

**SIMULACIÓN DE PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS, UNA
APROXIMACIÓN A TRAVÉS DE MODELOS CINÉTICOS DE BIODEGRADACIÓN**

WILMAR ORTIZ JAIMES

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2007

**SIMULACIÓN DE PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS, UNA
APROXIMACIÓN A TRAVÉS DE MODELOS CINÉTICOS DE BIODEGRADACIÓN**

WILMAR ORTIZ JAIMES

**Proyecto de grado para optar el título de
Ingeniero Químico**

RODRIGO TORRES SAEZ
Director

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

TABLA DE CONTENIDO

1	CONCEPTOS TEÓRICOS.....	3
1.1	Biodegradación	3
1.1.1	Degradación Aerobia	3
1.2	Biorremediación	3
1.3	Variables Que Intervienen En La Dinámica De Los Hidrocarburos En Suelo	4
1.4	Proceso Biológico	5
1.4.1	Factores Influyentes Sobre La Comunidad Microbiana.....	5
2.	DESARROLLO.....	7
2.1	Identificación Del Problema	7
2.2	Definición Del Sistema.....	9
2.3	Formulación Del Modelo	10
2.3.1	Modelos Básicos Para La Biorremediación In Situ:.....	10
2.3.2	Crecimiento De La Biomasa Con Límite De Nutrientes:.....	13
2.3.3	Crecimiento Con Límite De Volumen:.....	13
2.3.4	Competencia Por Sustratos:	14
2.3.5	Inhibición:	15
2.3.6	Co-metabolismo Aeróbico.....	16
2.4	Implementación Del Modelo En El Computador.....	16
2.4.1	Diagrama De Flujo Para La Caracterización De La Simulación	17
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .	20
4.	CONCLUSIONES	29
5.	BIBLIOGRAFÍA	30
6.	ANEXOS	32

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 representación del microsistema de biodegradación.	9
Fig. 2 Diagrama de flujo para la caracterización de la simulación.....	18
Fig.3 Cinética de crecimiento de biomasa en la fase acuosa durante el proceso de biorremediación. Condiciones de cinética de crecimiento de Monod simple.	21
Fig.4 Cinética de crecimiento de biomasa en la fase acuosa con inhibición, con limitación de nutrientes y de volumen de biomasa	22
Fig.5 Cinética de crecimiento de biomasa en la fase acuosa bajo competencia por sustrato.....	22
Fig.6 Cinética de biodegradación de sustrato en la fase acuosa a un valor de $\mu_{\max} = 1 \text{ d}^{-1}$	24
Fig. 7 Cinética de biodegradación de sustrato en la fase acuosa a un valor de $\mu_{\max} = 3 \text{ d}^{-1}$	24
Fig.8 Cinética de biodegradación de sustrato en la fase acuosa a un valor de $\mu_{\max} = 6 \text{ d}^{-1}$	25
Fig. 10 Variación en el tiempo de la concentración de sustrato adherido a la biomasa durante el proceso de biorremediación. Con co-metabolismo.	26
Fig. 11 Variación biomasa adherida a la fase sólida del suelo durante el proceso de biorremediación. Sin co-metabolismo.....	26
Fig. 12 Variación biomasa adherida a la fase sólida del suelo durante el proceso de biorremediación. Con co-metabolismo.	27

Fig. 13 Variación de biomasa en la fase acuosa utilizando una concentración de sustrato de 10 mg/L.	27
Fig. 14 Variación de biomasa en la fase acuosa utilizando una concentración de sustrato de 30 mg/L.	28
Fig. 15 Esquema de la disposición en el espacio de los agregados constituyentes del suelo.....	38
Fig. 16 rangos de concentración hidrogeniónica.....	42
Fig.17 Rangos de temperatura para de los diferentes tipos de microorganismos.	42
Fig. 19 Relaciones entre los microorganismos y el O ₂	45
Fig.20 Representación modular de un objeto de modelado.....	49
Fig. 22 interacción entre poblaciones de microorganismos.....	60
Fig. 23 esquema de cometabolismo.	61
Fig. 25 Configuración de los parámetros de simulación en Matlab.....	65
Fig. 26 Configuración de los parámetros de simulación en Matlab.....	66

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	33
PROCESOS DE BIODEGRADACIÓN.....	33
ANEXO B	48
MODELACIÓN MATEMÁTICA DE PROCESO BIOLÓGICOS DE TRATAMIENTO ...	48
ANEXO C	57
INTERACCIONES SINÉRGICAS ENTRE MICROORGANISMOS	57
ANEXO D	62
USO DE LA INTERFAZ GRAFICA SIMULINK	62

RESUMEN

TITULO: SIMULACIÓN DE PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN EN SUELOS, UNA APROXIMACIÓN A TRAVÉS DE MODELOS CINÉTICOS DE BIODEGRADACIÓN *

AUTOR:

WILMAR ORTIZ JAIMES y RODRIGO TORRES SÁEZ**

PALABRAS CLAVES:

BIORREMEDIACIÓN, MODELOS MATEMÁTICOS, SIMULACIÓN DE BIOPROCESOS

DESCRIPCIÓN:

El uso de la biorremediación es considerada actualmente como una alternativa tecnológica de tratamiento de contaminantes. Esta metodología ofrece sustanciales beneficios no encontrados en otros procesos de descontaminación. El costo de la biorremediación es muy bajo (eficiencia), no destructivo, relativamente sencillo en la implementación, no requiere de equipos especializados y puede ser sumamente eficaz removiendo, por ejemplo, los hidrocarburos recalcitrantes del petróleo.

Este estudio es una extensión de investigaciones previas, enfatizando en el desarrollo de una integración numérica de sistemas modelados para simular procesos de biodegradación *in situ*. Para ello se desarrolló un programa de simulación numérico con el software Matlab-simulink para describir el crecimiento bacteriano en una matriz sólida (sub-suelo) y la degradación del sustrato contaminante. Los modelos de biodegradación involucran la competencia por sustrato, límite de nutrientes, inhibición por productos tóxicos y cometabolismo aeróbico. Los resultados de este programa fueron consistentes y el modelo describe el proceso de biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos.

* Trabajo de Grado. Estudiante. Escuela de Ingeniería de Química.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Profesor Asistente.

ABSTRACT

TITLE: SIMULATION OF SOIL BIOREMEDIATION PROCESSES, AN APPROXIMATION THROUGH KINETIC MODELS OF BIODEGRADATION*

AUTHOR:

WILMAR ORTIZ JAIMES y RODRIGO TORRES SÁEZ**

KEYWORDS:

BIOREMEDIATION, SIMULATION, MATLAB

DESCRIPTION:

The use of bioremediation is considered as an alternative remediation technology of contaminant treatment. This methodology offers substantial benefits not found in other remediation processes. Bioremediation is very cost effective, non-destructive, relatively uncomplicated in implementing, requires non-specialized equipment, and can be extremely effective, e.g. in removing recalcitrant petroleum hydrocarbons.

This study is an extension of previous investigations, emphasizing on the development of numerical integration of model systems for simulating of *in situ* biodegradation process. For this study, a numerical simulation program was developed in the software Matlab-Simulink that describes the bacterial growth in the subsurface and the biodegradation of contaminant substrate. The biodegradation models involve substrate competition, nutrient limitation, product toxic inhibition and aerobic co-metabolism. Results from this program were found to be consistent and the model describes the bioremediation process in hydrocarbon contaminated soils.

* Degree Work. Student. School of Chemical Engineering.

** Faculty of Sciences, Assistant professor, School. Of Chemistry.

INTRODUCCIÓN

Cuando ocurre un derrame de petróleo en un suelo, los compuestos de bajo peso molecular generalmente se pierden por volatilización, mientras que los hidrocarburos poliaromáticos y heterocíclicos permanecen como remanente, haciéndose de esta manera persistentes en el suelo. Los hidrocarburos poliaromáticos, moléculas aromáticas con dos o más anillos, heterocíclicos y sus homólogos alquil sustituidos, que son liberados en los ecosistemas, constituyen un grave problema ambiental porque contaminan fuentes de agua y suelos, ocasionando gran impacto ecológico, en virtud de los efectos recalcitrantes y tóxicos que ejercen sobre los seres vivos. Es por ello que estos hidrocarburos deben ser removidos o su concentración debe ser sustancialmente reducida del ambiente. Con este propósito, frecuentemente son utilizados procesos de degradación industrial tanto químicos como físicos.

Durante los últimos años ha sido objeto de intensa investigación el desarrollo de biotecnologías que complementen los procesos fisicoquímicos ya existentes, basadas en la utilización de microorganismos para la recuperación de los ambientes contaminados con petróleo y otros combustibles, en virtud de la capacidad que poseen estos organismos de oxidar los compuestos hidrocarbonados del petróleo, degradándolos hasta metabolitos que pueden ser fácilmente removidos o dispersados al ambiente.

En este sentido, es posible utilizar microorganismos para los procesos de biodegradación, ya que por ejemplo, las bacterias pueden degradar los hidrocarburos por que contienen las enzimas involucradas en las rutas metabólicas degradativas de este tipo de moléculas. Se ha demostrado a través de estudios fisiológicos y genéticos que existen diversas rutas para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en especies bacterianas diferentes. En la actualidad, el modelamiento y la simulación son actividades indispensables cuando nos enfrentamos con el análisis y diseño de sistemas multidisciplinarios de cierta complejidad, como en el caso de la biodegradación. El objetivo es ayudar o dar el soporte necesario durante el proceso de diseño, análisis y diagnóstico de sistemas ingenieriles. El software debe complementar el talento del diseñador para que éste pueda modelar y simular de forma lo más eficientemente posible. El software hace posible establecer una valoración final antes de que los sistemas sean construidos, y pueden aliviar la

necesidad de experimentos caros y dar soporte a todas las etapas de un proyecto desde el diseño conceptual, pasando por el montaje hasta llegar a su funcionamiento.

1 CONCEPTOS TEÓRICOS

1.1 Biodegradación

Es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos biológicos. En principio, todo compuesto sintetizado biológicamente puede ser descompuesto biológicamente. Sin embargo, muchos compuestos biológicos son difícilmente degradados por los microorganismos debido a sus características químicas.

La biodegradación es un proceso natural ventajoso no sólo por permitir la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración, sino que además es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y crecimiento de los organismos (carbohidratos, lípidos, proteínas). La descomposición puede llevarse a cabo en presencia de oxígeno (aeróbica) o en su ausencia (anaeróbica). La primera es más completa y libera energía, dióxido de carbono y agua, es la de mayor rendimiento energético y se describe así:

1.1.1 Degradación Aerobia



La biodegradación aerobia es la reacción más fácil para la aceptación de electrones terminales y es usada para la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo. Este proceso de degradación ocurre en presencia de microorganismos aerobios. Así, los productos terminales de la mineralización de compuestos orgánicos son dióxido de carbono, agua y masa de la célula.

La degradación bajo condiciones anaerobias puede ser relativamente lenta.

1.2 Biorremediación

La biorremediación constituye un conjunto de técnicas que permiten aumentar la biomasa microbiana del suelo, estimulando la biodegradación de hidrocarburos. Bajo esta denominación se agrupan una variedad de procesos de biotratamiento que varían en sus mecanismos de acción (ver anexo A), sobretudo los de mineralización,

transformación parcial, humificación y alteración del potencial redox. Cerca de trescientos compuestos contaminantes del suelo se consideran factibles de biodegradación microbiana, por lo que la biorremediación se aplica en ambientes contaminados por derramamiento de petróleo bruto y derivados (benceno, xileno, tolueno, etc.).

Para lograr una efectiva biodegradación es necesaria la presencia de microorganismos o de asociaciones microbianas apropiadas, así como de condiciones ambientales adecuadas para la actividad biológica. Se requieren además, conocimientos de ecología microbiana y de bioingeniería a los efectos de diseñar condiciones favorables para el desarrollo y actividad microbiana para descontaminar ambientes naturales.

La biorremediación puede utilizar dos estrategias distintas: la bioestimulación, basada en la activación de las poblaciones microbianas autóctonas, y el bioaumento, basado en la inoculación de cepas o consorcios microbianos de laboratorio (ver anexo A).

1.3 Variables Que Intervienen En La Dinámica De Los Hidrocarburos En Suelo

Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el suelo dependerán de la cantidad y composición de petróleo; la frecuencia y tiempo de exposición; el estado físico del derrame; las características del emplazamiento donde sucedió el derrame; variables ambientales como temperatura, humedad y oxígeno, y sensibilidad de la biota específica del ecosistema impactado.

Probablemente el componente más importante del suelo en relación con la persistencia de sustancias tóxicas es la arcilla. La persistencia aumenta al disminuir el tamaño de las partículas debido a que aportan una gran área superficial para la absorción de los productos químicos.

Las propiedades químicas del suelo más afectadas por un derrame de hidrocarburos son el aumento del carbono orgánico, ya que el 75% del carbono del petróleo es oxidable; la disminución de pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos; el aumento de manganeso, hierro intercambiable y el aumento del fósforo disponible. Sin duda, además de las propiedades físicas y químicas, las biológicas también sufren modificaciones cuando se contamina un suelo por hidrocarburos. Los microorganismos necesitan un microhábitat adecuado para

ejercer su actividad y con ello colaborar al buen funcionamiento de los ciclos de elementos naturales en el suelo

1.4 Proceso Biológico

Como las reacciones químicas, la biodegradación es un mecanismo destructivo de la atenuación. Muchos estudios han demostrado que la biodegradación por los microorganismos nativos puede contribuir perceptiblemente a la degradación de compuestos orgánicos. Para algunos hidrocarburos del petróleo, la biodegradación se considera el mecanismo primario por el cual la masa del contaminante desaparece.

1.4.1 Factores Influyentes Sobre La Comunidad Microbiana

La concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes está influenciada por diversos factores (ver anexo A):

- Necesidad de nutrientes: El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los microorganismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y biosíntesis. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno. Por lo general, suele haber en el suelo una concentración de nutrientes suficiente, sin embargo, si estos no se encuentran en el rango normal se puede adicionar mayor cantidad al medio. El rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1.
- pH del suelo: afecta significativamente en la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo, el pH también afecta directamente la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo. La acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando azufre o compuestos del azufre.
- Temperatura: generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45 °C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C.

– Humedad: los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo. El rango varía en función de la técnica.

– Estructura química del hidrocarburo: la inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular. Siendo los parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica. Entonces, la biodegradación, en este caso, es un proceso de transferencia de electrones (proceso de óxido-reducción). La energía requerida para la síntesis y el mantenimiento de la célula se obtiene con la oxidación de los compuestos del hidrocarburo. Los electrones se retiran de los substratos orgánicos (donantes de electrones) para capturar la energía disponible con el proceso de la oxidación. Los aceptores terminales de electrones son necesarios para captar los electrones que se mueven a través de sistemas de transferencia de electrones o de cadenas respiratorias.

2. DESARROLLO

2.1 Identificación Del Problema

El modelamiento de procesos biológicos es un instrumento para describir y verificar los procesos cinéticos que intervienen en el tratamiento biológico de suelos contaminados y una herramienta para predecir el comportamiento de los procesos, aplicable al diseño, evaluación y control de procesos de tratamiento biológico de contaminantes. Los modelos de los procesos de tratamiento biológico varían en su complejidad, según el número de componentes y procesos biológicos considerados; según se trate de modelos de estado estacionario o modelos dinámicos.

Se describe el proceso biológico a través de un número de componentes del suelo contaminado, que siguen unos procesos biológicos de transformación, y cuya concentración se expresa a través de un sistema de ecuaciones diferenciales (modelos), que se obtienen mediante balances de materia de los diferentes componentes.

Los procesos biotecnológicos son altamente no lineales y variables en el tiempo. Esta última característica, se debe al hecho de que los microorganismos están cambiando, aunque lentamente, su fisiología y morfología de forma continua, presentándose las fases o estados de la población microbiana. Cada uno de estos estados requiere de un modelo particular para ser descrito. Por otra parte, el comportamiento no lineal se debe a muchos factores como son la cinética del crecimiento celular, la formación de productos, las limitaciones termodinámicas y otros.

La solución numérica de las ecuaciones diferenciales es un esencial ingrediente de la simulación numérica. Hay varias maneras de encontrar soluciones de aproximación numérica para las ecuaciones diferenciales. Los métodos son basados en la idea de reemplazar las ecuaciones diferenciales por una ecuación de diferencia. El método de Euler es basado en aproximación de la derivativa por una diferencia de primer orden. Hay técnicas más eficientes tales como Runge-Kutta y métodos de múltiple pasos. En este estudio se utilizó la herramienta computacional llamada SIMULINK (originalmente llamado SIMULAB), que se integra con MATLAB, es especialmente diseñado para trabajar con diagramas de bloques usando MATLAB para el análisis dinámico del sistema. Los diagramas de bloques de SIMULINK pueden ser definidos como ecuaciones de estado.

La simulación consiste básicamente en resolver un **problema de valor inicial**. Hay que definir los **valores iniciales** de las variables de estado, así como la evolución temporal (para todo el periodo a simular) de las entradas del sistema, y otras variables independientes del sistema. Este conjunto de datos constituyen el **escenario** de la simulación.

Un modelo matemático puede ser estructuralmente correcto, pero hay que identificar los valores de los parámetros que hacen que el modelo explique bien el comportamiento real. Este proceso se llama identificación de parámetros o **calibración** del modelo, y requiere de series temporales de datos y la minimización del error entre los valores simulados a los reales, mediante el ajuste de los parámetros cinéticos, físicos u operacionales del modelo.

Se encuentran en la bibliografía valores típicos de los parámetros de un modelo. Sin embargo, se requiere normalmente ajustar los valores de los parámetros para obtener una mejor aproximación del modelo a la realidad. Este proceso se llama identificación de parámetros o calibración del modelo.

Para el proceso de calibración se requiere disponer de datos reales del sistema, simular con el modelo el comportamiento del mismo, y calcular el error entre la estimación y el modelo. Manualmente o mediante rutinas de optimización se modifican sistemáticamente los parámetros del modelo con el fin de minimizar una función de error (error entre modelo y datos). Esta es la **función objetivo**. Existen diferentes tipos de funciones objetivo y de algoritmos de optimización.

