.38	0.9999	0.53	0.9971	0.44	1.0	

Tabla II Distribución *t* de Student;  $t_{\alpha, \nu}$  para  $P(t \geq t_{\alpha, \nu}) = \alpha$ .

$\nu$	0.40	0.25	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0005
1	.325	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	636.309
2	.289	.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598
3	.277	.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.924
4	.271	.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610
5	.267	.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.869
6	.265	.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959
7	.263	.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	5.408
8	.262	.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041
9	.261	.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781
10	.260	.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.587
11	.260	.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437
12	.259	.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318
13	.259	.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	4.221
14	.258	.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140
15	.258	.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073
16	.258	.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015
17	.257	.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.965
18	.257	.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922
19	.257	.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883
20	.257	.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.850
21	.257	.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819
22	.256	.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792
23	.256	.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.768
24	.256	.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745
25	.256	.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725
26	.256	.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707
27	.256	.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690
28	.256	.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674
29	.256	.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.659
30	.256	.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646
40	.255	.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551
60	.254	.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.460
120	.254	.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.373
$\infty$	.253	.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291

Calculado con MINITAB por R. O. Kuehl.

Tabla IV Distribución  $F$ ;  $F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}$  para  $P(F \geq F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}) = \alpha$ .

		$\alpha = 0.10$																	
$\nu_2 \backslash \nu_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$
1	39.86	49.50	53.59	55.83	57.24	58.20	58.91	59.44	59.86	60.19	60.71	61.22	61.74	62.00	62.26	62.53	62.79	63.06	63.33
2	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.38	9.39	9.41	9.42	9.44	9.45	9.46	9.47	9.47	9.48	9.49
3	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.24	5.23	5.22	5.20	5.18	5.18	5.17	5.16	5.15	5.14	5.13
4	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.94	3.92	3.90	3.87	3.84	3.83	3.82	3.80	3.79	3.78	3.76
5	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.32	3.30	3.27	3.24	3.21	3.19	3.17	3.16	3.14	3.12	3.10
6	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.96	2.94	2.90	2.87	2.84	2.82	2.80	2.78	2.76	2.74	2.72
7	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.72	2.70	2.67	2.63	2.59	2.58	2.56	2.54	2.51	2.49	2.47
8	3.46	3.11	2.92	2.81	2.73	2.67	2.62	2.59	2.56	2.54	2.50	2.46	2.42	2.40	2.38	2.36	2.34	2.32	2.29
9	3.36	3.01	2.81	2.69	2.61	2.55	2.51	2.47	2.44	2.42	2.38	2.34	2.30	2.28	2.25	2.23	2.21	2.18	2.16
10	3.29	2.92	2.73	2.61	2.52	2.46	2.41	2.38	2.35	2.32	2.28	2.24	2.20	2.18	2.16	2.13	2.11	2.08	2.06
11	3.23	2.86	2.66	2.54	2.45	2.39	2.34	2.30	2.27	2.25	2.21	2.17	2.12	2.10	2.08	2.05	2.03	2.00	1.97
12	3.18	2.81	2.61	2.48	2.39	2.33	2.28	2.24	2.21	2.19	2.15	2.10	2.06	2.04	2.01	1.99	1.96	1.93	1.90
13	3.14	2.76	2.56	2.43	2.35	2.28	2.23	2.20	2.16	2.14	2.10	2.05	2.01	1.98	1.96	1.93	1.90	1.88	1.85