2.2 Definición Del Sistema

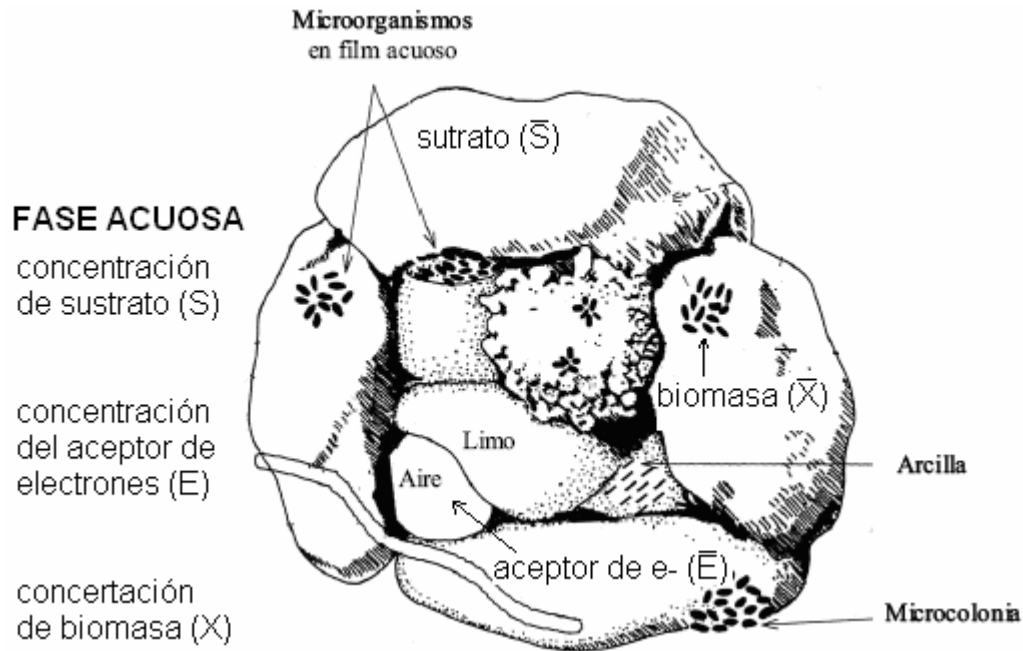


Fig. 1 Representación del microsistema de biodegradación.

La figura 1 ilustra el sistema simulado, el cual está constituido por una fase acuosa, en esta se encuentra disuelta parte del sustrato, oxígeno (aceptor de electrones) y biomasa. Una fase "sólida" en la cual se encontrarán adheridas el sustrato, oxígeno y biomasa.

Los hidrocarburos disueltos en la fase acuosa servirán de sustrato para los microorganismos adheridos y las no adheridas al sub-suelo. La mayoría de contaminantes serán removidos de la fase acuosa por la reacción de biodegradación dentro de la biomasa adherida.

Los micro-organismos son uniformemente distribuidos en el sólido.

El número de células por micro-colonia, densidad de biomasa y volumen son constantes.

Los componentes químicos dentro de la biomasa adherida no son adsorbidos por los sólidos en la fase acuosa

2.3 Formulación Del Modelo

Forma general del balance diferencial de masa (condiciones no estacionarias):

$$\sum \left(\begin{array}{c} \text{Flujos másicos} \\ \text{de entrada por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right) - \sum \left(\begin{array}{c} \text{Flujos másicos} \\ \text{de salida por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right) + \sum \left(\begin{array}{c} \text{Términos} \\ \text{cinéticos} \\ \text{g/d} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{de materia por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right)$$

Ec. [1]

Teniendo en cuenta la delimitación del sistema, para la ecuación [1], los términos del lado izquierdo de la ecuación, solo tiene lugar los términos cinéticos (reacción).

2.3.1 Modelos Básicos Para La Biorremediación In Situ:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{Ak_s \bar{X}}{m_c} (S - \bar{S}) - \frac{\mu_{\max} X}{Y} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{E}{K_E + E} \right) - k_{\text{abio}} S$$

Ec. [2]

Donde S es la concentración de sustrato en la fase acuosa (masa de sustrato por unidad de volumen de la fase acuosa);

$$\frac{d\bar{S}}{dt} = \frac{Ak_s}{V_c} (S - \bar{S}) - \frac{\mu_{\max} \rho_X}{Y} \left(\frac{\bar{S}}{K_s + \bar{S}} \right) \left(\frac{\bar{E}}{K_E + \bar{E}} \right) - k_{\text{abio}} \bar{S}$$

Ec. [3]

$\bar{S}$ Es la concentración de sustrato adherido a la biomasa (masa de sustrato por unidad de volumen de biomasa);

$$\frac{dE}{dt} = -\frac{Ak_E \bar{X}}{m_c} (E - \bar{E}) - \frac{\mu_{\max} X M_E}{Y} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left(\frac{E}{K_E + E} \right)$$

Ec. [4]

E Es la concentración del aceptor de electrones en la fase acuosa (masa del aceptor de electrones por unidad de volumen de la fase acuosa);

$$\frac{d\bar{E}}{dt} = \frac{Ak_E}{V_c} (E - \bar{E}) - \frac{\mu_{\max} \rho_X M_E}{Y} \left(\frac{\bar{S}}{K_s + \bar{S}} \right) \left(\frac{\bar{E}}{K_E + \bar{E}} \right)$$

Ec. [5]

$\bar{E}$ Es la concentración del aceptor de electrones en la fase acuosa adherido a la biomasa (masa del aceptor de electrones por unidad de volumen de biomasa);

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(\frac{E}{K_E + E} \right) - bX \quad \text{Ec. [6]}$$

X Es la concertación en la fase acuosa de biomasa no adherida (masa de células no adherida por unidad de volumen de fase acuosa);

$$\frac{d\bar{X}}{dt} = \mu_{\max} \bar{X} \left(\frac{\bar{S}}{K_S + \bar{S}} \right) \left(\frac{\bar{E}}{K_E + \bar{E}} \right) - b\bar{X} \quad \text{Ec. [7]}$$

$\bar{X}$ Es la concentración de biomasa adherida (masa de células adheridas por volumen de fase acuosa);

(Ecuaciones 2 a 7, de Blanc 1998)

A es el área superficial de una micro-colonia (L^2); k_E es el coeficiente de transferencia de masa del aceptor de electrones (LT^{-1}); k_s es el coeficiente de transferencia de masa del sustrato (LT^{-1}); $\mu_{\max}$ es la velocidad máxima específica de crecimiento (T^{-1}); m_c es la masa de células en una sola micro-colonia, $m_c = \rho_x V_c$ (M); M_E es la masa del aceptor de electrones consumido por masa de sustrato biodegradado; ρ_x es la densidad de biomasa (masa de células por volumen de biomasa); V_c es el volumen de una sola micro colonia (L^3); Y es el coeficiente de rendimiento (masa de células por volumen de biomasa); K_s es el constante de saturación media del sustrato (ML^{-3}); K_E es la constante de saturación media del aceptor de electrones (ML^{-3}); k_{abio} es la constante de primer orden de la velocidad de reacción, para la reacción de descomposición abiótica, (T^{-1}); b es el constante de descomposición endógena (T^{-1}); y t es el tiempo (T).

La reducción de contaminante en la fase acuosa, Ec. [2] resulta de tres mecanismos. El primer término es el responsable de la difusión de contaminante de la fase líquida a través de una película de líquido estancado dentro de la biomasa adherida. El segundo es acerca de la reducción de contaminantes por microorganismos no

adheridos, en la fase líquida, donde la velocidad de descomposición es afectada por la concentración del contaminante y la del aceptor de electrones, por la cinética de crecimiento de Monod. El tercer término corresponde a la pérdida abiótica en función de la concentración de contaminantes (reacción de primer orden). Se requiere una ecuación similar a la presentada en la Ec. [2] para cada sustrato.

La ecuación [3] describe la pérdida de sustrato en el interior de la biomasa adherida, el proceso de difusión en el interior de la biomasa adherida, la biodegradación en el interior de la biomasa y la descomposición abiótica. La competencia por el sustrato, la limitación de nutrientes, la inhibición y la limitación del poder de reducción también pueden ser incorporados en estos términos, como en la Ec. [2].

Las ecuaciones [4] y [5] describen la pérdida del aceptor de electrones y tienen la misma forma que las ecuaciones [2] y [3].

Las ecuaciones [6] y [7] simulan el crecimiento y decaimiento de la biomasa no adherida y la adherida, respectivamente. La concentración de la biomasa adherida ($\bar{X}$) depende de la densidad de biomasa, el volumen y la masa de la micro-colonia:

$$\bar{X} = \frac{C_c \rho_b m_c}{n\phi} \quad \text{Ec. 8}$$

(de Blanc 1998)

Donde C_c es el numero de células por masa de sólido; ρ_b es la densidad volumétrica media de los poros; n , Es el número de células por micro colonia (una constante); y ϕ es la porosidad. Dado que la densidad de biomasa, número de células, masa de una micro-colonia y la porosidad media son asumidas como constantes, $\bar{X}$ es proporcional a C_c o alternativamente C_c/n , (el número de micro colonias). Por otra parte, el área disponible para el transporte de especies de la fase acuosa de biomasa es directamente proporcional a $\bar{X}$, debido a que el área superficial por micro-colonia es asumida constante.

2.3.2 Crecimiento De La Biomasa Con Límite De Nutrientes:

La cinética de Monod asume que la limitación por nutrientes también controla el crecimiento de los micro-organismos, tal como lo hacen los sustratos y los aceptores de electrones. Cuando las especies químicas o nutrientes, tales como nitrógeno o fósforo, son factores limitantes, la velocidad máxima específica de crecimiento puede ser modificado por el correspondiente término para responder a esa limitación adicional.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(\frac{E}{K_E + E} \right) \left(1 - \frac{X}{0.9\rho_X} \right) - bX \quad \text{Ec. [9]}$$

(Odencrantz, 1991)

Donde N es la concentración de nutriente límite (ML^{-3}); y K_N es la constante de saturación media del nutriente límite (ML^{-3}).

2.3.3 Crecimiento De La Biomasa Con Límite De Volumen:

Las expresiones básicas del crecimiento de biomasa, ecuaciones [6] y [7] contienen un término adicional para limitar el volumen de la biomasa. Con esta limitación, la forma general del crecimiento de biomasa es:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(\frac{A}{K_A + A} \right) \left(1 - \frac{X}{0.9\rho_X} \right) - bX \quad \text{Ec. [10]}$$

(de Blanc, 1998)

Donde ρ_X es la densidad de biomasa (típicamente alrededor de $0.1 \frac{g}{cm^3}$). El crecimiento lineal de la biomasa expresa los límites del volumen total de biomasa en 90% del volumen de la fase acuosa. En bajas concentraciones de biomasa, tales límites tienen un efecto insignificante en el crecimiento de la biomasa y el consumo de sustrato, por que la biomasa ocupa un volumen pequeño del espacio total del poro. Cuando la concentración de biomasa empieza a ocupar una fracción significativa del volumen del poro, como puede esperarse en una bioremediación in-situ con inyección de agua, la clave del modelo es suponer que las biopelículas en el espacio del poro

son delgadas y pueden ser completamente penetradas y llenados. La reducción (o cerca de no continuar) el crecimiento de biomasa hace menos importante los efectos de la transferencia de masa que no son considerados en el modelo. Entonces se usa la expresión de la limitación del crecimiento, el modelo puede ser peligrosamente aproximado al crecimiento biológico in bloques cuadrados ocupados por un substancial volumen de biomasa. A bajas concentraciones, el término tiene un efecto significativo.

La biomasa total en el acuífero consiste de la biomasa adherida y la no adherida:

$$X_T = X + \bar{X} \quad \text{Ec. [11]}$$

Donde X_T es la biomasa total, X es la biomasa en la fase acuosa y $\bar{X}$ es la biomasa atada. La biomasa adherida es compuesta por la población mínima de biomasa. ($\bar{X}_{\min}$

Lo cual no hace partición entre el sólido y la fase acuosa) y la biomasa en equilibrio con la biomasa en fase acuosa:

$$\bar{X} = \bar{X}_{\min} + K_X X \quad \text{Ec. [12]}$$

Substituyendo y factorizando la ecuación [12] entre la ecuación [11] resulta la siguiente, concertación de equilibrio de biomasa en la fase acuosa:

$$X = \frac{X_T - \bar{X}_{\min}}{K_X + 1} \quad \text{Ec. [13]}$$

La concentración de biomasa adherida es calculada de la ecuación [12]. Un valor infinito para K_X significara que toda la biomasa es atada, mientras que un valor de 0 para K_X significara que toda la biomasa, excepto $\bar{X}_{\min}$, existirá en la fase acuosa.

2.3.4 Competencia Por Sustratos:

Cuando dos sustratos (sustrato 1 y 2) compiten por la misma enzima (ver anexo C), se reduce la velocidad de biodegradación. Se modifica la constante media de saturación de cada sustrato en los términos de la cinética de Monod. Por consiguiente los términos de Monod para los dos sustratos tendrán la siguiente forma:

Substrato 1:

$$\frac{S_1}{K_{s,1}(1 + \frac{S_2}{K_{s,2}}) + S_1}$$

Substrato 2:

$$\frac{S_2}{K_{s,2}(1 + \frac{S_1}{K_{s,1}}) + S_2}$$

Donde S_1 y S_2 son la concentración de sustratos 1 y 2 respectivamente (ML^{-3});

$K_{s,1}$ y $K_{s,2}$ Son las constantes medias de saturación del sustrato 1 y 2, respectivamente (ML^{-3}).

2.3.5 Inhibición:

Los efectos de inhibición (ver anexo C), pueden ser dirigidos por medio de la multiplicación, del término de la velocidad de biodegradación del sustrato, por un factor:

$$\left(\frac{I_{ih}}{I_{ih} + C_{ih}} \right)$$

(Widdwson et al, 1988)

Donde I_{ih} es una constante de inhibición, determinada experimentalmente para especies inhibitorias (ih). La inhibición puede ser usada para simular el uso secuencial de aceptores de electrones o la reducción de la velocidad de biodegradación debido a la presencia de un compuesto toxico inhibitorio. El término para el uso de sustrato y crecimiento de biomasa pueden ser calibrados por el uso de un factor de inhibición para cada substancia inhibitoria.

2.3.6 Co-metabolismo Aeróbico:

Para describir la variación del Co-metabolito (ver anexo C) y crecimiento de la biomasa adherida en reacciones de Co-metabolismo aeróbico, se formula la siguiente ecuación (en este caso no se tiene en cuenta la resistencia a la transferencia de masa, la inhibición ni la competencia por sustrato)

$$\frac{dC_c}{dt} = -q_c X \left(\frac{C_c}{K_c + C_c} \right) \left(\frac{E}{K_E + E} \right) \left(\frac{R}{K_R + R} \right) \quad \text{Ec. [14]}$$

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} = & \frac{\mu_{\max} X}{Y} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(\frac{E}{K_E + E} \right) \left(\frac{R}{K_R + R} \right) \left[\frac{0.9(1-X)}{\rho_X} \right] \\ & - \frac{q_c X}{T_c} \left(\frac{C_c}{K_c + C_c} \right) \left(\frac{E}{K_E + E} \right) \left(\frac{R}{K_R + R} \right) - bX \end{aligned} \quad \text{Ec. [15]}$$

(Chang y Alvarez-Cohen, 1995)

Donde q_c es la velocidad máxima específica de Co-metabolismo ($ML^{-3}T^{-1}$); C_c es la concentración en fase acuosa de Co-metabolismo (ML^{-3}); R es el poder reductor (NAD(P)H) concentración entre las células ($mmol\ e^{-} / \text{masa de biomasa}$); K_R es NAD(P)H de saturación media, constante, ($mmol\ e^{-} / \text{masa de biomasa}$); K_c es el coeficiente de Co-metabolismo de saturación media (ML^{-3}); $\mu_{\max}$ es la velocidad específica de crecimiento en el sustrato (T^{-1}) y T_c es la capacidad de transformación (masa de células desactivadas / masa de Co-metabolismo de biodegradación).

2.4 Implementación Del Modelo En El Computador

El conjunto de modelos obtenidos en el apartado [2.3] forman un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias no-lineales de primer orden. Este sistema de ecuaciones varía de acuerdo a las características que se desee simular en el proceso de biorremediación, el sistema de ecuaciones o modelos seleccionados son resueltos mediante el método numérico de Runge-Kutta (4,5) explícita, Dormand-Prince, paso

variable, por medio de MATLAB y su interfaz grafica llamada SIMULINK (ver anexo D).

La metodología de programación incorpora la mayoría de las ideas básicas de la programación orientada a objetos con el objetivo principal de posibilitar la reutilización de modelos predefinidos en la construcción de nuevos modelos (ver anexo B). Una de las principales características del modelado orientado a objetos es el desarrollo estructurado de modelos, en el cual los modelos se componen de submodelos cada vez más simples. De esta manera, el modelo de un sistema se construye a partir de la interconexión de modelos que representan a los diferentes subsistemas que integran el sistema. Este procedimiento puede ser recursivo obteniéndose así modelos de sistemas cada vez más complejos en el sentido del número de componentes (subsistemas) que lo integran.

2.4.1 Diagrama De Flujo Para La Caracterización De La Simulación

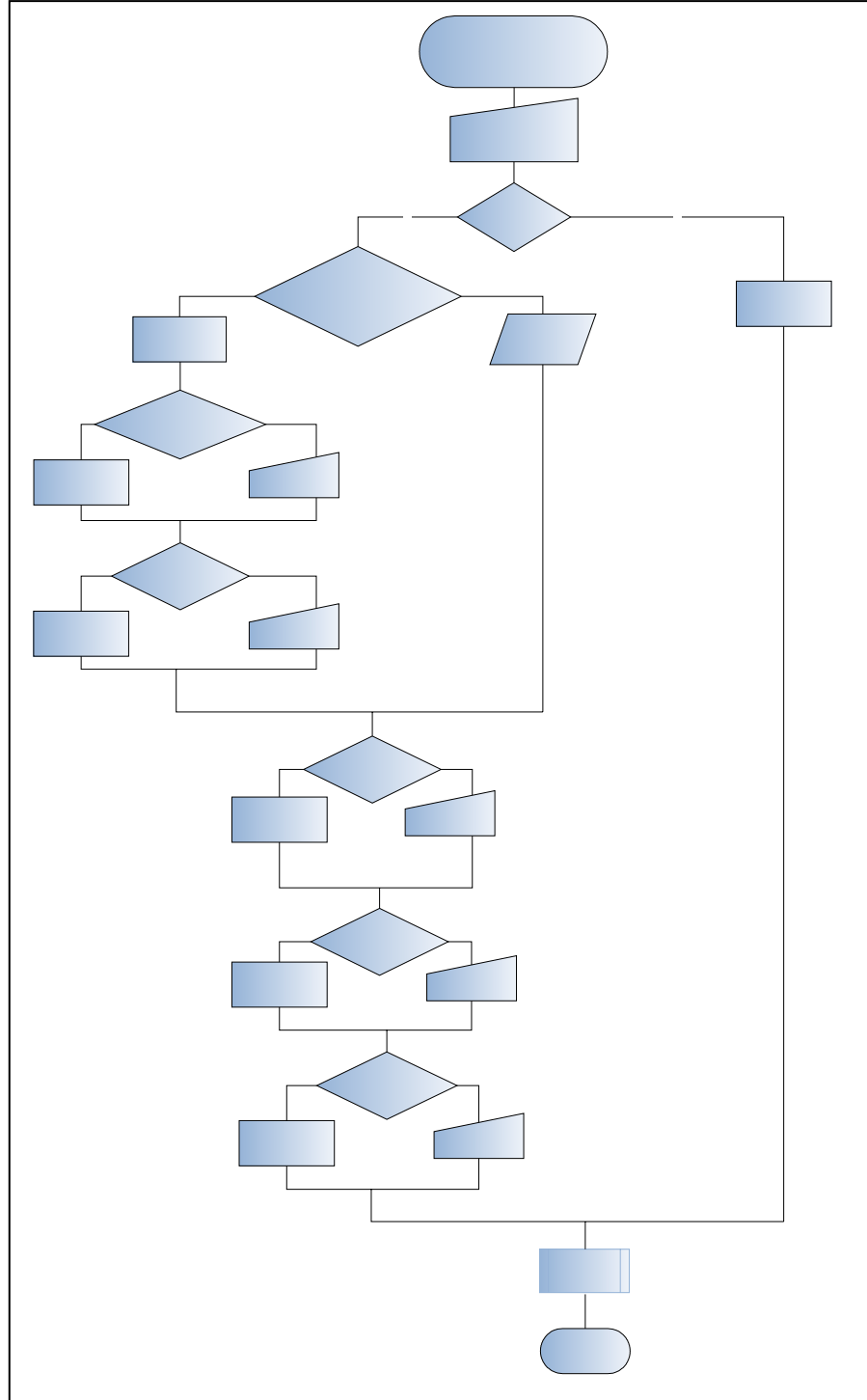


Fig. 2 Diagrama de flujo para la caracterización de la simulación. Parámetros=0

Se programo una rutina para que el usuario de acuerdo a sus necesidades seleccione los modelos pertinentes.

En primera instancia el programa requiere el ingreso de un primer grupo de parámetros y preguntara si se quiere resolver el sistema de modelos básicos (ver 2.3.1), es decir sin la existencia de co-metabolismo aeróbico, competencia por sustratos, inhibición, limitación por nutrientes ni limitación por volumen. Las anteriores son las diferentes características que pueden intervenir en la simulación, si se

Paráme

Compe

Inhib

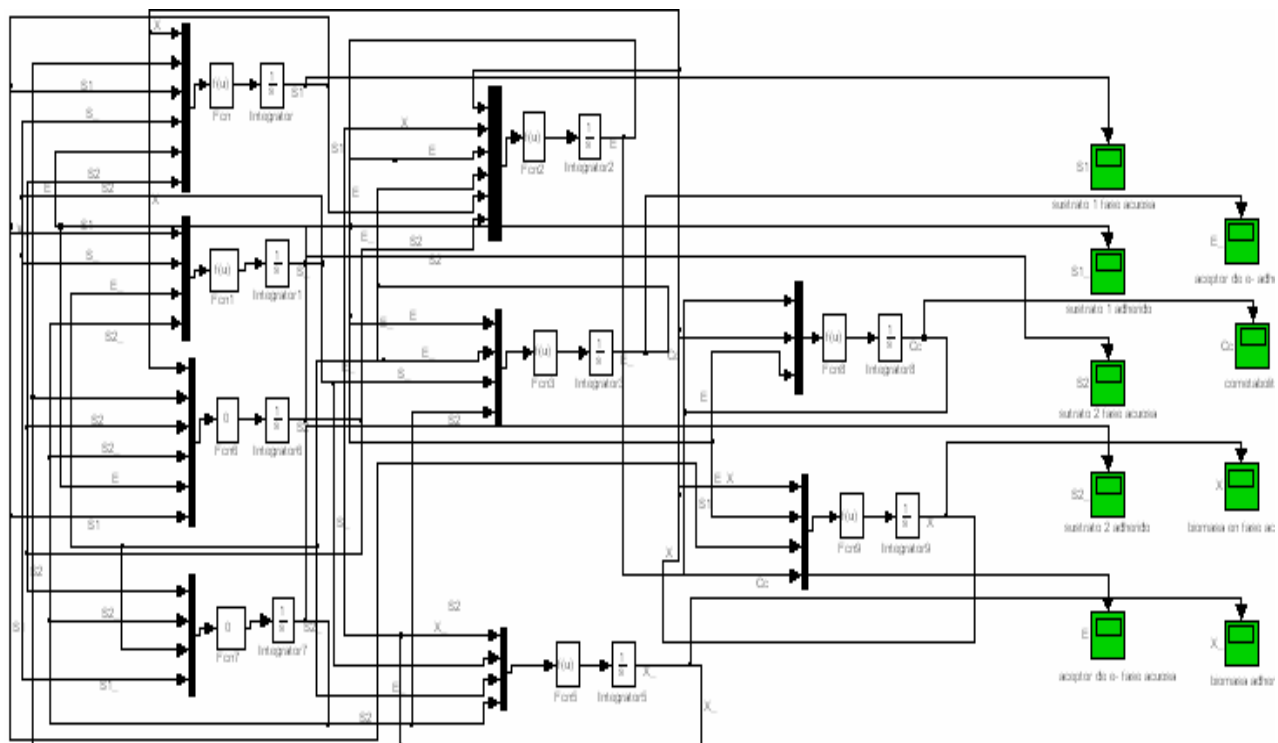
Parámetros=0

requiere realizar la simulación con cualquiera de las diferentes características mencionadas (ver 2.3.2-6), se afirman en el momento que el programa pregunte por cada una de ellas y de esta forma se seleccionan automáticamente los modelos pertinentes, para los cuales posteriormente pedirá el ingreso de los parámetros correspondientes.

Finalizado el procedimiento anterior se inicia la resolución de las ecuaciones diferenciales no lineales (modelos) seleccionados, el tiempo de simulación estará acorde con el establecido en los parámetros de simulación.

Finalmente el resultado de la simulación se observara haciendo clic en los bloques scope de Simulink, los cuales representan la variación de la concentración, de cada uno de los componentes de los modelos, con respecto al tiempo, por medio de una grafica característica, las unidades serán consistentes con las de los parámetros.

Solución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales, Runge-Kutta (4,5) explícita, Dormand-Prince, paso variable :



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .

En esta sección, se presentan resultados de simulación para los diferentes modelos cinéticos utilizados. Se pueden obtener graficas de los diferentes procesos de biodegradación haciendo clic en cualquiera de los iconos Scope, de acuerdo al componente que se quiera observar.

Las simulaciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones o parametros:

- velocidad máxima específica de crecimiento : 1; 2; 3 (d^{-1})
- constante de transferencia de masa del sustrato : 0.2 cm/d
- constante de transferencia de masa del aceptor de e- : 1 cm/d
- constante de producción; masa de células producidas por masa de sustrato biodegradado: 0.5
- constante de saturación del sustrato : 50 mg/cm^3
- constante de saturación del aceptor de e- : 6 mg/cm^3
- volumen de una microcolonia: 0.00002 cm^3
- masa de una microcolonia: 0.00006 mg
- densidad de biomasa; masa de células por volumen de biomasa :0.09 mg/cm^3
- masa del aceptor de e- consumido por masa de sustrato biodegradado : 0.6
- constante de descomposición endógena : 0.01 d^{-1}
- área superficial de una micro colonia : =.0002 cm^2
- concentración inicial del sustrato en la fase acuosa: 10; 30 mg/L
- concentración inicial de sustrato adherido a la biomasa : 20 mg/L
- concentración inicial de aceptor de electrones en la fase acuosa : 1 mg/L
- concentración inicial de aceptor de electrones adherido a la biomasa : 10 mg/L
- concentración inicial de biomasa, en la fase acuosa : 0.05 mg/L
- concentración inicial de biomasa adherida (masa células adheridas por volumen de fase acuosa) : 0.5 mg/L
- constante de velocidad de reacción de primer orden: 0.6 d^{-1}
- velocidad máxima específica de Cometabolismo : 3 d^{-1}
- concentración inicial del cometabolito en la fase acuosa : 0.3 mg/L
- valor del poder reductor(NAD(P)H) (mmol e- /masa de biomasa) : 0.008 mmol/mg
- constante de saturación media (NAD(P)H) (mmol e- /masa de biomasa) 0.001 mmol/g
- constante de saturación media del cometabolito : 0.002 mg/L

- capacidad de transformación(masa de células desactivadas/masa de cometabolito): 0.04
- constante de transferencia de masa del sustrato 2 : $0.7 \text{ cm/d(L}^*T^{-1}) ='$);
- constante de saturación media del sustrato 2 : 40 mg/L
- concentración inicial del sustrato 2 en la fase acuosa : 1 mg/L
- concentración inicial del sustrato 2 adherido a la biomasa : 10 mg/L

A modo de ejemplo, en las figuras 3, 4 y 5 se muestran los resultados correspondientes al crecimiento celular durante el proceso de biodegradación utilizando un inóculo de concentración inicial de 0.05 mg/L. En la Figura 3, se muestran los resultados obtenidos para el crecimiento celular a través del tiempo en fase acuosa. En ella se puede observar el aumento del crecimiento celular a medida que transcurre el tiempo bajo una condición inicial de inóculo de 0.05 mg/L de biomasa celular y sin efectos de inhibición del crecimiento, alcanzando durante el proceso de biorremediación una concentración máxima de 0.08 mg/L.

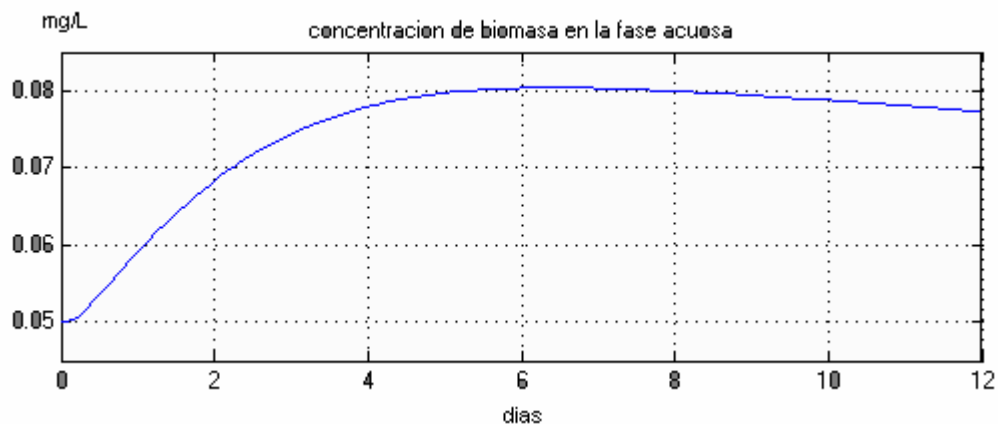


Fig.3 Cinética de crecimiento de biomasa en la fase acuosa durante el proceso de biorremediación. Condiciones de cinética de crecimiento de Monod simple.

Posteriormente, se quiso evaluar el efecto inhibitorio de los hidrocarburos bajo limitación de sustrato y volumen de biomasa (Meyer 1984). Los resultados de esta simulación se observan en la figura 4, e indican que disminuye casi en un 40% la concentración de biomasa alcanzada durante el proceso de biodegradación.

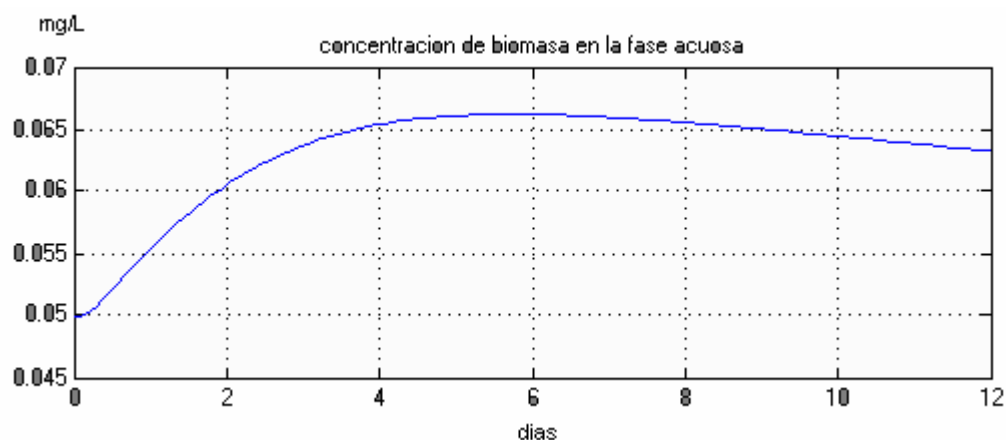


Fig.4 Cinética de crecimiento de biomasa en la fase acuosa con inhibición, con limitación de nutrientes y de volumen de biomasa

A su vez, se quiso analizar la competencia por sustratos, y su efecto sobre el crecimiento de biomasa. Durante el tiempo evaluado de la biorremediación, puede verse que la concentración de biomasa aumenta hasta aproximadamente los 2 primeros días de biorremediación para posteriormente decaer hasta 0.047 mg/L, lo cual demuestra el efecto negativo de la competencia por sustratos para el crecimiento microbiano, lo cual debiera afectar negativamente en el proceso de degradación de los hidrocarburos.

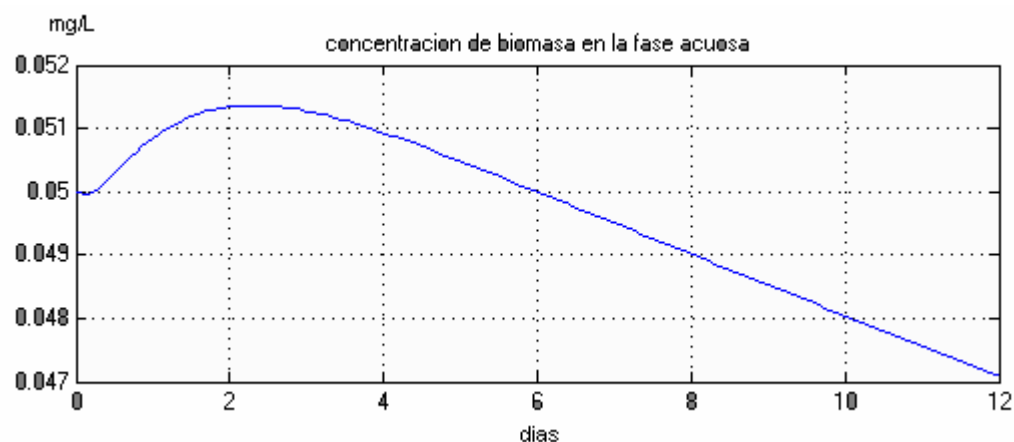


Fig.5 Cinética de crecimiento de biomasa en la fase acuosa bajo competencia por sustrato.

Al comparar las figuras 3 y 4 , las cuales representan la variación de la biomasa en la fase acuosa, se puede observar que la máxima concentración de biomasa en la figura 3 (0.081 mg/L) es menor al representado en la figura 4 (0.058 mg/L), debido a que en la simulación de la figura 4 intervino la inhibición, limitación de nutrientes y limitación de volumen de la biomasa, lo cual era de esperarse una concentración menor de biomasa.

A continuación se realizaron simulaciones para evaluar el efecto de la variación de la concentración de sustrato, es decir, de hidrocarburos en el tiempo, bajo diferentes velocidades específica de crecimiento de los microorganismos.

En las Figuras 6, 7 y 8 se muestran los resultados del efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre la biodegradación del sustrato (hidrocarburo). En ellas se puede observar que la variación del sustrato disminuye de una forma más rápida al aumentar el valor de la velocidad máxima específica de crecimiento (Huang 1996.). Esto corrobora el modelo cinético de biodegradación (cinética de MONOD), ya que a mayores velocidades de crecimiento, se puede obtener una mejor degradación del sustrato.

Por ejemplo, a día de biorremediación a una velocidad específica de crecimiento de 1 d^{-1} , se obtuvo una concentración de 12 mg/L (Ver Figura 6), mientras que a con $\mu_{\text{max}} = 6 \text{ d}^{-1}$ se alcanza una concentración de sustrato de 8,5 mg/L (Fig.8), lo cual demuestra un aumento de la velocidad de biodegradación del sustrato por efecto de l aumento de la velocidad de crecimiento de los microorganismos.