14	3.10	2.73	2.52	2.39	2.31	2.24	2.19	2.15	2.12	2.10	2.05	2.01	1.96	1.94	1.91	1.89	1.86	1.83	1.80
15	3.07	2.70	2.49	2.36	2.27	2.21	2.16	2.12	2.09	2.06	2.02	1.97	1.92	1.90	1.87	1.85	1.82	1.79	1.76
16	3.05	2.67	2.46	2.33	2.24	2.18	2.13	2.09	2.06	2.03	1.99	1.94	1.89	1.87	1.84	1.81	1.78	1.75	1.72
17	3.03	2.64	2.44	2.31	2.22	2.15	2.10	2.06	2.03	2.00	1.96	1.91	1.86	1.84	1.81	1.78	1.75	1.72	1.69
18	3.01	2.62	2.42	2.29	2.20	2.13	2.08	2.04	2.00	1.98	1.93	1.89	1.84	1.81	1.78	1.75	1.72	1.69	1.66
19	2.99	2.61	2.40	2.27	2.18	2.11	2.06	2.02	1.98	1.96	1.91	1.86	1.81	1.79	1.76	1.73	1.70	1.67	1.63
20	2.97	2.59	2.38	2.25	2.16	2.09	2.04	2.00	1.96	1.94	1.89	1.84	1.79	1.77	1.74	1.71	1.68	1.64	1.61
21	2.96	2.57	2.36	2.23	2.14	2.08	2.02	1.98	1.95	1.92	1.87	1.83	1.78	1.75	1.72	1.69	1.66	1.62	1.59
22	2.95	2.56	2.35	2.22	2.13	2.06	2.01	1.97	1.93	1.90	1.86	1.81	1.76	1.73	1.70	1.67	1.64	1.60	1.57
23	2.94	2.55	2.34	2.21	2.11	2.05	1.99	1.95	1.92	1.89	1.84	1.80	1.74	1.72	1.69	1.66	1.62	1.59	1.55
24	2.93	2.54	2.33	2.19	2.10	2.04	1.98	1.94	1.91	1.88	1.83	1.78	1.73	1.70	1.67	1.64	1.61	1.57	1.53
25	2.92	2.53	2.32	2.18	2.09	2.02	1.97	1.93	1.89	1.87	1.82	1.77	1.72	1.69	1.66	1.63	1.59	1.56	1.52
26	2.91	2.52	2.31	2.17	2.08	2.01	1.96	1.92	1.88	1.86	1.81	1.76	1.71	1.68	1.65	1.61	1.58	1.54	1.50
27	2.90	2.51	2.30	2.17	2.07	2.00	1.95	1.91	1.87	1.85	1.80	1.75	1.70	1.67	1.64	1.60	1.57	1.53	1.49
28	2.89	2.50	2.29	2.16	2.06	2.00	1.94	1.90	1.87	1.84	1.79	1.74	1.69	1.66	1.63	1.59	1.56	1.52	1.48
29	2.89	2.50	2.28	2.15	2.06	1.99	1.93	1.89	1.86	1.83	1.78	1.73	1.68	1.65	1.62	1.58	1.55	1.51	1.47
30	2.88	2.49	2.28	2.14	2.05	1.98	1.93	1.88	1.85	1.82	1.77	1.72	1.67	1.64	1.61	1.57	1.54	1.50	1.46
40	2.84	2.44	2.23	2.09	2.00	1.93	1.87	1.83	1.79	1.76	1.71	1.66	1.61	1.57	1.54	1.51	1.47	1.42	1.38
60	2.79	2.39	2.18	2.04	1.95	1.87	1.82	1.77	1.74	1.71	1.66	1.60	1.54	1.51	1.48	1.44	1.40	1.35	1.29
120	2.75	2.35	2.13	1.99	1.90	1.82	1.77	1.72	1.68	1.65	1.60	1.55	1.48	1.45	1.41	1.37	1.32	1.26	1.19
$\infty$	2.71	2.30	2.08	1.94	1.85	1.77	1.72	1.67	1.63	1.60	1.55	1.49	1.42	1.38	1.34	1.30	1.24	1.17	1.00

Tabla IV Distribución  $F$ ;  $F_{\alpha, v_1, v_2}$  para  $P(F \geq F_{\alpha, v_1, v_2}) = \alpha$ .

		$\alpha = 0.05$																		
$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$	
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3	
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50	
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53	
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63	
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36	
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67	
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23	
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93	
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71	
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54	
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40	
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30	
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21	
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13	
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07	
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01	
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96	
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92	
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88	
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84	
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81	
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78	
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76	
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73	
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71	
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69	
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67	
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65	
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64	
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39	
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25	
$\infty$	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00	

Tabla IV Distribución  $F$ ;  $F_{\alpha, v_1, v_2}$  para  $P(F \geq F_{\alpha, v_1, v_2}) = \alpha$ .