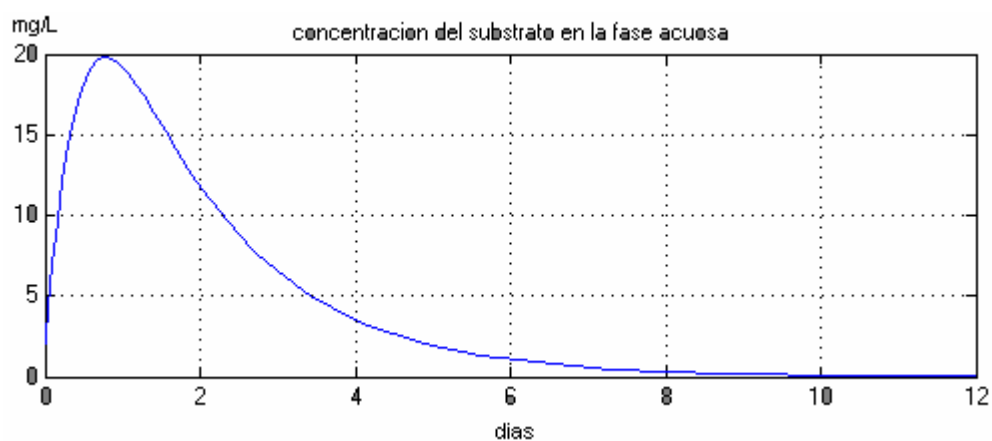


Fig.6 Cinética de biodegradación de sustrato en la fase acuosa a un valor de $\mu_{\max} = 1 \text{ d}^{-1}$

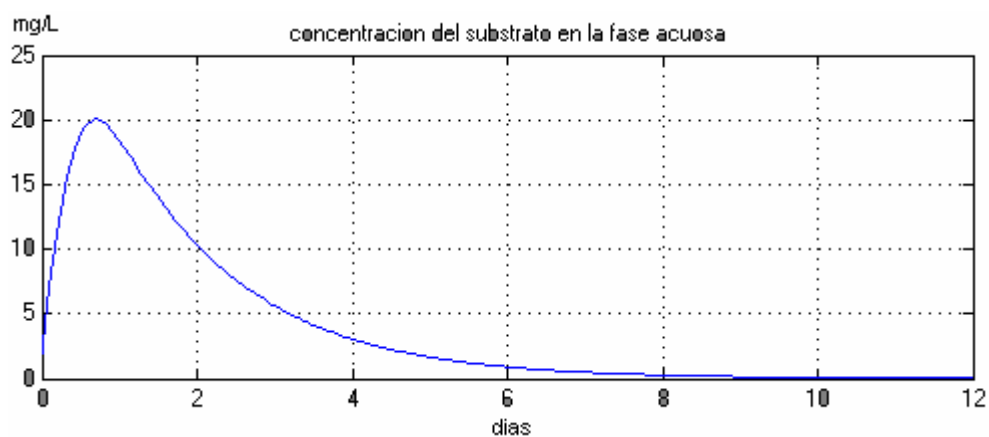


Fig. 7 Cinética de biodegradación de sustrato en la fase acuosa a un valor de $\mu_{\max} = 3 \text{ d}^{-1}$

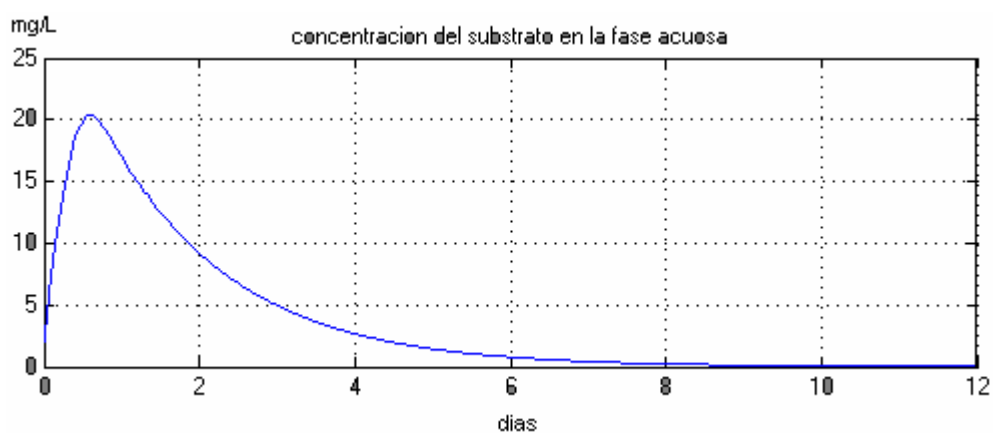


Fig.8 Cinética de biodegradación de sustrato en la fase acuosa a un valor de $\mu_{\max} = 6 \text{ d}^{-1}$

Posteriormente, se analizó la variación de sustrato adherido a la biomasa sin el efecto del cometabolismo y con el efecto del cometabolismo respectivamente. En las Figuras 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos con la simulación. En ellas se observa que cuando se produce co-metabolismo, disminuye la cantidad de sustrato adherido a la biomasa (Chang 1993).

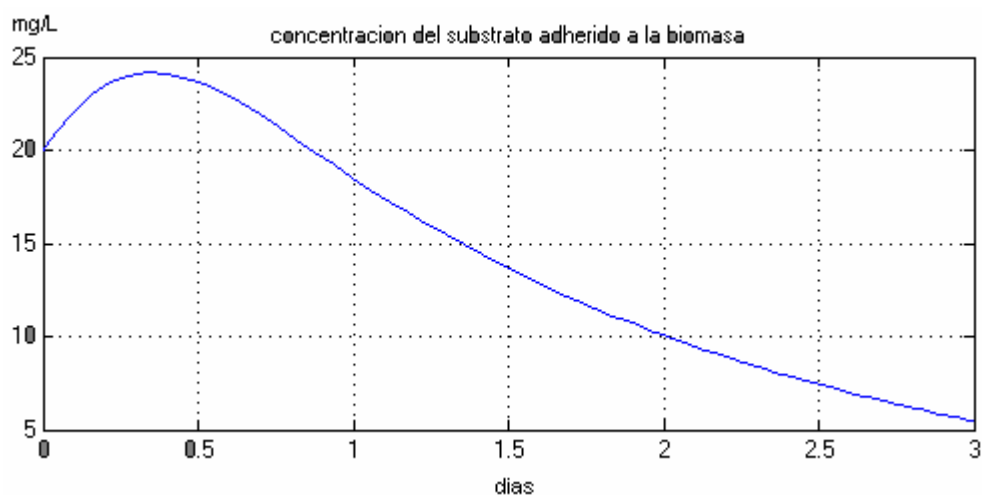


Fig. 9 Variación en el tiempo de la concentración de sustrato adherido a la biomasa durante el proceso de biorremediación. Sin cometabolismo.

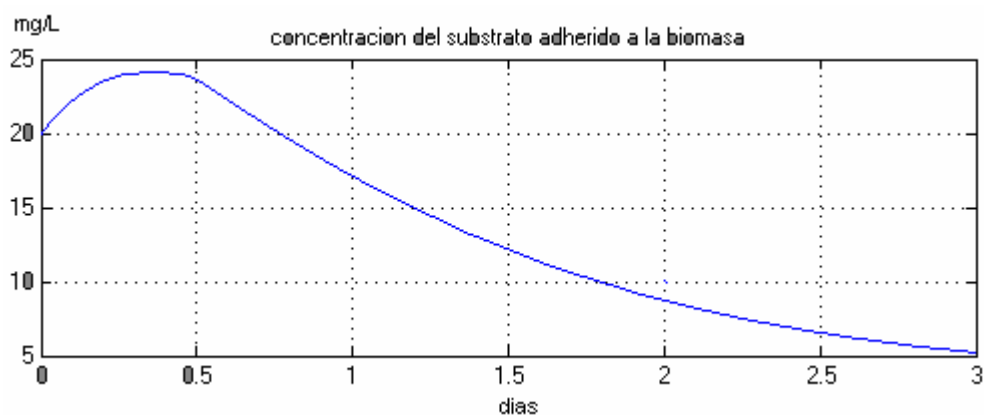


Fig. 10 Variación en el tiempo de la concentración de sustrato adherido a la biomasa durante el proceso de biorremediación. Con co-metabolismo.

Posteriormente, se analizó la variación de la biomasa adherida, sin co-metabolismo y con co-metabolismo. En la Figura 11 y 12 se muestran los resultados sin y con co-metabolismo, respectivamente. En este caso, la simulación representa una tendencia ascendente en la cantidad de biomasa adherida a la superficie sólida del suelo, mientras que con co-metabolismo se produjo un comportamiento oscilatorio en la biomasa adherida a la superficie sólida. Esto puede deberse al efecto del cometabolismo, lo cual genera un comportamiento diferente durante el proceso de biorremediación.

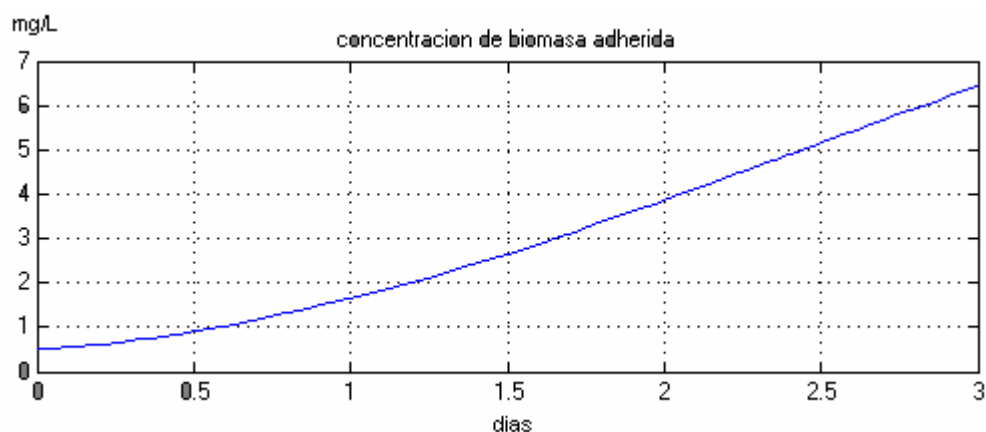


Fig. 11 Variación biomasa adherida a la fase sólida del suelo durante el proceso de biorremediación. Sin co-metabolismo.

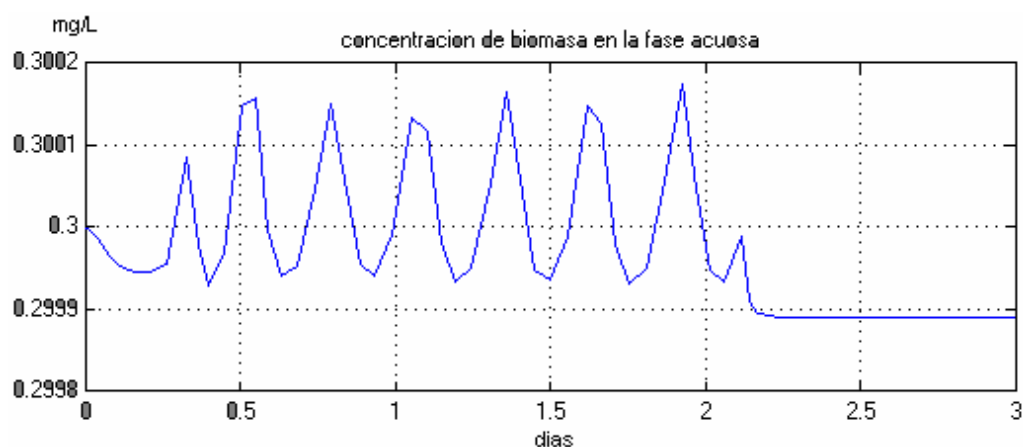


Fig. 12 Variación biomasa adherida a la fase sólida del suelo durante el proceso de biorremediación. Con co-metabolismo.

Finalmente, se evaluó el efecto de la concentración inicial de sustrato (contaminante) sobre el crecimiento celular. Curiosamente, un aumento en la concentración del sustrato produjo una disminución en la cantidad de biomasa alcanzada en la fase acuosa. Esto puede deberse a los efectos inhibitorios del hidrocarburo así como los efectos de competencia por sustrato en fase acuosa y a que un aumento de la concentración de sustrato aumenta la posibilidad de disponibilidad (transferencia de masa) del sustrato en la fase orgánica y no en la fase acuosa (Millette 1995).

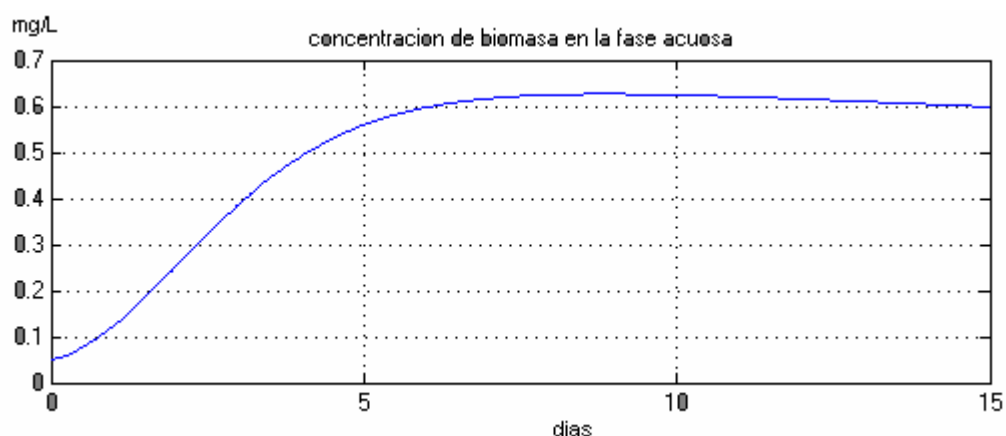


Fig. 13 Variación de biomasa en la fase acuosa utilizando una concentración de sustrato de 10 mg/L.

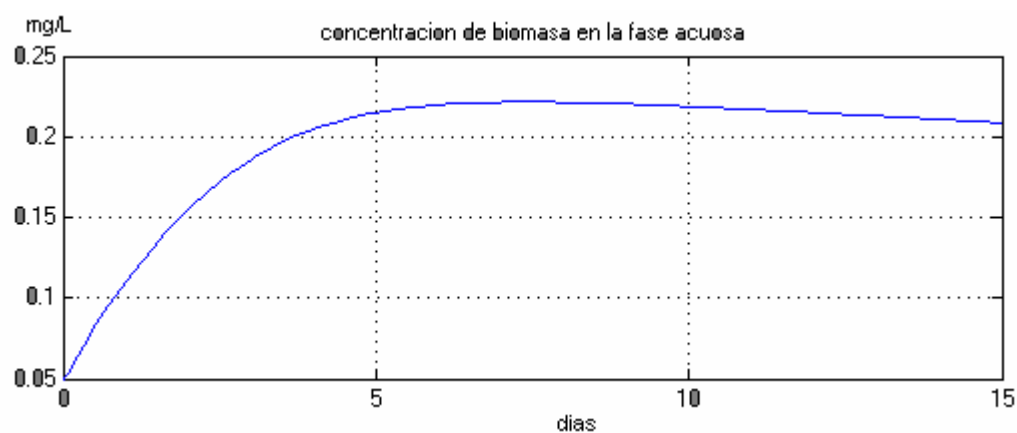


Fig. 14 Variación de biomasa en la fase acuosa utilizando una concetración de sustrato de 30 mg/L.

Las unidades para cada una de las graficas son consistentes con las unidades de los parámetros. Las gráficas presentadas anteriormente se incluyeron solo para describir de una forma cualitativa el proceso de biodegradación, debido a que los parámetros que se usaron en la simulación fueron extraídos de diferentes fuentes, en las cuales existían diferencias en las condiciones de estudio, como temperatura, sustratos, biomasa, suelo, etc.

4. CONCLUSIONES

Este trabajo es un aporte como herramienta educativa, el cual describe el proceso de biodegradación *in situ* a nivel micro de suelos contaminados por hidrocarburos. La simulación fue diseñada para que intervengan diferentes fenómenos como el cometabolismo aeróbico, la competencia por sustratos, inhibición, limitación por nutrientes y limitación por volumen. Los resultados obtenidos fueron consientes comparados con otros estudios.

La simulación se desarrolló con el software Matlab-Simulink usando una metodología de programación orientada a objetos, debido a esto se recomienda la reutilización de los modelos predefinidos en la construcción de nuevos modelos a simular; La simulación se independizo de Matlab haciendo uso de su compilador, para generar código C, lo que permite realizar la simulación en tiempo real y posibilitar la incorporación de estas cinéticas a otros software como Hysys; se debe tener cuidado al momento de usar los archivos auto ejecutables (.exe) generados, ya que estos se deben guardar en librerías creadas especialmente junto con los archivos Biblioteca de vínculos dinámicos (.DLL).

Se recomienda no usar tildes en las palabras ya que al convertir en código C se interpretan de otra forma.

Adjunto a este trabajo se encuentran archivos en los cuales hay información para profundizar en el uso de Matlab y Simulink.

5. BIBLIOGRAFÍA

ABALOS, A., VIÑAS, M., SABATE, J., MANRESA, A. y SOLANAS, M. 2004. Enhanced Biodegradation of Casablanca Crude Oil by a Microbial Consortium in Presence of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. **Biodegradation**. 15: 249-260.

ARMENDARIZ, B., CORRAL, O., LINARES, L., GARCIA, F. y VASQUEZ, R. 2004. Biostimulation of Microorganisms from Sugarcane Bagasse Pith for the Removal of Weathered Hydrocarbon from Soil. **Letters in Applied Microbiology**. 38:373-377.

ATAGANA, H. 2004. Bioremediation of Creosote Contaminated Soil in South Africa by Landfarming. **Journal of Applied Microbiology**. 96: 510-520.

de BLANC, P. C. (1998). Development and demonstration of a biodegradation model for non-aqueous phase liquids in groundwater, Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin, USA.

de BLANC, P. C., D. C. MCKINNEY and G. E. SPEITEL, JR. (1995). Modeling Subsurface Biodegradation of Non-aqueous Phase Liquids: a Literature Review, The University of Texas at Austin.

BAILEY, J. E., and D. F. OLLIS, 1986. Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd edition, McGraw Hill, NY, U.S.A.

BENTO, F., CAMARGO, F., OKEKE, B. y FRANKENBERGER, W. 2005.

Comparative Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Oil by Natural Attenuation, Bioestimulation and Bioaugmentation. **Bioresource Technology**. 96: 1049-1055.

CHANG, M. K.; VOICE, T. C.; CRIDDLE, C. S. Kinetics of Competitive Inhibition and Cometabolism in the Biodegradation of Benzene, Toluene and *p*-Xylene by Two *Pseudomonas* Isolates. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 41, 1057-1065.

CHANG, H. and L. ALVAREZ-COHEN (1995). Model for the cometabolic biodegradation of chlorinated organics, *Environmental Science and Technology*, 29(9), 2357-2367.

HUANG, G. H., 1996. IPWM: An interval parameter water quality management model, *Engineering Optimization*, 26: 79-103.

MEYER, J. S.; MARCUS, M. D.; BERGMAN, H. L. Inhibitory Interactions of Aromatic Organics during Microbial Degradation. *Environ. Toxicol. Chem.* **1984**, 3, 583-587.

MATLAB. Tutor y Prácticas de Laboratorio.

MILLETTE, D., J. F. BARKER, Y. COMEAU, B. J. BUTLER, E. O. FRIND, B. CLEMENT, AND R.SAMSON, 1995. Substrate interaction during aerobic biodegradation of creosoterelated compounds: a factorial batch experiment, *Environmental Science & Technology*, 29 (8): 1944-1952.

SEUNG, H., WOO, MIN, W., LEE, JONG, M., PARK.2004. Biodegradation of Phenanthrene in Soil-Slurry Systems With Different Mass Transfer Regimes and Soil Contents. **Journal of Biotechnology**. 110: 235-250

GALLEGO, J., LOREDO, J., LLAMAS, J., VAZQUEZ, F. SANCHEZ, J. 2001. Bioremediation of Diesel Contaminated Soils: Evaluation of Potencial *in situ* Techniques by Study Bacterial Degradation. **Biodegradation**. 12: 325-335.

MOHAMED, M. y KIRK, H. 2005. Modeling Microbial-Mediated Reduction in Batch Reactors. **Journal of Biotechnology**. 1207-1217.

Y.,F.,HUANG, G.,H., HUANG, G., Q., WANG, Q.,G., LIN, A., CHAKMA. 2006. An Integrated Numerical and Physical Modeling System for an Enhanced in situ Bioremediation Process. **Environmental Pollution** 144: 827-885.

6. ANEXOS

ANEXO A

Procesos de biodegradación

▪ **In situ**, el suelo se emplea como un gran reactor, los residuos se incorporan en camadas, en el suelo o en pilas de compostaje, donde sufrirán el ataque microbiano, se agregan los nutrientes necesarios y humedad para estimular a la biomasa microbiana

▪ **En reactores**, especialmente diseñados, que pueden tratar gran volumen de sustancias en períodos más cortos de tiempo. Muchas veces resulta necesario incrementar la población de microorganismos responsables de las transformaciones. Así, la **inoculación** del ambiente contaminado con organismos seleccionados aumenta con el tiempo. El incremento se puede lograr de varias maneras:

- ❖ estimulación de la población existente por alteraciones del ambiente o agregado de nutrientes.
- ❖ aislamiento y selección de organismos competentes y posterior inoculación.
- ❖ uso de microorganismos contruidos por ingeniería genética, denominados (**MEG**), con propiedades deseables que pueden albergarse en plásmidos o en el cromosoma microbiano.

Requisitos para lograr éxito en la biorremediación

- Los contaminantes deben estar biodisponibles, es decir no adsorbido en un residuo inaccesible (arcillas, humus)
- Los microorganismos degradadores apropiados deben estar presentes en el suelo, agua, o disponibles para la inoculación
- Los compuestos recalcitrantes no son degradados a velocidad razonable, ejemplo de compuestos naturales recalcitrantes: humus, artificiales (pesticidas, plásticos)
- Los organismos deben degradar el contaminante a velocidad tal que permita llevar su concentración a estándares regulares
- Deben reunirse condiciones ambientales favorables para el desarrollo microbiano: temperatura del suelo, pH, aireación, humedad
- Puede requerirse fertilización (N, P, K, etc.) para estimular procesos degradativos.
- El costo del tratamiento debe ser menor que el de las otras tecnologías disponibles

La falla en alguna de estas condiciones puede conducir al fracaso de un proceso de biorremediación, como ocurre en caso de suelos muy secos, o de pH inadecuado para la actividad biológica.

Estrategias para la biorremediación

- **Pasiva o intrínseca:** “natural”, de un lugar contaminado por organismos nativos.
- **Bioestimulación:** adición de nutrientes, N, P, S, etc. para incrementar a los microorganismos del suelo
- **Bioventilación:** donde se agregan estimulantes gaseosos al suelo, como O_2 , CH_4 , pasivamente o en forma forzada, para estimular la actividad microbiana
- **Bioaumentación:** inoculación de microorganismos a un sitio contaminado. El inoculante puede tener un microorganismo natural o modificado genéticamente (solos o en consorcio), seleccionados por su capacidad degradativa.
- **Rellenos sanitarios:** “*landfarming*” enterrar contaminantes en suelos no contaminados, con capa impermeable inferior para evitar pérdidas. Se combina con los anteriores.
- **Compostaje:** microorganismos aerobios, termófilos, en pilas o reactores, humedecidos luego de atacar materiales rápidamente degradables, atacan a las sustancias xenobióticas
- **Fitorremediación:** empleo de plantas para sacar o transformar contaminantes, plantas hiperacumuladoras o que estimulan microorganismos rizosféricos degradadores.

La biorremediación **pasiva o intrínseca** es la que ocurre naturalmente por acción de los microorganismos nativos. Esta es la más frecuente estrategia de degradación de contaminantes, a pesar de que el proceso puede ser muy lento si las condiciones no son las adecuadas. La **bioestimulación**, que incorpora nutrientes, como fuentes de nitrógeno y fósforo, con el objeto de estimular a la microflora nativa, es corrientemente empleada. Los nutrientes pueden incorporarse con agua de riego, en caso de suelos contaminados, o en preparados solubles en hidrocarburos, en el caso de derrames de petróleo en el mar.

La **bioventilación**, que emplea gases estimulantes, como O_2 , CH_4 , en forma pasiva o forzada en los suelos con el objetivo de incrementar la actividad degradadora de la

población nativa, requiere dispositivos especiales, de tipo industrial, por lo cual los suelos contaminados se transportan y depositan en estructuras del tipo de los biodigestores, con las instalaciones adecuadas para la entrada pasiva o forzada de gases.

La **bioaumentación**, es la inoculación del sitio contaminado con microorganismos seleccionados para estimular la degradación. Los inoculantes pueden estar formados por microorganismos nativos seleccionados para el proceso en cuestión o bien se pueden usar aquellos genéticamente modificados, a los cuales por ingeniería genética se les incorporaron genes activos en la biodegradación. Puede tratarse de una sola especie o de varias especies (consorcio microbiano). Los mismos se seleccionan en el laboratorio, inoculando con suelo o aguas, medios de cultivo con dosis crecientes de la sustancia tóxica en estudio, por ejemplo, hidrocarburos, como única fuente de C y energía. Las colonias que se desarrollan en estos medios, se van seleccionando por su capacidad degradadora sobre el xenobiótico. Otros microorganismos se construyen por ingeniería genética, incorporando genes específicos en sus plásmidos.

Rellenos sanitarios, consisten en la aplicación e incorporación de suelos contaminados en la superficie de suelos no contaminados. Son en general excavaciones de suelos muy pobres, con un fondo de arcillas o algún material impermeable, para evitar la contaminación de las napas freáticas. El suelo contaminado es arado y se mezcla bien, pudiéndose incorporar nutrientes, inóculo microbiano y gases, para acelerar el proceso.

Compostaje, es el uso de procesos microbianos aerobios y termófilos en pilas o reactores, para degradar el polucionante. Los dispositivos se mezclan periódicamente y se humedecen a los efectos de lograr la máxima actividad biológica. Los microorganismos activos se encuentran en el suelo y son incrementados por el proceso de compostaje.

Fitorremediación, es el empleo de vegetales para absorber, remover o transformar contaminantes. Son muy empleadas en el caso de remoción de metales pesados, que se acumulan en la madera en el caso de árboles o en la fitomasa o herbácea, que debe tratarse luego en incineradores. La acción se da directamente, en plantas hiperacumulantes, o indirectamente, por estimulación de microorganismos activos en su rizosfera.

HIDROCARBUROS Y SU BIODEGRADABILIDAD

Composición por familias de hidrocarburos

El estudio más detallado de los hidrocarburos de un crudo de petróleo agrupa estos compuestos en las siguientes familias: parafinas volátiles (alcanos no ramificados y ramificados, hasta C10), parafinas no volátiles (alcanos lineales y ramificados entre C10-C40), naftenos (cicloalcanos o cicloparafinas), oleofinas (alquenos) y aromáticos (monoaromáticos y poliaromáticos). En un grupo aparte residirían los componentes de las resinas y los asfáltenos

Parafinas volátiles (*n*-alcanos e isoprenoides volátiles)

Representan hasta un 30% del crudo de petróleo. Son *n*-alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C1-C10 (de 1 a 10 átomos de carbono). Es la fracción más volátil del crudo y por lo tanto la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización.

Resinas y asfáltenos

Constituyen entre un 10% en crudos poco degradados o ligeros, hasta un 60% en crudos muy degradados. Es la fracción que presenta una mayor recalcitrancia de un crudo de petróleo. Se trata de agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos, amidas, HAP, sulfuros, ácidos nafténicos, ácidos grasos, metaloporfirinas y fenoles polihidratados.

Biodegradación de crudo de petróleo mediante cepas aisladas

La elevada complejidad de la composición del crudo de petróleo y derivados, implica la existencia de una amplia capacidad enzimática si se quiere conseguir una degradación significativa del crudo. En la mayoría de los casos, son degradadoras de alcanos, debido a que los alcanos son los componentes más abundantes del crudo de petróleo.

Biodegradación de crudo de petróleo por cultivos mixtos

La alternativa a la utilización de cepas individuales es la obtención y utilización de cultivos mixtos, los cuales pueden ser consorcios definidos y consorcios no definidos. Los consorcios definidos se caracterizan por ser una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí.

Los consorcios no definidos se caracterizan por ser el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminación y por lo tanto no son el resultado de una combinación de cepas previamente aisladas.

Consortios definidos

Los consorcios definidos están bien caracterizados y son repetitivos pero tienen ciertas desventajas. Como la posible formación de metabolitos intermediarios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo, de hecho, se ha descrito que durante la degradación de mezclas de hidrocarburos se pueden formar intermediarios de persistencia y toxicidad desconocidas, por fenómenos de cometabolismo.

Consortios no definidos

Los consorcios no definidos, especializados en la degradación de hidrocarburos, se obtienen a partir de enriquecimientos de muestras ambientales donde hayan existido episodios previos y recurrentes de contaminación por hidrocarburos. El resultado es una población microbiana seleccionada de forma natural por su cooperación metabólica en la degradación de la mezcla en cuestión, la cual potencialmente dispone de una mayor eficiencia en la degradación de compuestos conocidos y desconocidos que un consorcio definido. Por lo tanto, es más probable que en un consorcio no definido se hayan seleccionado degradadores de productos finales (*dead-end products*) que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (Grifoll *et al.*, 1995).

EL SUELO

Estructura y componentes del suelo

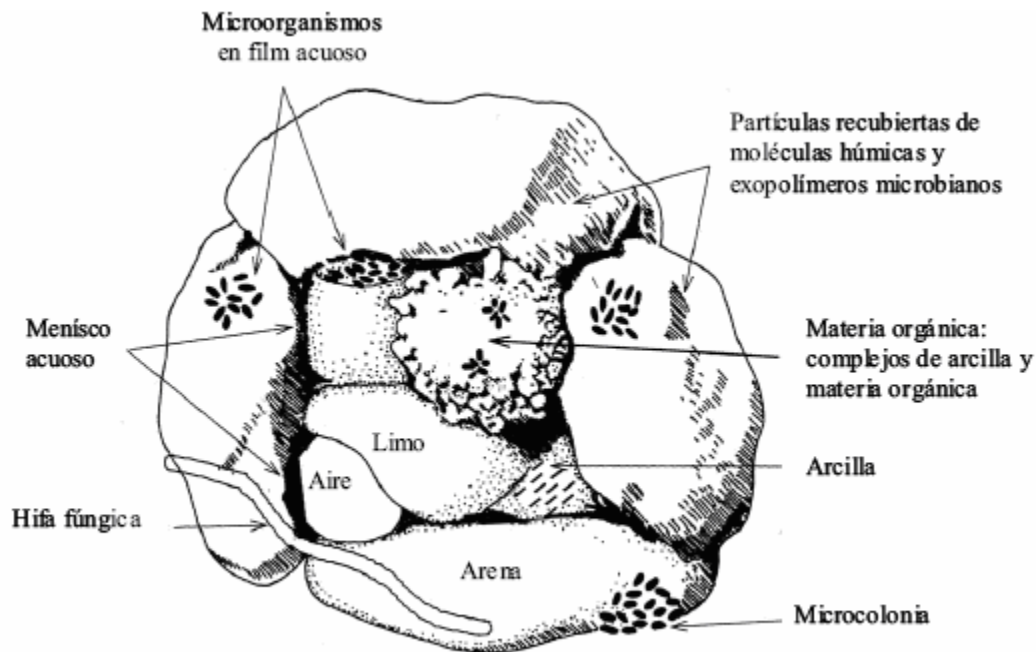


Fig. 15 Esquema de la disposición en el espacio de los agregados constituyentes del suelo.

Según las proporciones de arenas (2-0,05 mm diámetro), limos (2-50 μ m de diámetro), arcillas (inferior a 2 μ m de diámetro) y materia orgánica, principalmente humus y derivados, existe una gran variedad de tipos diferentes de suelos. Los componentes minerales y la materia orgánica se distribuyen en el espacio generando una estructura porosa (fig. 15). Los poros pueden contener agua o aire, de manera que existen tres fases: sólida, líquida y gaseosa. El agua contenida en los poros del suelo contiene sales minerales y nutrientes y es el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. El contenido en agua de un suelo puede oscilar enormemente, afectando dicha actividad.

Las poblaciones microbianas en el suelo

La red de poros formada como resultado de la asociación de las partículas minerales (arenas, limos y arcillas) y la materia orgánica (Fig.15), muestra una gran variedad de tamaños y espacios, lo que condiciona el tipo y la diversidad de las poblaciones microbianas existentes. En términos generales se encuentran del orden de 10^6 - 10^9 bacterias cultivables por gramo de suelo. La organización estructural de las partículas del suelo, confiere una heterogeneidad espacial para los microorganismos, que se caracteriza por la presencia de diferentes sustratos, nutrientes, concentraciones de oxígeno, contenido de agua líquida, así como de un pH variable. Este hecho implica que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas, condicionadas también por la biodisponibilidad de las distintas fuentes de carbono y energía, que a su vez está condicionada por las características fisicoquímicas propias de cada suelo.

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, frente a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación. Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado en favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo. Por este motivo, en emplazamientos previamente contaminados, la bioestimulación de la población microbiana indígena, puede acelerar el proceso de biodegradación de los contaminantes, siempre y cuando los compuestos no sean de gran recalcitrancia.

Antes de iniciar cualquier estudio de biorremediación, es esencial conocer si la población microbiana existente en el suelo es potencialmente degradadora de los contaminantes presentes y si es suficiente para llevar a cabo el proceso de biodegradación en un tiempo razonable.

El proceso de transformación más importante es la biodegradación. Los microorganismos suelen estar distribuidos en el suelo formando microcolonias que se encuentran separadas unos 100 μm , y situadas en poros pequeños entre 0,8 y 3 μm .

VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

La tecnología de la biorremediación, basada en la utilización de los microorganismos y su potencial metabólico biodegradador para eliminar o transformar los contaminantes del medio en productos inocuos, tiene ciertas ventajas respecto a los métodos fisicoquímicos (excavación, extracción química y incineración) tanto por su menor coste económico, por la no afectación de otros compartimentos ambientales y la optimización de los recursos.

Una de las limitaciones que presentan las técnicas biológicas respecto a las técnicas fisicoquímicas es el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación aceptable según las normativas. Durante un proceso de biorremediación se produce una ralentización del proceso de biodegradación ya sea por un enriquecimiento de componentes más recalcitrantes o por una disminución de la biodisponibilidad de los contaminantes. Sin embargo, las técnicas fisicoquímicas, aún pudiendo ser más rápidas y efectivas en la disminución de la concentración de contaminantes, alteran o eliminan por completo la microbiota autóctona del suelo, modifican las características fisicoquímicas del suelo, y además, no eliminan los contaminantes, si no que los trasladan a otro compartimento ambiental. Por lo tanto no cumplen con los criterios de sostenibilidad en los que se debería basar la ley de protección de suelos.

Factores Que Condicionan La Biorremediación De Un Suelo.

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores como son: la presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa, la estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como el pH, temperatura, humedad del suelo, presencia de aceptores de electrones disponibles, y la existencia de nutrientes inorgánicos (fuente de N y P) disponibles.

El carácter mayoritariamente unicelular o muy simple de los microorganismos los hace muy vulnerables a cambios en el ambiente. En los microorganismos toda su superficie celular está en contacto con el ambiente y cambios muy marcados en factores como la

temperatura, acidez, presión osmótica, concentración de sustancias químicas, pueden detener procesos microbianos.

Si los microorganismos pueden esporular, lo harán en condiciones adversas, otras veces su número decae marcadamente.

Por comodidad se dividen los **factores del ambiente** en:

- ☐ **físicos**, como la temperatura, gases, presión osmótica, pH
- ☐ **químicos**, o físico-químicos: nutrientes, sustancias antimicrobianas
- ☐ **biológicos**, otros organismos: microorganismos, micro y meso fauna, la vegetación, afectan también las actividades microbianas

Los distintos factores actúan simultáneamente y resulta difícil el estudio integrado de los efectos. En general, se varía uno de los factores, por ejemplo la temperatura de incubación y se dejan los restantes factores a niveles constantes y óptimos. Se evalúa el crecimiento del microorganismo en estudio determinando su velocidad de crecimiento, tiempo de generación o la cosecha máxima (log N° de células a las que llega con y sin la incidencia del factor en estudio).

El pH, temperatura y la humedad

Cada cepa microbiana tiene un determinado rango de tolerancia a factores ambientales como son: la temperatura, el pH y la salinidad, los cuales pueden afectar al crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas. En consecuencia, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos existentes, potencialmente mayor será el rango de tolerancia. No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales a pH y temperaturas extremas y en suelos salinos la biodegradación se ralentiza, siendo los rangos óptimos para la biodegradación: pH entre 6-8 y temperaturas entre 20-30°C .

pH

Si bien el pH interno de las células es neutro, los microorganismos poseen mecanismos de control de entrada y salida de protones y cationes a nivel de la membrana y pueden desarrollarse en amplios rangos de concentración hidrogeniónica:

tipos	rango de pH	óptimo
acidófilos	0-7	5
neutrófilos	5-12	7
basófilos	9-14	10

Fig. 16 rangos de concentración hidrogeniónica.

Los medios de cultivo se acidifican con ácidos orgánicos, láctico, acético, ya que penetran en la célula sin disociarse y dentro liberan los protones que alteran el pH interno de las células.

La variación del pH del suelo afecta a la actividad microbiana y también a la solubilización y adsorción/absorción de los contaminantes y de los iones. Las formas catiónicas (NH_4^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2}) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{-3} , Cl^-) son más solubles a pH alcalino. En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6-8). El pH óptimo establecido para procesos de biodegradación es neutro (pH 7,4-7,8).

Para alcalinizar un suelo se utiliza arena de caliza e iones Ca^{+2} y Mg^{+2} mientras que para acidificar un suelo se utiliza FeSO_4 . Sin embargo, con poblaciones microbianas adaptadas también se ha descrito biodegradación de HAPs en suelos extremadamente ácidos a pH 2 .

Temperatura: según los rangos de temperatura en que pueden desarrollarse los distintos grupos microbianos, se les clasifica en:

tipos	rango de temperatura	óptimo
sicrófilos	0-20°C	15°C
mesófilos	15-45°C	35°C
termófilos	40-70°C	55°C

Fig.17 Rangos de temperatura para de los diferentes tipos de microorganismos.