$\alpha = 0.05$																			
$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
$\infty$	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

Tabla IV Distribución  $F$ ;  $F_{\alpha, v_1, v_2}$  para  $P(F \geq F_{\alpha, v_1, v_2}) = \alpha$ .

		$\alpha = 0.01$																		
$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$	
1	4052	4999.5	5403	5625	5764	5859	5928	5982	6022	6056	6106	6157	6209	6235	6261	6287	6313	6339	6366	
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39	99.40	99.42	99.43	99.45	99.46	99.47	99.47	99.48	99.49	99.50	
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35	27.23	27.05	26.87	26.69	26.60	26.50	26.41	26.32	26.22	26.13	
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.37	14.20	14.02	13.93	13.84	13.75	13.65	13.56	13.46	
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.89	9.72	9.55	9.47	9.38	9.29	9.20	9.11	9.02	
6	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.72	7.56	7.40	7.31	7.23	7.14	7.06	6.97	6.88	
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.47	6.31	6.16	6.07	5.99	5.91	5.82	5.74	5.65	
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.67	5.52	5.36	5.28	5.20	5.12	5.03	4.95	4.86	
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.11	4.96	4.81	4.73	4.65	4.57	4.48	4.40	4.31	
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.71	4.56	4.41	4.33	4.25	4.17	4.08	4.00	3.91	
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.40	4.25	4.10	4.02	3.94	3.86	3.78	3.69	3.60	
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.16	4.01	3.86	3.78	3.70	3.62	3.54	3.45	3.36	
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	3.96	3.82	3.66	3.59	3.51	3.43	3.34	3.25	3.17	
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.80	3.66	3.51	3.43	3.35	3.27	3.18	3.09	3.00	
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.67	3.52	3.37	3.29	3.21	3.13	3.05	2.96	2.87	
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.55	3.41	3.26	3.18	3.10	3.02	2.93	2.84	2.75	
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.46	3.31	3.16	3.08	3.00	2.92	2.83	2.75	2.65	
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.37	3.23	3.08	3.00	2.92	2.84	2.75	2.66	2.57	
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.30	3.15	3.00	2.92	2.84	2.76	2.67	2.58	2.49	
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.23	3.09	2.94	2.86	2.78	2.69	2.61	2.52	2.42	
21	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40	3.31	3.17	3.03	2.88	2.80	2.72	2.64	2.55	2.46	2.36	
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.12	2.98	2.83	2.75	2.67	2.58	2.50	2.40	2.31	
23	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.07	2.93	2.78	2.70	2.62	2.54	2.45	2.35	2.26	
24	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26	3.17	3.03	2.89	2.74	2.66	2.58	2.49	2.40	2.31	2.21	
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	2.99	2.85	2.70	2.62	2.54	2.45	2.36	2.27	2.17	
26	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18	3.09	2.96	2.81	2.66	2.58	2.50	2.42	2.33	2.23	2.13	
27	7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15	3.06	2.93	2.78	2.63	2.55	2.47	2.38	2.29	2.20	2.10	
28	7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12	3.03	2.90	2.75	2.60	2.52	2.44	2.35	2.26	2.17	2.06	
29	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09	3.00	2.87	2.73	2.57	2.49	2.41	2.33	2.23	2.14	2.03	
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.84	2.70	2.55	2.47	2.39	2.30	2.21	2.11	2.01	
40	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89	2.80	2.66	2.52	2.37	2.29	2.20	2.11	2.02	1.92	1.80	
60	7.08	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72	2.63	2.50	2.35	2.20	2.12	2.03	1.94	1.84	1.73	1.60	
120	6.85	4.79	3.95	3.48	3.17	2.96	2.79	2.66	2.56	2.47	2.34	2.19	2.03	1.95	1.86	1.76	1.66	1.53	1.38	
$\infty$	6.63	4.61	3.78	3.32	3.02	2.80	2.64	2.51	2.41	2.32	2.18	2.04	1.88	1.79	1.70	1.59	1.47	1.32	1.00	