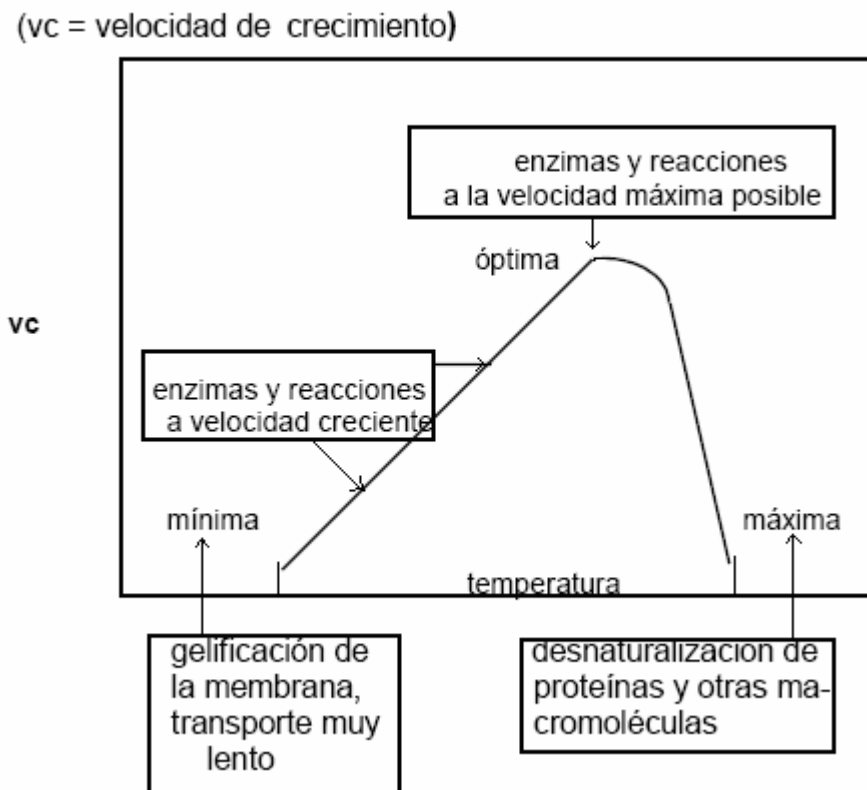


Fig. 18 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano.

La figura 13 muestra el efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano. La curva no es simétrica precisamente por la desnaturalización rápida que ocurre no bien se excede la temperatura óptima de crecimiento. Los termófilos son reponsables de importantes procesos microbianos en pilas de restos orgánicos, en el compostaje, etc., donde la temperatura se eleva localmente

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. La mayor parte de estudios realizados indican que las condiciones mesofílicas (20-30°C) son las óptimas para la biorremediación de suelos contaminados. No obstante, también se ha descrito biodegradación de hidrocarburos a temperaturas extremas: a 10°C en suelos subárticos y subalpinos 5°C y hasta 60°C por una cepa termófila.

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en

el contenido de agua. No obstante el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica. Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes, así como también la migración bacteriana a través del suelo. El exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua.

Dibble y Bartha (1979), describieron un rango de humedad óptimo del 30-90% de la capacidad de campo para la biodegradación aeróbica de lodos contaminados con crudo de petróleo, mientras que Lajoie y Strom (1994) y Pramer y Bartha (1972), recomendaron llevar a cabo procesos de biorremediación a una humedad entre el 50 y 70% de la capacidad de campo. En general, en suelos de granulometría fina (elevado porcentaje de arcillas y limos) suele utilizarse una proporción cercana al 40% de la capacidad de campo, mientras que para suelos arenosos suele utilizarse una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (Menn *et al.*, 2000).

Biodisponibilidad

La tasa de degradación depende tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo microbiano, como de la transferencia de masas del compuesto. La relación entre estos factores se conoce como biodisponibilidad. En los suelos uno de los factores limitantes para la biodegradación es la transferencia de masas, ya que los microorganismos de los suelos contaminados, suelen tener amplias capacidades biodegradativas al estar expuestos a una gran variedad de compuestos orgánicos diferentes. Por lo tanto la adsorción, la absorción, desadsorción, disolución y la difusión son fenómenos, propios de la transferencia de masas, que condicionan la biodisponibilidad de los contaminantes.

La actividad microbiana debe mantener intacto su potencial catabólico, el cual es más importante en suelos con elevado contenido en materia orgánica, este efecto se produce por una serie de fenómenos como son: la adsorción con la materia particulada del suelo, absorción a la materia orgánica del suelo, a la baja difusividad de los compuestos, principalmente desde los microporos; a la disolución en fases

líquidas no acuosas (FLNAs), o a la formación de uniones covalentes con la materia orgánica e inorgánica del suelo.

Gases

El oxígeno afecta a los microorganismos y éstos se clasifican por sus relaciones con este gas (cuadro siguiente). Otros gases que inciden en los microorganismos son el N₂, CO₂, H₂, CH₄. Algunos de ellos, como el N₂ es reducido biológicamente solamente por un grupo bacteriano.

Relaciones entre los microorganismo y el O ₂	
grupo	efecto del O ₂
Aerobios	
obligados	lo requieren
facultativos	no lo requieren pero el desarrollo es mejor con O ₂
microaerofílicos	lo requieren pero a niveles menores que el atmosférico
Anaerobios	
aerotolerantes	no lo requiere y el desarrollo es mejor con O ₂
anaerobios obligados (estrictos)	los dañan o es letal

Fig. 19 Relaciones entre los microorganismos y el O₂.

Presencia de aceptores de electrones

La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica (O₂ como aceptor final de electrones), ya que en ausencia de O₂, y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO₃⁻, SO₄⁻², CO₂, Mn⁺⁴ y Fe⁺³) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas

Químicos

Las sustancias químicas pueden ejercer distintos efectos sobre el desarrollo de los microorganismos:

- no afectarlo
- estimularlo, se les llama nutrientes

▪ **inhibirlo, sustancias microbiostática y microbicida, con y sin lisis (microlítica)**

La ubicación de una sustancia química en alguna de estas categorías es muchas veces arbitraria ya que una misma sustancia puede ser nutriente o bacteriostático dependiendo de la concentración, como es el caso de los azúcares que al 1% son nutrientes para la mayoría de los microorganismos, pero a altas dosis prevén el crecimiento por plasmólisis (conservación de alimentos).

Nutrientes inorgánicos

Las concentraciones de nitrógeno y fósforo asimilables presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca^{+2} , Na^+ , Fe^{+2} y SO_4^{-2} ya están presentes en cantidades suficientes en el suelo.

La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados. Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía, respecto al contenido de carbono a degradar son muy distintas. La EPA recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos (U.S. EPA, 1995), y dentro de este intervalo se han descrito proporciones C:N de 600:10 (Dibble y Bartha, 1979), 500:10 (Zhou y Carwford, 1995) y de 100:10:1 a 300:10:1 respecto al COT a degradar (Bossert y Bartha, 1984, Oudot y Dutrieux, 1989; Alexander, 1999; Atagana *et al.*, 2003). Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, existen estudios que han descrito efectos inhibitorios en la adición de nutrientes inorgánicos. El uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación, además es importante destacar que la acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo (el amonio se puede unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio).

Características de un nutriente:

- o Poder atravesar la membrana celular por transporte pasivo o activo
- o Ser utilizada por alguna enzima de la célula.

o Proveer energía o sub-unidades de las macromoléculas

Prácticamente cualquier sustancia orgánica de origen biológico es utilizada por algún grupo de microorganismo.

Aquellas sustancias naturales o artificiales que se acumulan en los ecosistemas a concentraciones no deseables para las comunidades naturales, se denominan **recalcitrantes**

Por su **toxicidad**, las sustancias químicas se clasifican en:

❖ **toxicidad no-selectiva**, el agente actúa sobre todo tipo de células: microbianas, del hospedante.

❖ **toxicidad selectiva**, son más tóxicos para las células microbianas (incluso para Gram positivas y no para Gram negativas) y son inocuas para las células del hospedante.

Hidrocarburos de alto peso molecular

Los compuestos de cadena alifática son atacados por una variada micropoblación muy extendida en los suelos: densidades de 10^5 /g suelo son referidas por Alexander (1977) cuando se emplea parafina como sustrato. La velocidad de la degradación está relacionada con la longitud de la cadena y al grado de ramificación de la molécula. Muchos microorganismos degradan hidrocarburos alifáticos pero no los pueden usar como fuentes de carbono. Este fenómeno conocido como cometabolismo implica que las células deben metabolizar una segunda fuente orgánica. Los productos de la descomposición del hidrocarburo, al no ser asimilados, quedan en el medio: alcoholes, aldehidos, ácidos grasos.

Estructura química; De las distintas familias de hidrocarburos del petróleo, los *n*-alcanos y los alcanos ramificados (isoprenoides) de cadena intermedia (C10-C20) son los sustratos más fácilmente degradables por los microorganismos del suelo, y que por lo tanto tienden a ser eficazmente biodegradados. Sin embargo, los alcanos de cadena larga (>C20) son más difíciles de degradar debido a su (elevado peso molecular) y su baja solubilidad en agua. Los cicloalcanos, por norma general, se degradan más lentamente que los *n*-alcanos y alcanos ramificados. Asimismo, los HAPs que contienen de 2 a 3 anillos aromáticos pueden ser biodegradados eficazmente en el suelo en condiciones ambientales óptimas, mientras que los HAP

de 4 anillos, y especialmente, los de 5 o más anillos bencénicos presentan una mayor recalcitrancia inherente y una baja solubilidad. Las fracciones de resinas y asfaltenos son las que presentan una menor degradabilidad debido a la complejas estructuras químicas y al elevado peso molecular de sus moléculas.

Los hidrocarburos aromáticos:

Las primeras etapas del metabolismo comprenden la remoción de cadenas laterales y la introducción de grupos -OH. Los grupos metilo se convierten en carboxilo antes de la apertura del anillo.

ANEXO B**Modelación matemática de proceso biológicos de tratamiento**

Los modelos se usan para estudiar, planificar, diseñar o controlar. En la mayor parte de los casos, la modelación reduce costos, riesgos y tiempo de ejecución de tareas. En un modelo matemático, la representación del sistema es simbólica, en términos matemáticos, incluyendo variables, parámetros y relaciones como ecuaciones o desigualdades. Los usos comunes de modelación incluyen observación y explicación, planificación, diseño de ingeniería, optimización y diseño, análisis, control operacional e investigación científica.

Los modelos son estructuras modulares en las que se establece una clara separación entre la representación del comportamiento físico del sistema modelado y la representación de la interacción del sistema con otros sistemas (interficie del modelo). La figura ilustra esta idea.

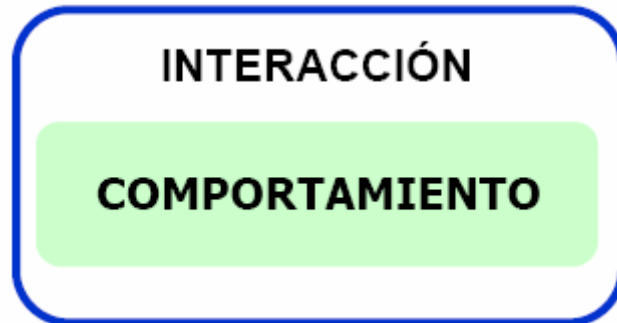


Fig.20 Representación modular de un objeto de modelado

Las estructuras modulares presentan la ventaja de encapsular la representación de algún tipo de comportamiento, de manera que sólo los atributos de la interficie son accesibles desde el exterior del módulo por otros módulos. La reutilización por medio de la agregación consiste en la interconexión de las interficies de los modelos. En ocasiones es posible conseguir que las conexiones entre modelos preserven la analogía con la topología de conexiones de los componentes del sistema.

Esta definición de los modelos proporciona una alta capacidad de abstracción, ya que para reutilizar un modelo no es necesario conocer los detalles internos de implementación, sino simplemente saber como interacciona con otros modelos. Esto posibilita que un usuario pueda agregar en su modelo el modelo de un componente o subsistema, sin que por ello deba tener un conocimiento profundo del comportamiento en el representado.

Además de la reutilización por agregación en el desarrollo estructurado de modelos y la metodología de orientación a objetos proporciona la capacidad de reutilizar mediante el mecanismo de la herencia. Este mecanismo permite crear modelos más complejos al aumentar el grado de descripción de su comportamiento (generalmente a través de la incorporación de nuevas ecuaciones), sin necesidad de escribir todo el modelo nuevamente.

Procesos biológicos de tratamiento

Un proceso biológico de tratamiento o depuración de suelos contaminados con hidrocarburos, es un sistema en el cual se mantiene un cultivo de microorganismos

(**biomasa**) que se alimenta de los hidrocarburos (**sustrato** o alimento). Los hidrocarburos son la materia orgánica biodegradable, el amonio, el nitrato, el fosfato y otros contaminantes a menor concentración.

La materia orgánica del suelo contaminado sufre dos procesos básicos:

- (a) Una parte se degrada en último término a dióxido de carbono y agua, mediante el metabolismo energético
- (b) Otra parte se utiliza en la síntesis de células, para producir más biomasa (crecimiento)

De esta manera, la biomasa limpia los suelos contaminados de la mayor parte de la materia orgánica contaminante, obteniéndose suelos tratados, de una calidad muy superior (baja concentración de hidrocarburos).

Componentes básicos del modelo

En el modelo matemático más simple, se requieren al menos dos componentes para describir lo que ocurre en el sistema (suelo en tratamiento).

Estos componentes son la biomasa y el sustrato; En un procesos heterótrofo, su concentración podría medirse a través de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅) debida a la materia orgánica del suelo contaminado (DBO₅ carbonosa). De hecho, este modelo considera que sólo la materia orgánica soluble es biodegradable y puede ser atacada por la biomasa, por lo que el sustrato (S) es un componente soluble.

Biomasa

Cultivo de microorganismos heterótrofos que se alimentan de la materia orgánica biodegradable del suelo contaminado. Si el proceso es aerobio y se quiere modelar el comportamiento del oxígeno, entonces se requiere este tercer componente.

La materia orgánica puede estar en forma disuelta (*soluble*) o no disuelta (*particulada*), y puede ser biodegradable o no, en diferentes grados. Los sólidos orgánicos se hidrolizan para generar materia orgánica soluble, siendo ésta consumida por los microorganismos heterótrofos. Además, el nitrógeno amoniacal y el fosfato son sustratos inorgánicos necesarios para el crecimiento celular, mientras que el nitrógeno orgánico soluble y particulado se consideran dos sustratos aparte. La alcalinidad,

debida básicamente al sistema del bicarbonato, es otro componente del sustrato, mientras el oxígeno y el nitrato son dos oxidantes empleados en la respiración celular.

MODELACIÓN GENERAL DE PROCESOS BIOLÓGICOS DE TRATAMIENTO

En primer lugar, hay que definir los **componentes** del suelo contaminado que se van a utilizar en el modelo matemático del proceso. Estos componentes serán las **variables de estado** del sistema.

A continuación deben definirse los **procesos cinéticos** que afectan a los componentes, es decir, que modifican las concentraciones de los componentes. Los **parámetros cinéticos** pueden ser numerosos y difíciles de conocer con exactitud, factor a tener a cuenta. Un mismo proceso afecta normalmente más de un componente, por lo que se pueden utilizar **coeficientes estequiométricos** con signo.

Modelo dinámico elemental del suelo contaminado, mezcla completa

La composición en el suelo contaminado son variables en el tiempo. Éstas variables se determinan mediante los correspondientes balances de sustrato y biomasa, que dan lugar a las ecuaciones diferenciales que definen el modelo. Pero antes de plantear el balance se requiere conocer los procesos cinéticos que afectan al sustrato y a la biomasa.

Procesos cinéticos de la biomasa

El crecimiento de la biomasa es proporcional a su concentración y la velocidad específica de crecimiento:

Este proceso es responsable del consumo del sustrato

$$r_g = \mu X_{V,a} \quad \text{Ec. 16}$$

Con:

r_g : Velocidad de crecimiento de la biomasa, g SSV/(m³.d)

μ : Velocidad específica de crecimiento de la biomasa, g SSV/(g SSV.d) = d⁻¹

$X_{V,a}$: Concentración de SSV en la laguna

SSV = sólidos suspendidos volátiles

La velocidad específica de crecimiento de sustrato sigue la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_e}{K_s + S_e} \quad \text{Ec. 17}$$

Con:

S_e : concentración del sustrato

K_s : constante de saturación media del sustrato

Sustituyendo la ecuación (16) en la (17) queda la ecuación tal como se emplea en el modelo:

$$r_g = \mu_{\max} \frac{S_e}{K_s + S_e} X_{V,a} \quad \text{Ec. 18}$$

Este proceso cinético hace aumentar la concentración de biomasa.

b) Metabolismo endógeno de la biomasa (muerte y autoconsumo) (r_d)

Se considera independiente de la concentración de sustrato, y proporcional a la concentración de biomasa:

$$r_d = k_d X_{V,a} \quad \text{Ec. 19}$$

Este proceso cinético hace disminuir la concentración de biomasa.

Procesos cinéticos del sustrato

En este modelo, el único proceso del sustrato es su consumo o **utilización** por la biomasa. La velocidad de utilización de sustrato es un proceso ligado al crecimiento de la biomasa. De hecho, el segundo depende de la primera. Por cada kg de DBO5

consumida por la biomasa se producen Y kg de SSV (nueva biomasa). Este factor (Y) es un coeficiente estequiométrico, y se conoce como factor de rendimiento de la biomasa, con un valor de 0,4-0,8 g SSV/g DBO5, típicamente 0,6 g SSV/g DBO5 (WEF-ASCE, 1998)

Utilización de sustrato (r_{SU})

La relación entre el crecimiento de la biomasa y la utilización de sustrato suele expresarse:

$$r_g = Y r_{SU} \quad \text{Ec. 20}$$

Con:

R_g : Velocidad de utilización de sustrato, g DBO5/(m3.d)

Y : Factor de rendimiento de la biomasa, kg SSV/(kg DBO5)

r_{SU} : Velocidad de utilización de sustrato, g DBO5/(m3.d)

Es decir, la velocidad de utilización de sustrato se expresa como:

$$r_{SU} = \frac{1}{Y} r_g \quad \text{Ec.21}$$

O bien, sustituyendo la ecuación (18) en la (21):

$$r_{SU} = \frac{1}{Y} \mu_{\max} \frac{S_e}{K_s + S_e} X_{V,a} \quad \text{Ec.22}$$

Como se observa en las ecuaciones (21) y (22), la utilización de sustrato no es un proceso independiente del crecimiento, por lo que sólo se requiere uno de los dos y el factor Y. Por tanto, el conjunto de procesos cinéticos puede definirse a través del crecimiento (a) y el metabolismo endógeno (b).

Obtención de las ecuaciones diferenciales del modelo: balances de sustrato y biomasa

Se considera que la temperatura no es una incógnita en la modelación. Entonces, se requiere plantear solamente los balances de sustrato y biomasa.

La forma general del balance diferencial (condiciones no estacionarias) de **un componente** en el reactor biológico es:

$$\sum \left(\begin{array}{c} \text{Flujos másicos} \\ \text{de entrada por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right) - \sum \left(\begin{array}{c} \text{Flujos másicos} \\ \text{de salida por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right) + \sum \left(\begin{array}{c} \text{Términos} \\ \text{cinéticos} \\ \text{g/d} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{de materia por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right)$$

Ec. 23

Los términos cinéticos se suman o se restan según que el proceso afecte positivamente o negativamente. Un coeficiente estequiométrico para cada proceso y componente determina el signo y la proporción en que cada proceso contribuye al aumento o a la disminución de cada componente.

El término de velocidad de acumulación es la derivada respecto al tiempo de la cantidad acumulada. Por ejemplo, para el sustrato:

$$\left(\begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{de sustrato por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right) = \frac{d}{dt}(V.S_e)$$

Como en este caso el volumen es constante:

$$\left(\begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{de sustrato por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right) = V \frac{dS_e}{dt}$$

Balance de sustrato (S)

Para el caso del sustrato:

$$\left(\begin{array}{c} \text{Entrada} \\ \text{de sustrato} \\ \text{g/d} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Salida} \\ \text{de sustrato} \\ \text{g/d} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Utilización} \\ \text{de sustrato} \\ \text{g/d} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{de sustrato por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right)$$

Ec.24

$$Q_1 S_1 - Q_1 S_e - V r_{SU} = V \frac{dS_e}{dt} \quad \text{Ec.25}$$

Sustituyendo la expresión de r_{SU} :

$$Q_1(S_1 - S_e) - V \frac{1}{Y} \mu_{\max} \frac{S_e}{K_s + S_e} X_{V,a} = V \frac{dS_e}{dt} \quad \text{Ec.26}$$

Y, despejando la derivada se obtiene la ecuación diferencial de la variable de estado S_e :

$$\frac{dS_e}{dt} = \frac{Q_0}{V} (S_1 - S_e) - \frac{\mu_{\max}}{Y} \frac{S_e}{K_s + S_e} X_{V,a} \quad \text{Ec.27}$$

Balance de biomasa (XV)

Se formula el balance de biomasa

$$\left(\begin{array}{c} \text{Entrada} \\ \text{de biomasa} \\ \text{g/d} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Salida} \\ \text{de biomasa} \\ \text{g/d} \end{array} \right) + \left(\begin{array}{c} \text{Crecimiento} \\ \text{de biomasa} \\ \text{g/d} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{Metabolismo} \\ \text{endógeno} \\ \text{g/d} \end{array} \right) = \left(\begin{array}{c} \text{Acumulación} \\ \text{de biomasa por} \\ \text{unidad de tiempo} \\ \text{g/d} \end{array} \right)$$

Ec. 28

$$Q_1 X_{V,1} - Q_1 X_{V,a} + V r_g - V r_d = V \frac{dX_{V,a}}{dt} \quad \text{Ec. 29}$$

Y, despejando la derivada, se obtiene la ecuación diferencial de la variable de estado $X_{V,a}$:

$$\frac{dX_{V,a}}{dt} = \frac{Q_0}{V} (X_{V,1} - X_{V,a}) + \mu_{\max} \frac{S_e}{K_s + S_e} X_{V,a} - k_d X_{V,a} \quad \text{Ec. 30}$$

Las ecuaciones (27) y (30) son las dos ecuaciones diferenciales ordinarias que constituyen el núcleo del modelo matemático.

Incorporación del oxígeno al modelo

- b) Describir matemáticamente la **transferencia de oxígeno** en la aireación
- c) Describir matemáticamente el efecto de la concentración de oxígeno en la cinética de los procesos aerobios.
- d) Introducir los **procesos cinéticos del oxígeno**
- e) Formular el **balance dinámico de oxígeno** en la laguna.

Efecto de la concentración de oxígeno disuelto en los procesos cinéticos de crecimiento y metabolismo endógeno

Este efecto se modela multiplicando las velocidades de reacción de los procesos cinéticos, ecuaciones (19) y (20), por un factor de Monod que incluye la concentración de oxígeno disuelto, el factor es:

$$\frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}}$$

Este factor de Monod tiende a la unidad para concentraciones elevadas de oxígeno disuelto, y tiende a cero para valores mucho menores que K_s . K_s tiene un valor aproximado de 0,2 g/m³. Es decir, si hay suficiente oxígeno disuelto las velocidades de reacción son exactamente las de las ecuaciones (19) y (20). Si la concentración de oxígeno disuelto es más baja, entonces las velocidades de reacción serán menores que las expresadas por las ecuaciones (19) y (20). Estas ecuaciones se convierten en las siguientes:

$$r_g = \mu_{\max} \frac{S_e}{K_s + S_e} \frac{S_{O_2}}{K_s + S_{O_2}} X_{v,a}$$

$$r_d = k_d \frac{S_{O_2}}{K_s + S_{O_2}} X_{v,a}$$

Procesos cinéticos del oxígeno

El consumo de oxígeno está ligado a la utilización de sustrato y al metabolismo endógeno. La velocidad de consumo de oxígeno ligada a la utilización de sustrato se puede expresar como:

$$(r_{O_2})_{SU} = a r_{SU} = \frac{a}{Y} r_g$$

Es decir:

$$(r_{O_2})_{SU} = \frac{a}{Y} \left[\mu_{\max} \frac{S_e}{K_s + S_e} \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} X_v \right]$$

Se deduce que el coeficiente estequiométrico del oxígeno respecto al crecimiento celular es $-a/Y$ (el signo menos se debe a que el oxígeno se consume en el proceso).

La velocidad de consumo de oxígeno ligada al metabolismo endógeno se puede describir por la ecuación:

$$(r_{O_2})_d = b \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} X_{v,a}$$

O bien, multiplicando y dividiendo por k_d :

$$(r_{O_2})_d = \frac{b}{k_d} \left[k_d \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} X_{v,a} \right]$$

En este caso, el coeficiente estequiométrico del oxígeno respecto al metabolismo endógeno es $-b/k_d$, con signo también negativo, ya que en este proceso hay consumo de oxígeno.

ANEXO C

INTERACCIONES SINÉRGICAS ENTRE MICROORGANISMOS

Comensalismo

Constituye una interacción muy común en la naturaleza, en donde los procesos de degradación de moléculas complejas son realizados por lo general por poblaciones mixtas (cadenas alimenticias), cada una de las cuales ofrece a las otras un sustrato más simple. El organismo que recibe el beneficio se denomina comensal y la relación es con frecuencia, pero no necesariamente, casual, ya que gran número de especies puede colaborar, existiendo poca especialización entre los asociados.

Algunos ejemplos implican una estrecha unión física entre ellos, en otros casos no se requiere proximidad entre los individuos.

Ejemplos de esta asociación:

Modificación de un sustrato: una población convierte un sustrato no disponible para otra población en un producto que puede ser asimilado y usado como nutriente

Remoción de factores inhibidores: una especie metaboliza toxinas u otros factores inhibidores, permitiendo, entonces, la multiplicación de su asociado. Las variaciones del pH o del Eh, la remoción del O₂, la reducción de la presión osmótica, los cambios en los niveles de nutrientes por la actividad biológica, son causas de beneficio para el comensal

Competencia

En ambientes naturales, suelo, aguas, los sustratos energéticos y los nutrientes son por lo general limitantes como para mantener altas poblaciones microbianas. Estas interactúan compitiendo por los sustratos, se habla de competencia nutricional. Si excepcionalmente, el ambiente es rico de nutrientes, la competencia puede ejercerse por el espacio, la luz, etcétera.

Este tipo de interacción ejerce un profundo impacto en la sucesión de microorganismos, en la selección natural y en la composición de las comunidades microbianas. Podemos hablar de competencia interespecífica o intraespecífica, según se realice entre organismos de la misma o diferente especie.

La figura 19 (Alexander, 1977) esquematiza la competencia en medio líquido entre dos bacterias. El mejor competidor, en general el que presenta menor tiempo de generación, se multiplica a la misma velocidad en cultivo puro y en mixto, aunque su densidad final es frecuentemente menor en cultivo mixto. El otro organismo crece a igual velocidad en cultivo puro o mixto, pero su velocidad de crecimiento disminuye cuando la primera especie metaboliza el nutriente limitante. En el suelo, uno de los principales factores limitantes es el carbono, y la competencia por este elemento se hace evidente cuando la densidad de la población es alta. Al agregar sustancias carbonadas fácilmente metabolizables, se observa el levantamiento de la inhibición de la población de débil poder competitivo.

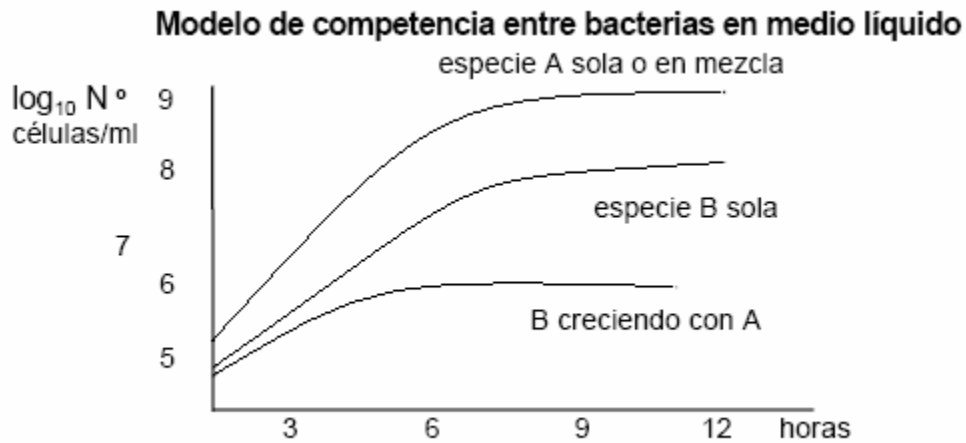


Fig. 21 Modelo de competencia entre bacterias en medio líquido.

La capacidad de un organismo para competir está gobernada por una serie de factores:

- * Alta velocidad de crecimiento: las especies que usan los nutrientes limitantes rápidamente poseen sin duda ventajas sobre las de crecimiento lento
- * tolerancia a factores abióticos: la facilidad de crecer en condiciones extremas, en bajas o altas temperaturas, altas intensidades luminosas, bajos niveles de humedad, brindan al organismo ventaja ecológica indudable
- * tolerancia a fluctuaciones del ambiente: de temperatura, niveles hídricos, intensidad luminosa, etc.
- * capacidad para sintetizar y almacenar sustancias de reserva y emplearlas cuando el aporte de nutrientes disminuye
- * capacidad de desplazarse hacia áreas en donde el nivel de nutrientes limitantes es mayor

(quimiostasis), Cuando materiales orgánicos se incorporan al suelo o aguas, los primeros colonizadores son en general las bacterias con alta actividad metabólica.

En ambientes acuáticos, es posible observar competencia por la luz; la masa de fitoplancton limita la difusión de las radiaciones. El CO₂ y el O₂, poco soluble en el agua, provocan también fenómenos competitivos entre heterótrofos aerobios, sobre todo en aguas contaminadas con residuos orgánicos.

En regiones áridas, la competencia por el agua ejerce importante rol en la sucesión de especies. La competencia por el espacio resulta más difícil de demostrar. Además,

las observaciones en microscopía electrónica de barrido en finos cortes de suelo, muestran la existencia de amplias zonas sin colonizar (Gray y Williams, 1971), indicando que aparentemente habrían escasas limitaciones espaciales para el desarrollo de microorganismos. Aunque esta limitación podría ocurrir a nivel de microporos, donde una pequeña partícula de materia orgánica estimula la proliferación de células y micelio fúngico que puede obstruir rápidamente el microhabitat. Este tipo de interacción antagónica es una de las más difíciles de demostrar en comunidades naturales y se recurre a modelos con suelo estéril y la inoculación simultánea de los organismos sospechosos que interactúan.

INTERACCIÓN	Población A	Población B
NEUTRALISMO	0	0
COMENSALISMO	0	+
SINERGISMO (Protocooperación)	+	+
MUTUALISMO (Simbiosis)	+	+
COMPETICIÓN	-	-
AMENSALISMO	0 o +	-
PREDACIÓN	+	-
PARASITISMO	+	-

Fig. 22 interacción entre poblaciones de microorganismos.

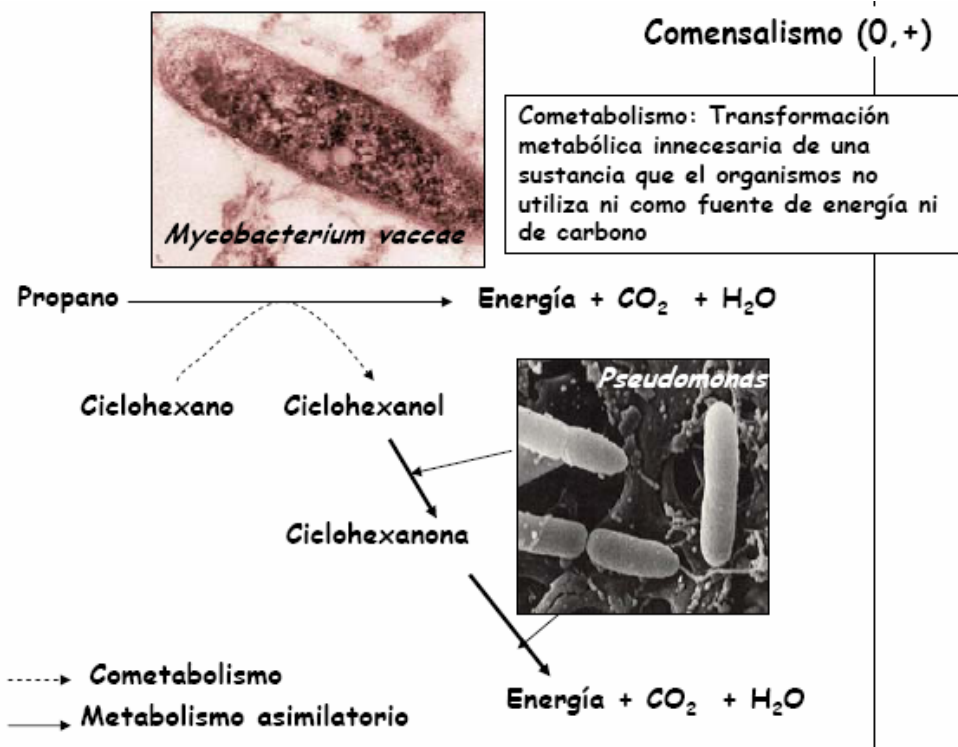


Fig. 23 esquema de cometabolismo.

Competencia (-,-)

- Se establece cuando dos poblaciones utilizan los mismos recursos.
- PRINCIPIO DE EXCLUSIÓN COMPETITIVA
- COEXISTENCIA: Densidades poblacionales máximas más bajas y Tasas de crecimiento menores.
- Mayor tasa de crecimiento de una de las poblaciones
- Tasa de crecimiento variable dependientes de las circunstancias ambientales
- Tolerancia al estrés ambiental: Supervivencia en condiciones de no crecimiento

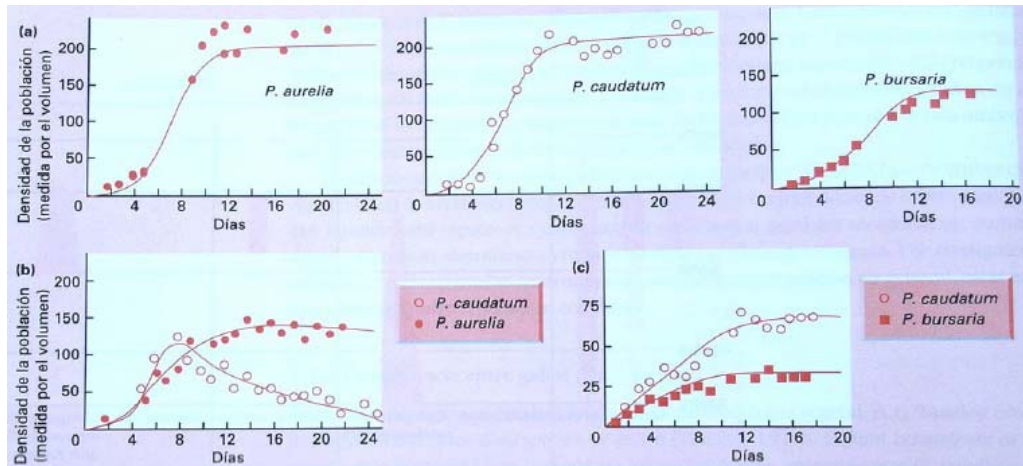


Fig. 24 representación del crecimiento de microorganismos en coexistencia.

ANEXO D

USO DE LA INTERFAZ GRAFICA SIMULINK

- Los elementos de trabajo de un modelo de Simulink son objetos o iconos, agrupados en librerías que proporciona el paquete integrado de Matlab para las distintas aplicaciones.
- El fichero asociado a cada modelo es un *.MDL, que puede ser abierto como un fichero *.M cualquiera (tiene una estructura especial pero el funcionamiento es el mismo)

Creación De Un Modelo Simulink

Para generar un diagrama de bloques, una vez abierto un fichero

*.MDL nuevo y con ventana de Simulink, se sigue el siguiente proceso:

1. Se abre la librería donde se encuentra el elemento necesario.
2. Para copiar un objeto de la sesión de trabajo, basta con seleccionar el objeto y arrastrarlo.

3. Para hacer una conexión entre una salida y una entrada, se posiciona el cursor sobre la salida de la fuente o la entrada, se pulsa el botón izquierdo del ratón y sin soltarlo se desplaza el cursor hasta el otro punto que se desea unir.
4. Haciendo doble click sobre los elementos copiados se modifican los parámetros de éste. (Admiten parámetros que sean variables de Workspace)

Crear Subsistemas

Los subsistemas son usados cuando nuestro modelo se hace complicado, ya que aumenta de tamaño y complejidad. El agrupamiento es útil por una serie de razones:

- Ayuda a reducir el número de bloques visualizados.
- Permite mantener juntos los bloques que están funcionalmente relacionados.
- Hace posible establecer un diagrama de bloques jerárquico.

Se pueden crear los subsistemas de dos maneras:

- Añadiendo un bloque **Subsystem** al modelo, y luego añadiendo los bloques que contiene.
- Añadiendo los bloques que constituyen el subsistema y posteriormente agrupándolos.

Para crear un subsistema antes de añadir los bloques que contiene, se debe insertar un bloque Subsystem y crear los bloques que constituyen el subsistema de la forma siguiente:

- o Copiar el bloque **Subsystem** de la biblioteca **Connections** del modelo.
- o Abrir el bloque **subsystem** (doble click).

En la ventana nueva del bloque **Subsystem**, crear el correspondiente subsistema. Utilizar bloques **Inport** para representar las entradas que vienen desde fuera del subsistema y bloques **Output** para las salidas externas.

Una vez creados los bloques que se desea convertir en un subsistema, se debe hacer lo siguiente:

Encierre los bloques y líneas de conexión que desea incluir dentro del subsistema mediante un cuadro de delimitación. Cuando se suelta el botón del ratón, se seleccionan los bloques y todas las líneas de conexión. Escoger **Options**, luego **Group**. SIMULINK reemplaza los bloques que están en el grupo por un único bloque **subsystem**.

Resolución Numérica De Las Ecuaciones Diferenciales

El tiempo de cálculo requerido depende del número de ecuaciones, de la complejidad de las mismas, de la frecuencia e intensidad con que se producen cambios en las derivadas, y del paso de integración (Δt) utilizado. Normalmente los métodos de Runge-Kutta-Fehlberg aportan un tiempo de cálculo optimizado, ya que adaptan el paso de integración a la geometría local de las curvas de las variables de estado, y además realizan a cada paso de integración una verificación local del error, por lo que son automáticos, frente a los de Euler y Runge-Kutta, que no hacen esta verificación. Normalmente se requiere de un programa especializado para la resolución de las ecuaciones del modelo. Sin pretender ser exhaustivo, ACSL Model o MATLAB son programas propietarios que incorporan la resolución numérica de ecuaciones diferenciales ordinarias, con instrucciones de integración de alto nivel, que incorporan los algoritmos de integración.

Configuración De La Simulación

Es importante configurar la simulación antes de realizarla. Para ello, en el menú principal de la ventana del modelo (*.MDL) creado con Simulink ir a *Simulation Parameters* permite configurar diferentes características sobre la simulación, a saber:

- ♦ La forma de resolver el sistema de ecuaciones diferenciales que componen el modelo diseñado en Simulink y el tiempo de simulación.

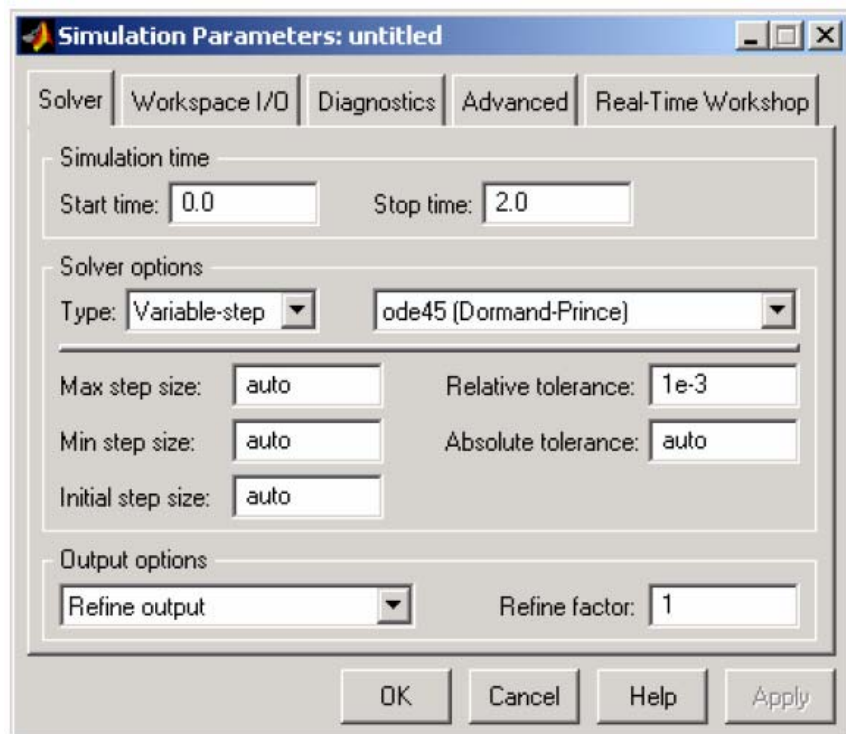


Fig. 25 Configuración de los parámetros de simulación en Matlab.

Condiciones Iniciales

Como ya se comentó, las ecuaciones diferenciales que definen el modelo son: ecuaciones ordinarias en el tiempo, en las que las incógnitas son la evolución temporal de sustrato, biomasa, aceptor de electrones, que se deben determinar. Este constituye un típico problema del valor inicial. Para ello se requiere:

a) Conocer todos los **parámetros** de las ecuaciones ($\mu_{\max}$, Y , K_s , K_E , etc), se pueden tomar valores típicos de la bibliografía, o bien calcularlos en un proceso de optimización, a partir de datos experimentales y los resultados de la simulación (identificación de parámetros).

b) Conocer las **condiciones iniciales**, es decir las concentraciones de sustrato, biomasa, aceptor de electrones. para $t=0$. Éstas se pueden determinar experimentalmente, o se pueden suponer unos valores razonables.

En estas condiciones, las ecuaciones diferenciales se pueden resolver por los

métodos numéricos típicos de las ecuaciones diferenciales ordinarias en problemas del valor inicial.

c) conocer las variables de salida que ha de generar la simulación en el entorno de trabajo de MATLAB

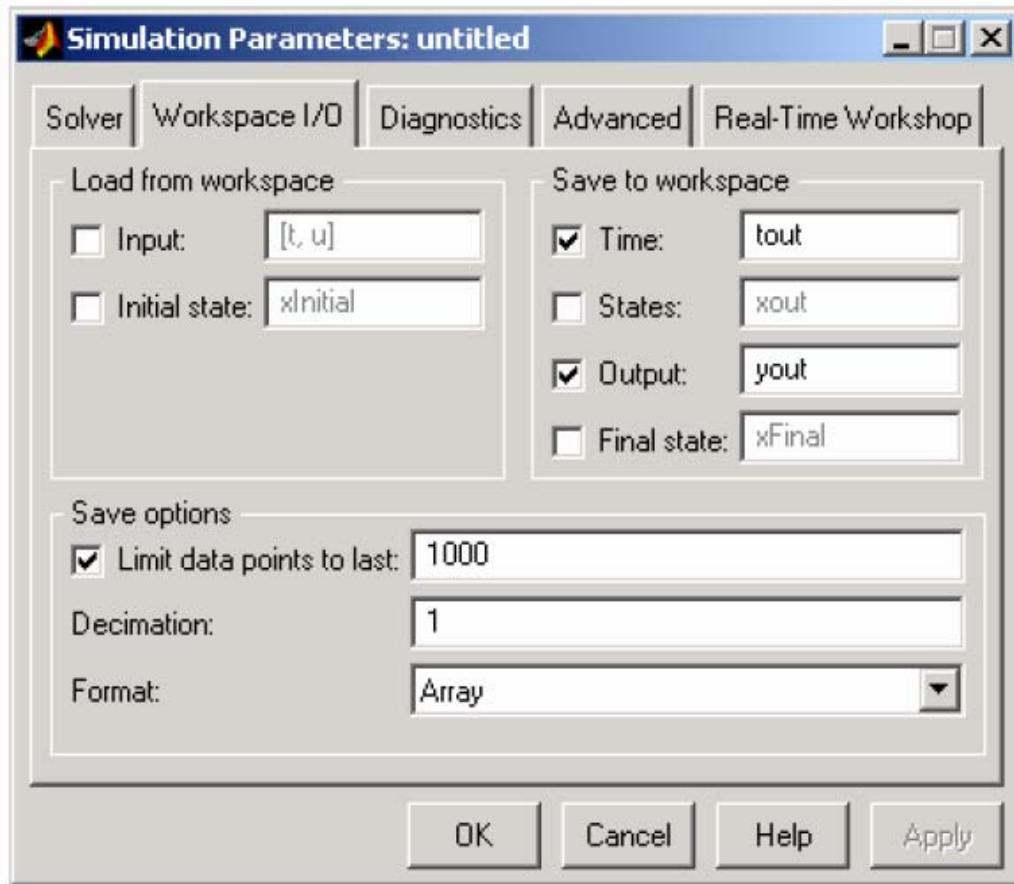


Fig. 26 Configuración de los parámetros de simulación en Matlab.

Paso De Simulacion

♦ Con respecto al paso de SIMULACIÓN, es necesario tener en cuenta ciertos aspectos básicos:

- ✓ El paso de simulación, que es el intervalo de integración de los algoritmos de resolución del modelo, se puede definir variable (lo fija Simulink en función del modelo concreto a simular) en todos los casos excepto en la generación de código RTW
 - ✓ Si el paso de simulación es muy bajo el tiempo de ejecución es elevado (puntos excesivos), y si es muy alto la resolución es peor (se pierde definición del sistema), pudiendo incluso llegar a no representar correctamente el comportamiento del sistema al no cumplir la teoría de sistemas muestreados (la simulación de sistemas continuos con Simulink pretende representar su comportamiento real en el tiempo)
 - ✓ Una regla práctica es hacer que el paso de simulación sea al menos de la décima parte del tiempo de subida de la respuesta del sistema
- ◆ Con respecto a las variables de salida de Simulink, es necesario comentar :
- ✓ Se pueden pasar las respuestas de las simulación al Workspace de MATLAB a través de los bloques *"to Workspace"* de Simulink
 - ✓ Convendrá también tener en el entorno de trabajo el array de tiempo con el que se ha generado la simulación, éste se puede generar con un bloque *"Clock"* de Simulink y pasarlo a MATLAB del mismo modo, pero también se puede usar la variable *tout* que se genera automáticamente si así se indica en la configuración de la simulación
 - ✓ La variable *yout* que se genera del mismo modo contiene el resultado de las señales conectadas a puertos de salida del modelo de Simulink

Acelerador De Simulink

Para incrementar la velocidad de Simulink se debe instalar el acelerador "Accelerator". Este permite automáticamente generar una versión mejorada de los modelos los cuales correrán diez veces más rápido que el original. El acelerador puede ser usado sobre modelos continuos, discretos en el tiempo e híbridos.

El acelerador trabaja generando y compilando un código-C para un modelo dado. Una vez se completa la compilación, la simulación es ejecutada en la ventana de modelos de Simulink exactamente igual que antes sólo que más rápidamente. El propósito del acelerador es aumentar la velocidad de simulación. Si el programa MatLab posee instalado el "Accelerator" podrá iniciarse la acción aceleradora seleccionando la opción simulation en el menú principal del Simulink y dentro de esta seleccionando la opción Accelerate. Esta acción es totalmente transparente en el sentido de que el

incremento de la velocidad se presenta sin ningún otro requerimiento por parte del usuario.

Creación De Aplicaciones Independientes De Matlab

Entre las numerosas herramientas de Matlab encontramos un compilador capaz de realizar una enorme variedad de conversiones de archivos con 3 objetivos principales:

- Integrar instrucciones Matlab en otros lenguajes como C o Basic, facilitando de esta forma enormemente la codificación de complejas operaciones matemáticas, gráficas, etc.
- Crear bibliotecas de funciones Matlab que puedan ser llamadas desde cualquier aplicación.
- Independizar el código compilado de Matlab del entorno. Es decir, prescindir de la aplicación Matlab a la hora de ejecutar su código, generando aplicaciones independientes (*Stand alone applications*) El compilador de Matlab se llama mbuild, aunque básicamente solo se invoca con este nombre para configurarlo y cuando se desea compilar archivos C y generar el ejecutable (.exe) correspondiente. Para la mayor parte de las aplicaciones restantes del compilador se emplea la sentencia mcc.

Crear Una Función S De Simulink.

Para traducir un archivo .m a C y crear la correspondiente función S de Simulink se invoca al compilador con la siguiente instrucción:

```
mcc -S archivom
```

Nota: los comandos y path pueden variar de acuerdo a la versión de Matlab

Crear Una Aplicación Independiente C.

Para traducir un archivo .m a C y generar directamente el ejecutable independiente que puede ser llamado sin tener instalado MATLAB, úsese:

```
mcc -m archivom
```

Crear Una Aplicación Independiente C++.

La instrucción que empleamos en este caso es similar a la anterior, pero cambiamos la opción `-m` del compilador por `-p`, quedando:

```
mcc -p archivom
```

Crear Una Aplicación Independiente C Con Funciones De Librerías Gráficas.

Para convertir archivos `.m` que contienen funciones de tratamiento de gráficos a C y generar un ejecutable que puede ser invocado en un sistema en el que no se ha instalado Matlab, se emplea:

```
mcc -B sgl archivom
```

Crear Una Aplicación Independiente C++ Con Funciones De Librerías Gráficas.

Si se desea hacer lo anterior empleando el lenguaje C++ en vez de C el comando a introducir es el siguiente:

```
mcc -B sglcpp archivom
```

Crear Una Librería C.

Una de las grandes ventajas del compilador C es que permite no sólo crear ejecutables o archivos en código fuente intermedio C o C++, sino que además integra una funcionalidad capaz de generar librerías (o bibliotecas de archivos, empleando la traducción correcta del término inglés original *libraries*) Estas librerías reúnen una serie de funciones agrupadas por alguna característica común que pueden ser invocadas desde cualquier aplicación.

Matlab no sólo genera librerías y ejecutables, sino que dispone de una aplicación de empaquetamiento de los mismos para su correcta instalación en el sistema final.

Generación Automática De Archivos Mex

El compilador de Matlab automatiza la creación de archivos MEX de C. Los archivos MEX contienen código objeto que es dinámicamente enlazados como *runtime* en el entorno Matlab por el intérprete del programa. El proceso se resume en tres pasos:

- El compilador de Matlab traduce las funciones MATLAB en sus funciones equivalente en lenguaje C.
- La instrucción Matlab `cmex` llama al compilador y al enlazador del sistema para construir un fichero MEX objeto.
- El intérprete de Matlab enlaza automáticamente la función de Matlab como *runtime*, incluyendo las rutinas *Handle Graphics*, para las cuales se generan de nuevo llamadas *callbacks* a Matlab.

Uso Del Compilador Matlab

Para construir una aplicación del tipo *stand-alone* que incorpore código originalmente desarrollado como archivos .M de Matlab, deberán de seguirse los pasos siguientes:

- Utilizar el compilador de Matlab para convertir archivos M en C mediante la utilización de la instrucción `mcc -e` (la cual es externa a MATLAB).
- Compilar el código C fuente en código objeto utilizando un compilador ANSI C.
- Enlazar el código resultante con la *C Math Library* y con cualquier tipo de archivos y programas específicos que hayan sido previamente definidos por el usuario.

Siguiendo los pasos anteriores obtendremos un archivo ejecutable (.EXE) que funcionará de forma independiente a Matlab, habiendo instalado primero la librería.

Matlab C Math Library. Matlab incluye la librería en un ejecutable, de forma que mediante la ejecución de este fichero instala la librería en el directorio indicado.

Pero el ejecutable varía en las distintas versiones de Matlab, de esta forma en Matlab 6.0

este ejecutable es `mglinstaller.exe`, mientras que en Matlab 7.0 es `MCRInstaller.exe`.

Creación De Las Librerías

Para la creación de la Librería tanto en C como en C++ hemos seguidos los pasos de la ayuda de *Matlab 7.0*. se debe crear una librería a partir de varios ficheros .m. Los pasos que se deben seguir para obtener la librería en código C para este caso, los pasos para C++ son similares, son:

- 1- Copiar todos los ficheros .m en un misma carpeta o directorio.
- 2- Crear la librería con el comando de Matlab `mcc` correspondiente, que se explica al principio.

Con los dos pasos anteriores tenemos creada la librería , ya lista para ser usada por cualquier compilador de C.

debemos de verificar que existe un path a la librería dinámica (*dynamic library*) de Matlab. En caso de que no existiera dicho path habría que insertarlo, teniendo que la ruta viene dada por <Matlabroot>\bin\win32, donde <Matlabroot> es el directorio raíz donde hemos instalado Matlab. Por defecto la instalación de Matlab añade dicho path. Ahora compilamos el fichero M (nombre.m) haciendo uso del comando mcc, de la siguiente forma:

```
mcc -mv nombre.m.
```

La opción -m genera el código C de la aplicación *stand-alone* y mientras la opción -v es opcional, cuyo único objetivo es mostrar los pasos de la compilación.

Una vez realizados los dos puntos anteriores y comprobando que el compilador no genera ningún mensaje de error, vemos que en la carpeta se ha generado un ejecutable (nombre.exe) que anteriormente no estaba. Este ejecutable en principio no debería de funcionar correctamente, para lograr el funcionamiento deseado de esta aplicación, primero deberemos de seguir los siguientes pasos:

1. Instalar *MCR library*. Esta librería se puede encontrar en un ejecutable, que podemos encontrar en la siguiente ruta:

```
<Matlabroot>\toolbox\compiler\deploy\MCRInstaler.exe.
```

2. Ejecutaremos este fichero (MCRIntaller) en la ruta deseada (por ejemplo MCR).

3. Copiamos las componentes y archivos CTF de la aplicación en otro directorio (por ejemplo, C:\approt).

4. Añadimos, si no existiera ya, el *path*: <mcr_root>\runtime\win32 a la *dynamic library*, donde <mcr_root> es el directorio creado en el paso 1. Por defecto el instalador de MCRInstaler.exe hace este path, pero es recomendable de verificar su existencia para evitar que errores en la aplicación.

Seguidos los pasos anteriores ahora podemos ejecutar la aplicación de una forma correcta.

Estos 3 pasos también son los pasos a seguir para poder ejecutar la aplicación en otro ordenador que no disponga de Matlab o si dispone no se requerirá la utilización de Matlab para la ejecución de la aplicación.

Rendimiento Del Compilador

Mediante la compilación de los archivos m nosotros podemos obtener un rendimiento significativo. La velocidad de mejora de este rendimiento, depende fuertemente de cada aplicación. En algunos casos el rendimiento puede mejorar hasta en 200 veces la ejecución si la comparamos con el modo de trabajo interpretado del programa. Las operaciones matriciales y vectoriales ejecutadas desde Matlab ya están fuertemente optimizadas en sus diseños. Sin embargo, mediante la utilización del compilador se obtendrán mejoras significativas.

